

Kit Ouchterlony

Réf. IMVS-IMVD

A RECEPTION DU COLIS :

- ☑ **Vérifier la composition** du colis
- ☑ **Stocker** les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - Ouvrir le carton
 - Placer le sachet noté H ou J au réfrigérateur à **+ 4 °C**
 - Garder les autres sachets et le matériel à température ambiante

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit de 6 mois.

- ☑ **Avant toute manipulation, étudier la fiche sécurité**

COMPOSITION DU COLIS :

VERSION SIMPLE : Pour 2 groupes de 20 élèves travaillant en binôme :

- 2 sachets contenant chacun 15 boîtes de pétri stériles de diamètre 55 mm
- 1 notice
- 10 emporte-pièces en verre de 4 mm de diamètre
- 1 poire stérile de 1 ml graduée pour répartir l'eau dans les sérums
- 14 poires de 1 ml à goutte calibrée à 20 µl pour les dépôts des sérums
- 1 flacon en plastique vide de 250 ml
- 1 sachet noté G contenant 3 petits sachets :
 - ◆ 1 sachet noté « agarose » contenant 1g d'agarose
 - ◆ 1 sachet noté « acide pour tampon phosphate » contenant 0,9 g de NaH₂PO₄, 2 H₂O
 - ◆ 1 sachet noté « base pour tampon phosphate » contenant 2,16 g de Na₂HPO₄, 12 H₂O
- 1 sachet noté H à conserver **+ 4°C** de 11 tubes :
 - 2 tubes de 10 mL d'eau distillée stérile
 - 1 microtube à bouchon rouge contenant 0,5 mg de sérum de lapin anti-BSA lyophilisé (Anticorps)
 - 1 microtube à bouchon naturel contenant 20 mg de sérum de bœuf lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon bleu contenant 20 mg de sérum de cheval lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon naturel avec pastille rose contenant 20 mg de sérum de chèvre lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon vert contenant 20 mg de sérum de porc lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon jaune contenant 20 mg de sérum de lapin lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon naturel avec pastille grise contenant 1 mg de sérum d'albumine de sérum de cheval lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon mauve contenant 1 mg de lactalbumine lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon blanc contenant 1 mg d'albumine de sérum de boeuf (BSA) lyophilisé

VERSION DOUBLE : pour 4 groupes de 20 élèves travaillant en binôme :

- 3 sachets contenant chacun 15 boîtes de pétri stériles de diamètre 55mm
- 1 notice
- 10 emporte-pièces en verre de 4 mm de diamètre
- 1 poire stérile de 1 ml graduée pour répartir l'eau dans les sérums
- 28 poires de 1 ml à goutte calibrée à 20 µl pour les dépôts des sérums

- 1 flacon en plastique vide de 250 ml
- 1 sachet noté I contenant 6 petits sachets :
 - ♦ 2 sachets notés « agarose » contenant 1g d'agarose
 - ♦ 2 sachets notés « acide pour tampon phosphate » contenant 0,9g de NaH_2PO_4 , 2 H_2O
 - ♦ 2 sachets notés « base pour tampon phosphate » contenant 2,16 g de Na_2HPO_4 , 12 H_2O
- 1 sachet noté J à conserver **+ 4°C** de 12 tubes :
 - 3 tubes de 10 mL d'eau distillée stérile
 - 1 microtube à bouchon rouge contenant 1 mg de sérum de lapin anti-BSA lyophilisé (Anticorps)
 - 1 microtube à bouchon naturel contenant 40 mg de sérum de bœuf lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon bleu contenant 40 mg de sérum de cheval lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon naturel avec pastille rose contenant 40 mg de sérum de chèvre lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon vert contenant 40 mg de sérum de porc lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon jaune contenant 40 mg de sérum de lapin lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon naturel avec pastille grise contenant 2 mg de sérum d'albumine de sérum de cheval lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon mauve contenant 2 mg de lactalbumine lyophilisé
 - 1 microtube à bouchon blanc contenant 2 mg d'albumine de sérum de boeuf (BSA) lyophilisé

