

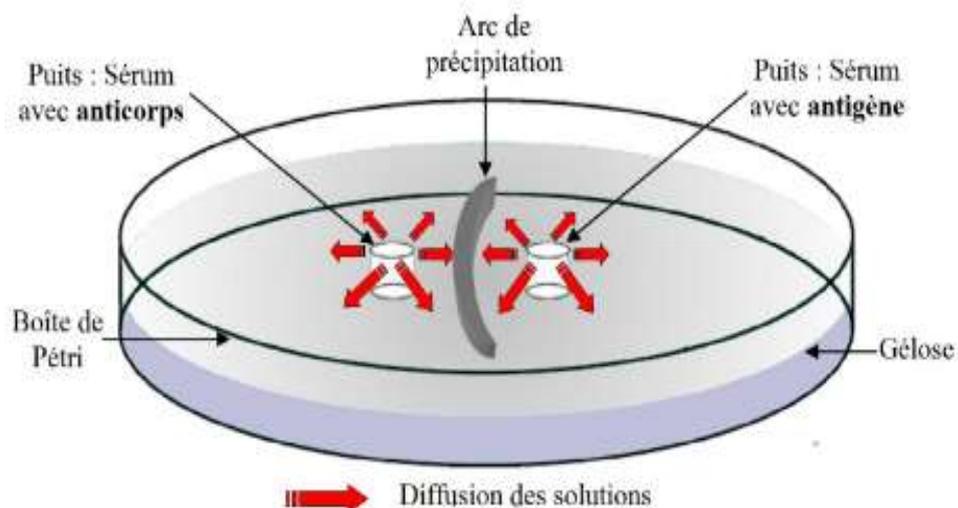
Travaux pratiques d'interface système immunitaire- microorganismes

Master I Microbiologie Appliquée

TP N° 4 : MÉTHODE DE L'IMMUNODIFFUSION OU TEST D'OUCHTERLONY

1. Principe de la méthode d'Ouchterlony

C'est une méthode d'immunodiffusion sur gel : les solutions déposées dans les puits creusés dans le gel diffusent de façon homogène dans toutes les directions autour du puits. Deux auréoles de diffusion peuvent donc entrer en contact lorsqu'elles ont suffisamment progressé. Cette zone de contact reste invisible s'il n'y a pas de réaction entre les deux solutions. Quand il y a réaction entre les solutions, il se forme un arc de précipitation visible à l'œil nu. Celui-ci est dû à l'interaction entre de nombreux anticorps et les antigènes spécifiques.



2. Principe de la méthode avec des produits de substitution

On cherche à identifier, parmi 4 personnes, un individu ayant été en contact avec la méningite et en particulier la Méningite à méningocoques (*Neisseria meningitidis*).

L'individu ayant été en contact avec le méningocoque a produit des anticorps capables de réagir face aux antigènes de cette bactérie.

La spécificité d'un anticorps étant liée à sa capacité de liaison avec l'antigène, le test d'immunodiffusion, ou test d'Ouchterlony, permet la mise en évidence de cette liaison antigène-anticorps et donc de repérer l'individu séropositif au méningocoque.

Pour ce teste :

- Le sérum contenant des **anticorps** est remplacé par de la **soude**.
- La solution contenant les **antigènes** est remplacée par du **sulfate de zinc**.
- Les **sérums des individus sains** sont remplacés par de **l'eau (eau salée, eau sucrée et eau distillée)**

Remarque 1 : le mélange soude et sulfate de zinc engendre un précipité marqué par l'apparition d'un arc similaire à celui qu'aurait produit une liaison antigène-anticorps.

Remarque 2 : les solutions de soude et sulfate de zinc peuvent être inversées dans les puits de gélose.

