

# Technique d'immunoprécipitation : exemple de la technique d'Ouchterlony

Objectifs:

- initiation aux techniques d'immunoprécipitation
- démontrer l'importance à définir les concentrations optimales du système Ac/Ag pour une réaction d'immunoprécipitation
- mettre en évidence les limites de sensibilité de la technique d'Ouchterlony

## **1. Principe des techniques de précipitation**

Une réaction de précipitation est une réaction mettant en jeu des antigènes solubles et des anticorps spécifiques. La formation du complexe immun aboutit à la formation d'un édifice multimoléculaire qui peut dans certaines conditions précipiter en solution.

Les antigènes mis en jeu sont le plus souvent de nature protéique et ces réactions peuvent s'observer soit en milieu liquide, soit en milieu solide gélifié.

En fonction de la technique utilisée, on distingue des réactions d'immunoprécipitation par diffusion simple, par diffusion double ou par diffusion accélérée dans un champ électrique.

## **2. Exemple d'une technique d'immunoprécipitation: la technique d'Ouchterlony appliquée à l'étude de solution complexe**

### *2.1. Principe de la technique*

Principe: immunoprécipitation par double diffusion: voir cours

Objectifs de la technique d'Ouchterlony : analyser la composition antigénique de solutions.

### *2.2. Protocole*

#### a) Préparation du gel

Glaçage des supports:

A partir d'une solution à 0,3% d'agarose (150 mg pour 50 ml d'eau distillée préparés à ébullition), passer à l'aide d'un pinceau une fine couche de ce mélange au fond de petites boîtes de pétri (ou sur des lames de microscope) et laisser sécher en position inclinée.

Préparation de l'agarose

- A partir du tube de 2 mL contenant de l'agarose à 2% et préchauffé à 56°C, ajouter 2 mL de PBS préchauffé à 56°C
- Mélanger doucement tout en maintenant la température de 56°C

Coulage sur support glacé

- Couler l'agarose dans les petites boîtes de Pétri
- Laisser prendre le gel pendant 1/2 heure à 4°C

Réalisation des puits:

- Réaliser 6 puits de 2,5 mm de diamètre à l'emporte pièce (attention à l'aspiration à ne pas fendre le gel ce qui risque de gêner la diffusion) et un puits central selon le modèle donné

#### b) Réalisations des dépôts et diffusion

à l'aide d'une micropipette, déposer sans faire de bulles et sans débordement:

- 10µl d'antisérum humain total dans le puits central
- 10µl d'échantillon dans les puits périphériques; sont à disposition:
  - SAH étalon à 10g/L que l'on pourra diluer au 1/2 et au 1/4
  - SAB à 10g/L
  - SAB à 20g/L
  - Ovalbumine
  - Sérum humain total
- placer les gels en chambre humide (papier filtre imprégné d'eau placé dans le couvercle de la boîte)

- laisser diffuser 24 h ou plus à température ambiante
- lire sur fond noir avec illumination oblique après un court lavage dans de l'eau physiologique (accessoire)

### **3. Compte rendu**

- Présentation générale : titre, date...
- Technique utilisée : principe, objectifs
- Matériels et méthodes : particularités des réactifs, dilutions et diluants, contrôles et leur rôle, problèmes techniques rencontrés et résolus, présentation des tests effectués.....
- Résultats expérimentaux : description, interprétation, conclusions, comparaisons, déterminations de conditions expérimentales optimales, conformités aux attentes...
- Conclusion - discussion sur la technique, le(s) résultat(s) obtenu(s).....