MATERIEL NECESSAIRE :

- Pipettes de 5 ml
- Poire à pipeter ou pipump
- Eprouvette de 150 ml ou de 125 ml pour la version simple ou de 250 ml pour la version double du kit
- Flacon de 250 ml
- Eau distillée
- Gant anti-chaleur ou manique de préhension
- Feutres permanents
- Micro-ondes ou éventuellement bain-marie

MATERIEL CONSEILLE :

Portoir à microtubes

FICHE PREPARATEUR

A. Préparation de la gélose

1) Préparation du tampon phosphate : solubiliser dans de l'eau le contenu des sachets notés « acide pour tampon phosphate » et « base pour tampon phosphate » stockés dans le sachet C dans le sur-sachet noté A conservé à température ambiante (possibilité de réaliser cette étape quelques jours à l'avance et de conserver le produit à 4°C pendant 2 semaines)

a. Transvaser les poudres :

Verser, dans un flacon de 250 ml, le contenu des sachets notés « acide pour tampon phosphate » et « base pour tampon phosphate » stockés dans le sachet noté G ou I conservé à température ambiante (1 sachet de chaque dans la version simple ou 2 sachets de chaque dans la version double)

→**NB** : il n'est pas nécessaire de récupérer les traces de poudre restant dans les sachets. En effet, la constitution d'un tampon ne nécessite pas une précision aussi importante.

b. Dissoudre les poudres :

Dans la version simple du kit, ajouter 150 ml d'eau déminéralisée
Dans la version double du kit, ajouter 250 ml d'eau déminéralisée

c. Mélanger :

On obtient une solution limpide de tampon phosphate à 0,05 M de pH 8,6 (possibilité de réaliser cette étape quelques jours avant le TP et conserver 24 heures à 4°C ou 4 semaines à -20°C)

2) Ajout de l'agarose : dissoudre l'agarose dans le tampon phosphate préparé au point 1. Conserver au réfrigérateur à **+4°C** sans excéder une durée de 2 semaines

a. Transvaser les poudres :

Transvaser, dans un flacon de 250 ml, le contenu du sachet noté « agarose » contenu dans le sachet noté G ou I laissé à **température ambiante**

→**NB** : Si vous disposez d'un micro onde, utilisez le flacon en plastique de 250 ml fourni pour faire la dilution. Si vous n'avez qu'un bain-marie, utilisez un flacon en verre de 250 ml

b. Dissoudre les poudres :

Dans la version simple du kit, ajouter 150 ml de tampon phosphate préparé au point 1
Dans la version double du kit, ajouter 250 ml de tampon phosphate préparé au point 1

c. Solubiliser les poudres :

Mélanger

• Avec un micro-ondes :

Utiliser le micro-ondes pour faire chauffer le flacon de plastique contenant le mélange poudre-eau sans son bouchon
Surveiller régulièrement et remuer
Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement translucide sans aucune suspension (à peu près quand l'ébullition commence)

⚠ **ATTENTION** ⚠ : le mélange obtenu est très chaud, utilisez des gants anti-chaueur ou des maniques.

• Avec un bain-marie : (prévoir 1 ou 2 heures par sécurité)

Mettre au bain-marie le flacon de verre contenant le mélange poudre-eau avec le bouchon dévissé
Surveiller régulièrement et remuer
Arrêter de chauffer quand le mélange devient parfaitement translucide sans aucune suspension (à peu près 20 minutes si le bain-marie est proche de l'ébullition ou plus longtemps si le bain-marie est à une température inférieure)

⚠ **ATTENTION** ⚠ : le mélange obtenu est très chaud, utilisez des gants anti-chaueur ou des maniques.

→**NB** : Les volumes tiennent compte de l'évaporation et sont prévus de manière à avoir assez de gélose pour couler les boîtes.

B. Coulage des boîtes avec la gélose chaude

(possibilité de réaliser cette étape quelques jours à l'avance et de conserver les boîtes coulées à **4°C** dans une enceinte humide pendant 2 à 3 jours)

Prélever la gélose chaude avec une pipette de 5 ml et couler 4 ml dans chacun boîte.