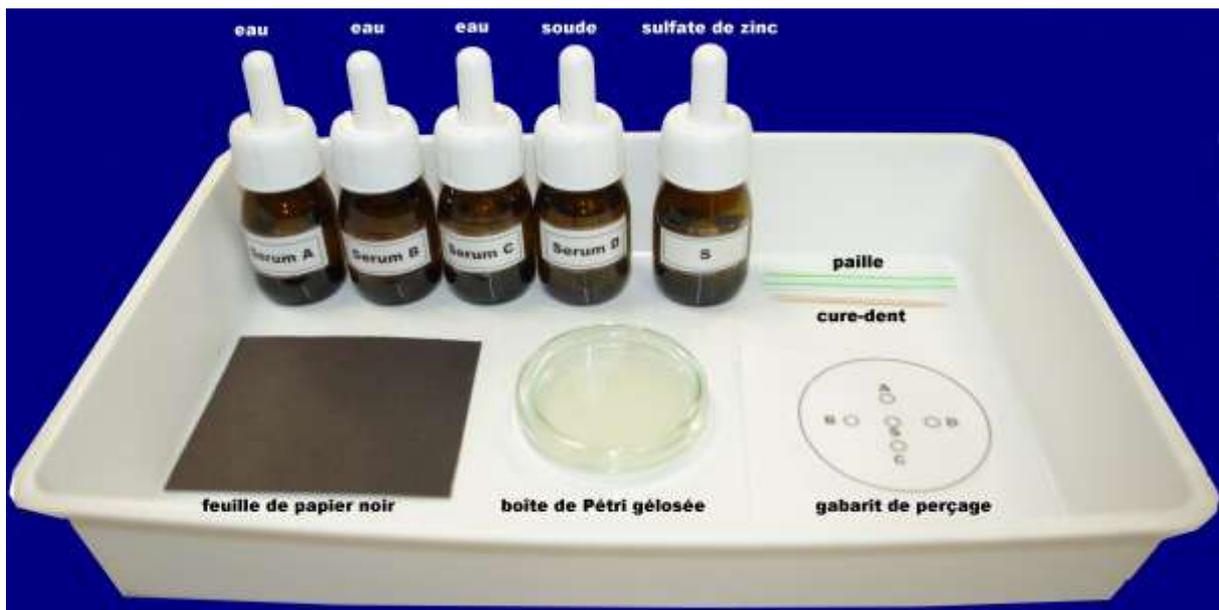
Ou bien on peut les remplacé par :

- Sang comme sérum contenant les **anticorps**.
- les antisérums anti-A, anti-B, anti-AB anti-D . Comme des solutions contenant les **antigènes**.

3. Matériel nécessaire à la réalisation du test d'Ouchterlony

Matériel		
 Agar-agar : 1,5 g pour 100 ml d'eau	 Solution de soude : 0,4 g pour 10 ml d'eau	 Solution de sulfate de zinc : 0,8 g pour 10 ml d'eau
 eau distillée	 Balance électronique (sensibilité au dg)	 pailles
 Eprouvette ou	 Flacon doseur	 Cure-dent ou pique en bois
 Seringues ou	 micropipettes ou	 petits flacons de sérum physiologique vides
 Boîtes de pétri ou	 bouchons de bouteilles de lait ou	 petits pots de verre (type crèmes « dessert »)

2-1 Exemple du matériel proposé aux étudiants



- ❖ **Préparer une solution de soude à 0,4 g pour 10 ml** d'eau distillée (simulation du sérum qui va réagir). (prête d'avance pour les étudiants)

Remarque : L'utilisation par les étudiants de soude doit être soumise à précaution : le rappel des règles de sécurité à adopter lors de manipulations s'impose.

- ❖ **Préparer une solution de sulfate de zinc à 0,8 g pour 10 ml** d'eau distillée (ou 0,6g pour 10ml) (simulation des antigènes de micro-organismes) (prête d'avance aussi). Si la solution de $ZnSO_4$ est un peu blanchâtre, la laisser reposer et n'utiliser que le mélange limpide.

