

Rodrigue Jeanne  
Pierre-Alain Mannoni

# TP d'Immunodiffusion

Du 11/10/2001

Licence de Biologie  
Groupe du jeudi matin

Note

/20

# I Préparation des solutions

## I.1 Solution de BSA pour la méthode de Mancini

### I.1.1) Préparation de la solution mère :

On part d'une solution stock de BSA à 10 mg/ml que l'on diluera au 1/10. Ce qui nous fera aboutir à une solution mère à 1 mg/ml. Pour cela on prend 1ml de la solution stock et on rajoute 9ml de solution tampon (PBS).

### I.1.2) Préparation des solutions filles :

A partir de cette solution mère on fera plusieurs dilutions afin d'obtenir les différentes solutions filles aux concentrations voulues et de volume de 500 µl.

Prenons l'exemple de la solution fille à 650 µg/ml=0,65 µg/µl.

On sait que la solution mère est de 1 mg/ml=1 µg/µl.

A l'équivalence on a la relation :  $C(\text{mère}) * V(\text{mère}) = C(\text{fille}) * V(\text{fille})$  d'où :

$$V(\text{mère}) = (C(\text{fille}) * V(\text{fille})) / C(\text{mère})$$

$$V(\text{mère}) = (0,65 * 500) / 1 = 325 \mu\text{l}.$$

Connaissant la quantité de volume de solution mère qu'il faut, pour avoir une concentration de 650 µg/ml, il nous suffit que d'ajuster à 500 µl en rajoutant 175 µl de tampon. Tous les calculs et les manipulations pour les autres solutions filles se feront de la même manière et en rajoutant bien sûr la quantité de tampon correspondant. Le tableau suivant montre les volumes des solutions utilisées pour la préparation des solutions filles.

Concentration des solutions filles en µg/ml	Volume de solution mère prélevé en µl	Volume de tampon phosphate en µl
1000	500	0
860	430	70
700	350	150
650	325	175
440	220	280
120	60	440

## *I.2 Solution de BSA et de sérum bovin total pour la méthode d'Ouchterlony*

### *I.2.1 Préparation des solutions filles de BSA non indiqué précédemment :*

Elle se fera de la même façon que lors des premières manipulations :

- En B5 (BSA à 250 µg/ml) :  $V_{\text{solution mère}} = (0,25 * 500) / 1 = 125 \mu\text{l}$  car on sait que :  
$$(V(\text{mère}) = C(\text{fille}) * V(\text{fille})) / C(\text{mère})$$
- Pour les mêmes raisons on aura en C3 (BSA à 200 µg/ml) :  $V(\text{mère}) = (500 * 0,2) / 1 = 100 \mu\text{l}$

### *I.2.2 Préparation de sérum bovin total dilué :*

- En A3(dilution au 1/100) : Le volume total est de 100 µl : on prélève 1 µl de sérum bovin total et 99 µl de la solution tampon PBS. Puis on homogénéise grâce au vortex.
- En C2(dilution au 1/600) : On prélève 1 µl de la solution précédemment diluée (A3) et on réalise une dilution au 1/6. On ajoute 1 µl de la solution A3 et on rajoute 5 µl de solution tampon.

## **II Principe de L'immunodiffusion.**

Avant de passer à l'interprétation des résultats, il serait bon de toucher quelques mots sur tous ces expériences. La méthode de Mancini et d'Ouchterlony sont des expériences d'immunodiffusion. L'immunodiffusion consiste à la diffusion de molécule soluble, antigènes-anticorps, dans un gel d'agar, puis à la détection de ces molécules. En effet l'antigène et l'anticorps vont diffuser et atteindre une zone d'équivalence. Celle ci, se caractérise par la formation d'un réseau dans un rapport déterminé, entre le nombre de molécule d'anticorps et d'antigènes. Le complexe Antigène- anticorps forme un précipité visible que l'on peut colorer avec du bleu de Coomassie ( Colorant pour protéine.)

# Résultats et interprétation

## Technique d'Ouchterlony

### Zone B

**Lecture 1** : La zone d'équivalence est visible entre le puits B0 (Ac) et les puits B1 à B6 (Ag en concentration variable).

**Interprétation** : Le précipité est le signe d'une réaction Ag/Ac.

L'Ag comme l'Ac a diffusé dans le gel d'Agar. Lorsque les 2 réactifs sont à un niveau de concentration qui permet l'agglutination Ag/Ac, un précipité se forme. Le fait que ce précipité soit présent entre B0 et les 6 autres puits prouve qu'il y a eu 6 réactions Ag/Ac : B0-B1 B0-B2 B0-B3 B0-B4 B0-B5 B0-B6.

**Lecture 2**: La ligne de précipité tout autour de B0 est continue et ne montre pas de croisements ou bifurcations.

#### **Interprétation**

La ligne est continue car les arcs de précipité ont fusionnés. Ce phénomène est le signe d'une « identité totale ». Les solutions présentes dans les puits B1 à B6 contiennent toutes les mêmes Ag qui ont réagi avec l'Ac du puits B0 (Anti Albumine Bovine) mais a des concentrations différentes. Ainsi cela prouve que la concentration des réactifs n'influe pas sur le phénomène de fusion.

**Lecture 3**: Les distances entre le puit B0 et la zone d'équivalence varie selon la proximité des puits B1 à B6.

#### **Interprétation**

Les arcs fusionnés sont continus et ne forment pas un cercle parfait. La position de la zone d'équivalence dépend des rapports de concentrations des solutions d'Ag et d'Ac. Après diffusion des réactifs il existe un gradient de concentration allant du plus concentré vers le moins concentré en s'éloignant du puits.