⚠ **ATTENTION** ⚠ : la gélose se solidifie vers 40-45°C. Il ne faut pas trop attendre avant de la couler. Si elle n'est plus assez liquide, on peut la refondre de la même façon que précédemment (chauffer jusqu'à ce qu'elle soit translucide)

→ **NB** : il est possible de couler les 30 boîtes avec la version simple et les 45 boîtes de la version double.

Agiter la boîte pour répartir la gélose et mettre le couvercle sur la boîte encore chaude

Laisser refroidir sur une paillasse plane pendant 30 minutes

Les boîtes sont utilisables aussitôt mais elles sont conservables à **4°C** pendant 5 à 7 jours dans une enceinte humide car la gélose est très fine (1,2 mm) et se déshydrate très vite.

C. Préparation des sérums :

Hydrater les sérums lyophilisés (possibilité de faire cette étape quelques jours avant le TP et de conserver les sérums reconstitués 10 jours à -20°C)

a. Réhydratation :

☞ Pour la version simple : Rajouter 1 ml d'eau stérile à la pipette ou avec la grosse poire compte-gouttes fournie (4 graduations) dans chacun des 9 microtubes du sachet B stocké au congélateur

☞ Pour la version double : Rajouter 1,75 ml d'eau stérile à la pipette ou avec la grosse poire compte-gouttes fournie (7 graduations) dans chacun des 9 microtubes du sachet B stocké au congélateur

b. Remise en suspension :

Tapoter les microtubes du doigt : la mise en suspension est quasi instantanée

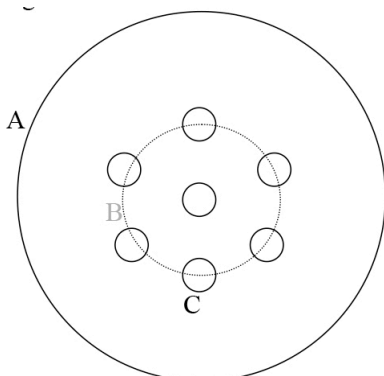
⚠ **ATTENTION** ⚠ : Ne pas agiter fortement car une protéine qui mousse au contact de l'air est détruite.

Conserver à **+4°C** pendant 1 journée ou à **-20°C** sans dépasser 2 semaines. Plus les sérums ont été préparés longtemps en avance et moins les résultats seront satisfaisants.

→ **NB** : les quantités d'eau pour remettre les sérums déshydratés en suspension sont approximatives. Il n'est pas nécessaire d'avoir une micropipette.

D. Préparation de la salle :

Photocopier le modèle ci-dessous ou dessiner un modèle de réalisation des puits dans les boîtes de gélose en suivant les instructions ci-dessous :



Tracer un cercle A de 5,5 cm de diamètre (2,25 cm de rayon)
Tracer un cercle de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) au centre du cercle A
Tracer au crayon un cercle B de 2 cm de diamètre (1 cm de rayon) au centre du cercle A
Tracer un cercle C de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B
Tracer un cercle de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B et à 1 cm du centre du cercle C
Tracer 4 autres cercles de 0,4 cm de diamètre (0,2 cm de rayon) dont le centre est situé sur le cercle B et à 1 cm du centre précédemment tracé

ATTENTION : respecter ces consignes pour tracer le modèle de réalisation des puits car les distances sont étudiées pour fournir de bons résultats.

Disposer pour chaque binôme une boîte de gélose, un emporte pièce passé à l'alcool et un modèle (photocopie du modèle original) pour faire les puits

Préparer les poires de dépôt : il faut une poire par microtubes de sérums. Il faut veiller à ce que les poires ne soient pas mélangées par les élèves.

→ **Conseil** : coller sur les poires des gommettes de couleur correspondante au bouchon des tubes ou bien annoter les poires avec un marqueur permanent.