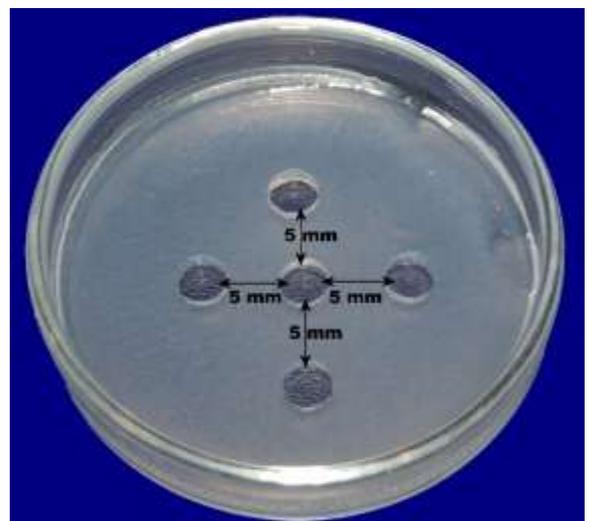
- ❖ **Préparer un gel d'Agar** à couler dans une boîte de Pétri pour test d'Ouchterlony. Peser 1,5 g d'agar-agar et le verser dans 100 ml d'eau distillée froide. (On réalise environ 15 boîtes) (vous pouvez minimiser la quantité selon tes besoins).

Faire chauffer doucement en remuant bien tout le temps jusqu'à apparition de bulles mais ne pas faire bouillir (le mélange devient limpide). Couler ensuite l'agar-agar chaud sur une hauteur de 3 mm environ dans les bouchons, petits pots ou les boîtes de Pétri. Laisser refroidir jusqu'à la prise de l'agar-agar. (Les puits s'évident mieux si on passe les boîtes, quelques minutes, au réfrigérateur avant leur utilisation).

4. Préparation du test d'Ouchterlony

1. Réaliser des puits à l'aide de la paille

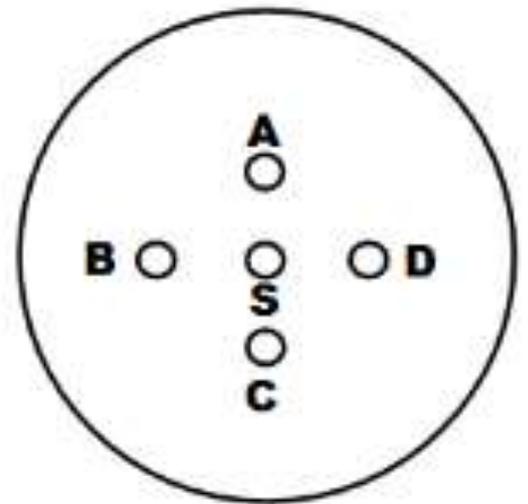
- Il faut réaliser un puits central et répartir 4 puits tout autour. Les puits sont équidistants d'environ 5 mm.
- Appliquer l'embout de la paille dans le fond de la boîte et tourner doucement. Le morceau de gélose peut rester dans la paille ou pas. (Essuyer la paille entre chaque puits). On évacue alors le puits avec un cure-dent ou en retournant la boîte et en la tapant d'un coup sec sur la paillasse.



- Il est possible de proposer un gabarit de perçage que les élèves placent sous la boîte de pétri.
- Ce gabarit présente un double intérêt :

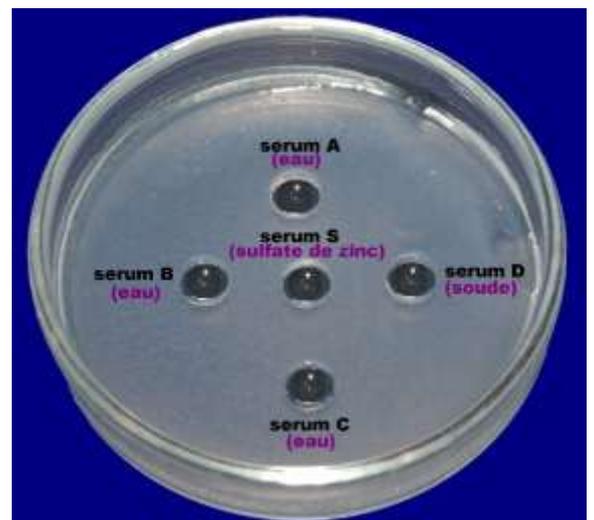
- assurer l'équidistance des puits (une distance entre deux puits supérieure à 5 mm augmenterait le temps de diffusion des solutions jusqu'à leur contact).