Entre B0 et B6 la zone d'équivalence est plus éloigné de B0 que entre B0 et B2 car le même rapport de concentration ( $[Ag]/[Ac]$ ) se trouve a des distances différentes de B0. La concentration d'Ag est plus faible en B6 que en B2, cela explique que la zone d'équivalence entre B0 et B6 se trouve plus proche de B6. Ce phénomène de diffusion en gradient de concentration explique « l'étirement » ou le « décentrage » du pseudo cercle (fusion des arcs de précipité) vers B6.

Ce phénomène est aussi observé et utilisé avec la technique de Mancini.

### Zone C

Il y a présence d'un arc de précipite, fusion des zones d'équivalence entre C1-C2 et C1-C3. Cela témoigne d'une réaction des Ac Anti SBT (C1) avec l'Ag Albumine (C2) et l'Ag SBT (C3). Il y a une projection de la zone d'équivalence qui prolonge au delà du point de fusion le précipité formé

Egalement, en regardant précisément, on voit, proche de la partie de l'arc entre C1 et C2, une deuxième ligne séparée qui fusionne avec l'arc. Malgré une visualisation difficile de cette ligne, elle est le signe d'une identité partielle.

En effet, l'Ac Anti SBT n'est pas mono spécifique, c'est une préparation multimoléculaire (peu ou pas purifiée) qui a été préparé a partir du SBT (multimoléculaire également). Le terme anticorps ne signifie pas forcément anticorps monoclonal. Comme le SBT contient plusieurs molécules antigéniques, l'Ac anti SBT contient les Ac de tous les antigènes du SBT. Cette préparation (Ac anti SBT) contient des Ac monoclonaux qui réagissent avec l'Albumine mais elle contient aussi des Ac capables de réagir avec toutes les autres molécules antigéniques présentes dans le Sérum Bovin Total. Ceci explique donc l'identité partielle de la réaction.

### **Zone A**

La zone d'équivalence ressemble à un arc de précipité avec fusion des zones d'équivalences. Cependant elle présente une discontinuité. Cette discontinuité n'est pas un éperon ou un prolongement ni même une ligne parallèle ou tangente. Elle semble plutôt du a une cassure dans le gel apparu lors du séchage.

Par conséquent, en considérant que la cassure de la zone d'équivalence est un artefact d'expérimentation, la lecture de cette réaction est Identité Totale.

Cela s'explique par le fait que l'Albumine Bovine est présente dans le SBT. Par conséquent l'Ac anti Albumine Bovine reconnaît l'Albumine Bovine en A2 et l'Albumine Bovine du SBT en A3. Si on suppose que il n'y a qu'un type de molécule d'Albumine Bovine alors on peut penser sous réserve que l'Ac Anti Albumine Bovine est un Ac monoclonal.

### **Remarques :**

Il est important d'effectuer une lecture avant de «démouler » et sécher le gel car cette manipulation présente le risque d'abîmer le gel et donc de rendre la lecture difficile, impossible voir même fausse.

Egalement l'absence d'observation préalable d'autres réactions d'Ouchterlony a rendu difficile la lecture des zones d'équivalence. C'est grâce à la conviction de la logique et de la compréhension du phénomène de la réaction Ag/Ac que nous avons pu finalement effectuer une lecture correcte.

# Technique de Mancini

## Résultats :

Concentration en microgramme par ml	Diamètre des disques en Cm	Diamètre des disques au carre (cm <sup>2</sup> )
120	0.40	0.16
440	0.65	0.42
650	0.75	0.56
700	0.85	0.72
860	0.90	0.81
1000	1.00	1.00
Solution B	0.65	0.42
Solution A	0.60	0.36

Selon la droite d'étalonnage :

**[A] = 376 µg/ml**

**[B] = 442 µg/ml**

## Interpretation

L'Ac était présent dans le gel en concentration constante. L'Ag déposé dans les puits en concentration variable s'est diffusé dans le gel selon un gradient de concentration allant du plus concentré dans le puits vers le moins concentré à l'extérieur du puits.

La diffusion en gradient de concentration est un phénomène radial. Il y a précipitation sous la forme d'anneaux du complexe Ag/Ac lorsque les concentrations sont « équivalentes ». Il existe une proportionnalité entre la surface des disques (ou le diamètre au carré des cercles) et la concentration en Ag des solutions. Plus le diamètre des cercles est grand plus la concentration de la solution déposée dans les puits est forte.

Normalement on devrait observer des anneaux de diamètre décroissant du puits 1 au puits 6, car les Ag étant de moins en moins concentrés, donc les zones d'équivalence sont de moins en moins importantes.

Dans notre cas les puits ne sont pas disposés dans un ordre décroissant. Ils sont dans l'ordre suivant :

Sens des aiguilles d'une montre en partant du plus gros anneau :

- 1000µg/ml
- 860 µg/ml
- B
- A
- 650 µg/ml
- 700 µg/ml
- 440 µg/ml
- 120 µg/ml

## Remarque :

Bien que la taille des puits n'influe pas sur la taille des anneaux, il faut qu'elle soit homogène sur tous les puits.

Egalement on peut émettre des réserves sur la manipulation et la dilution des petites quantités ou les bonnes pratiques de laboratoire et la bonne utilisation des pipettes influe sur le résultat.