E. Après la manipulation des élèves :

Laisser les boîtes 24h à **26°C** ou 36h à **température ambiante**

Les arcs apparaissent

Placer les boîtes au réfrigérateur dans une enceinte humide pour éviter la déshydratation (enceinte fermée avec un papier absorbant humidifié)

Les arcs se conservent au moins une semaine

PRINCIPE ET INTERET PEDAGOGIQUE:

Le but de ce kit est de mettre en évidence la spécificité de la réponse immunitaire.

Pour cela, il a été injecté à un lapin de l'albumine bovine (BSA). Trois semaines plus tard, son sérum est prélevé. Sa potentialité à posséder les anticorps anti-albumine bovine et la spécificité de ceux-ci sont testés par la méthode de double diffusion d'OUTCHTERLONY (ODD).

Ce test est basé sur 2 principes :

- la diffusion des molécules dans la gélose à partir de chacun des puits.

La vitesse de diffusion dépend de la taille des molécules et de leur diversité dans chaque puits. Ce test requière une double diffusion : la diffusion de l'anticorps et la diffusion de l'antigène

- la reconnaissance spécifique anticorps antigène et la formation d'un complexe visible à l'oeil nu

FICHE DE MANIPULATION PAR LES BINOMES :

Chaque binôme dispose d'une boîte de gélose, d'un modèle de réalisation des puits et d'un emporte-pièce passé à l'alcool.

ATTENTION : le milieu ne contient pas d'anti-bactérien ni d'antifongique.

Il est donc préférable de travailler le plus proprement possible pour éviter d'éventuelles contaminations pour ne pas détériorer les anticorps.

Cependant le travail en conditions stériles n'est pas indispensable.

1) Réalisation des puits dans la boîte de gélose.

Poser le modèle pour faire les puits sous la boîte de gélose (couvercle vers le haut)

Ouvrir la boîte

Faire un trou en perçant la gélose de part en part au centre de la boîte avec l'emporte-pièce, puis 6 trous autour du trou central en suivant le modèle visible sous la boîte.

⚠ **ATTENTION** ⚠ : bien respecter le modèle fourni : les distances choisies optimisent les résultats.

🔧 **Conseils** : Le disque de gélose formé par l'emporte-pièce est enlevé soit en restant dans le tube (collé au disque précédent, le plus dur étant de faire rentrer le premier), soit en se servant du tube comme d'une pelle pour pousser le disque hors du trou sur les côtés de la boîte.

⚠ **ATTENTION** ⚠ : ne pas fendre la gélose. La classe dispose de quelques boîtes supplémentaires pour l'entraînement ou pour remplacer les géloses fendues

2) Dépôts des sérums

Déposer, dans le puits central, 20 μ l (une goutte de la poire calibrée) d'anticorps contenu dans le microtube à bouchon rouge, sans faire de bulle

Déposer 20 μ l (une goutte de la poire calibrée) des 6 antigènes de votre choix dans les puits périphériques, sans faire de bulle

Donner une orientation à la boîte en faisant un trait au stylo permanent sur la boîte au niveau d'un puits

Repérer sur un dessin le plan des dépôts de sérums

⚠ **ATTENTION** ⚠ : ne pas mélanger les poires pour prélever les sérums ; chaque micro-tube a sa poire attitrée.

🔧 **Conseil** : définir en classe entière les dépôts que chaque binôme réalise pour avoir tous les cas de figure possibles

3) Obtention des résultats

Placer les boîtes à température constante (entre 20 et 26 °C) pendant 24 à 36h

Une fois les résultats obtenus, installer les boîtes dans une enceinte humidificatrice (papier absorbant humide dans une enceinte fermée) au réfrigérateur

⚠ **ATTENTION** ⚠ : les puits doivent être secs en quelques heures pour que la diffusion se fasse normalement

4) Lecture des résultats

Au bout de 24 heures, un arc blanc apparaît entre certains puits

Ces arcs sont toujours visibles une semaine plus tard.