- permettre l'identification des sérums placés dans les puits par transparence en s'affranchissant du marquage au crayon sur la boîte .



2. Réalisation des dépôts

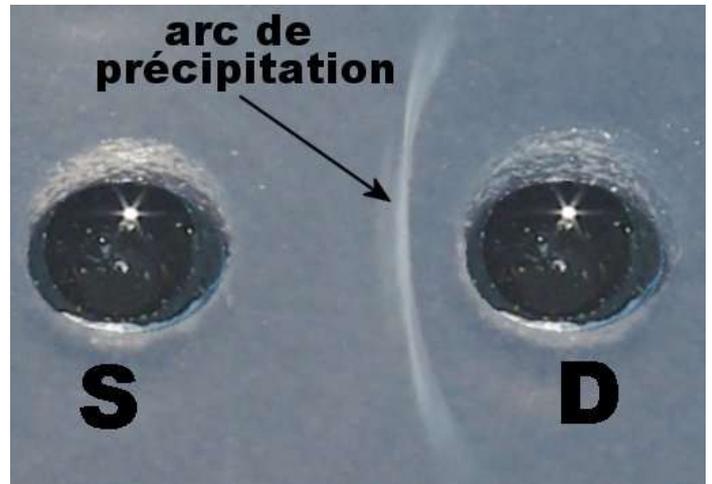
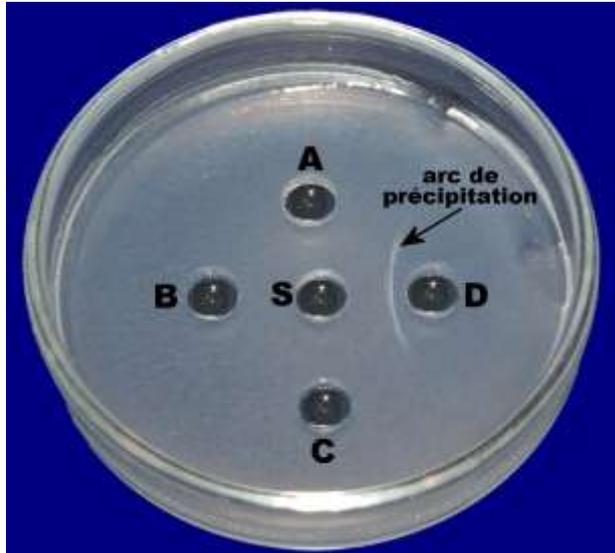
- Si le gabarit de perçage n'est pas utilisé, marquer sur les bords de la boîte de Pétri à l'aide d'un marqueur, la disposition des produits à déposer dans les puits permettant de révéler la réaction de l'anticorps étudié avec les différents antigènes proposés.
- En utilisant les micropipettes des petits flacons, placer dans les puits périphériques 1 goutte des différentes solutions de sérums A, B, C et D



- Mettre dans le puits central, la solution S
- **Remarque :** ne pas faire déborder, ne pas laisser de bulles, ni endommager le gel d'agar-agar.
- Fermer la boîte.

5. Observation des résultats

L'observation des résultats s'effectue sur fond noir et en éclairage rasant.
Ils apparaissent au bout de 15 à 20 minutes



L'apparition d'un arc entre les puits (arc de précipitation) indique la présence des interactions entre un ou plusieurs anticorps (s'il y a plus d'un arc dans la même boîte de pétri) et les antigènes spécifiques.

Dans ce cas-là, l'arc de précipitation apparaît entre les puits S et D. Le sérum D contient des anticorps ayant réagi avec les antigènes du méningocoque. La personne recherchée est donc l'individu auquel appartient le sérum D.