Pour bien les observer, regarder au travers de la boîte, sur fond noir et avec une illumination oblique

Tableau récapitulatif du contenu des microtubes de sérums :

Bouchon du microtube	Sérum du microtube	Bouchon du microtube	Sérum du microtube
Rouge	De lapin anti-BSA	Naturel à pastille rose	De chèvre
Naturel	De boeuf	Bleu	De cheval
Mauve	De lactalbumine	Jaune	De lapin
Naturel avec pastille grise	D'albumine de sérum de cheval	Blanc	D'albumine de sérum de bœuf (BSA)
Vert	De porc		

INTERPRETATIONS ET CONCLUSIONS

Au bout de 24 heures un arc blanc apparaît entre les puits BSA, sérum de boeuf, et le puits central. Lorsqu'on injecte de la BSA au lapin, celui-ci produit bien des anticorps pour se défendre. Ces anticorps contenus dans le sérum sont spécifiques de la BSA et seulement de celle-ci. Ils ne forment pas de complexe avec l'albumine des autres animaux. Par contre, un arc de précipitation apparaît entre ces anticorps contenus dans le sérum de lapin immunisé et l'albumine bovine (BSA) contenue dans le sérum de boeuf.

FICHE SECURITE

Les sérums et anticorps ne sont pas dangereux mais il ne faut pas les ingérer. En cas d'ingestion, il faut faire beaucoup boire la personne. La gélose chaude peut provoquer des brûlures. Veiller à la manipuler avec une protection des mains contre la chaleur et faire attention à ne pas en renverser sur soi.

FICHE CONSERVATION

Le matériel est conservé à **température ambiante**. Le **sachet noté G ou I** contenant lui-même 3 petits sachets dans la version simple et 6 petits sachets dans la version double :

- ♦ petit(s) sachet(s) noté(s) « Agarose » contenant 1g d'agarose **température ambiante**
- ♦ petit(s) sachet(s) noté(s) « acide pour tampon phosphate » contenant 0,9 g de NaH₂PO₄, 2 H₂O **température ambiante**
- ♦ petit(s) sachet(s) noté(s) « base pour tampon phosphate » contenant 2,16 g de Na₂HPO₄, 12 H₂O **température ambiante**

Les poudres des petits sachets du sachet G ou I peuvent se conserver 6 mois à température ambiante à l'abri de l'humidité. Le tampon reconstitué avec les poudres « acide et base pour tampon phosphate » se conserve 1 à 2 semaines à 4°C. L'agarose dissout dans le tampon phosphate ne se conserve pas : il faut couler cet agarose assez rapidement dans les boîtes de pétri. Les boîtes de pétri contenant la gélose se conservent à 4°C dans une atmosphère légèrement humide pendant 5 à 7 jours.

Le sachet H ou J est conservé à **+4°C** et contient 11 tubes dans la version simple et 12 tubes dans la version double :

- ♦ 2 tubes dans la version simple et 3 tubes dans la version double de 10 ml d'eau distillée stérile
- ♦ 1 microtube à bouchon rouge contenant du sérum de lapin anti-BSA lyophilisé (Anticorps) **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon naturel contenant du sérum de bœuf lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon bleu contenant du sérum de cheval lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon naturel à pastille rose contenant du sérum de chèvre lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon vert contenant du sérum de porc lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon jaune contenant du sérum de lapin lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon naturel à pastille grise contenant du sérum d'albumine de sérum de cheval lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon mauve contenant du lactoglobuline lyophilisé **+4°C**
- ♦ 1 microtube à bouchon blanc contenant de l'albumine de sérum de boeuf (BSA) lyophilisé **+4°C**

Les sérums lyophilisés peuvent se conserver **6 mois à +4°C** à l'abri de l'humidité.

Les sérums reconstitués peuvent se conserver **2 semaines à - 20°C**.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les sérums peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

La gélose des boîtes doit être décontaminée des éventuels champignons ou bactéries avec de la javel ou de l'eau oxygénée puis jetée à la poubelle.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

Les boîtes de pétri ayant contenu la gélose sont éventuellement réutilisables ainsi que les emporte-pièce.