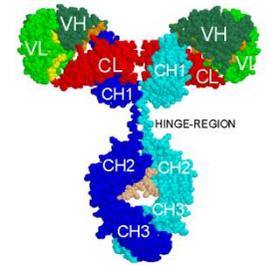
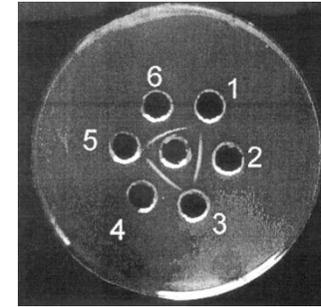


THEME 3A - Le maintien de l'intégrité de l'organisme
TP4 - Les anticorps, des immunoglobulines spécifiques

La production d'anticorps est une des conséquences de la réaction immunitaire acquise (RIA). Ainsi, toute sollicitation du système immunitaire par un **antigène** induit la production **d'anticorps** produits spécialement pour lutter contre cet antigène. On suppose donc que les anticorps produits sont spécifiques d'un antigène. On souhaite donc évaluer le niveau de spécificité des anticorps mais à comment la structure de l'anticorps permet-elle cette spécificité.



Problème posé : Comment déterminer expérimentalement la spécificité des anticorps et quelles sont les bases moléculaires de cette spécificité ?

Ressources :

Poste 1 : La spécificité des anticorps

- fiche protocole du test d'Ouchterlony et matériel nécessaire à sa réalisation

Poste 2 : La structure d'un anticorps et l'origine de la spécificité

- logiciel **Rastop** avec modèles moléculaires « *IGG-TOTAL.pdb* » et « *IGG-LYS.pdb* » et **Anagène** avec séquences « *IGG.edi* » et « *2IGG1ind.edi* »

- Fiches techniques Rastop et Anagène

Propositions d'activités	Capacités
<p>Activité 1 : Mise en évidence expérimentale de la spécificité de la réaction antigène-anticorps</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réalisez le travail du poste 1 afin de montrer la spécificité de l'anticorps anti-BSA ➤ Suivez les étapes classiques de l'épreuve ECE ➤ En fin de manipulation, rangez le matériel utilisé 	<p>Manipuler, suivre un protocole</p>
<p>Activité 2 : Origine moléculaire et génétique de la spécificité la réaction antigène-anticorps</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Réalisez le travail du poste 2 afin de déterminer la structure d'un anticorps et l'origine de sa spécificité ➤ Suivez les étapes classiques de l'épreuve ECE ➤ En fin de manipulation, rangez le matériel utilisé 	<p>Utiliser un logiciel de visualisation moléculaire</p> <p>Utiliser une banque de données</p> <p>Communiquer à l'écrit, communiquer à l'oral</p>
<p>Rangez votre matériel et fermez votre session informatique</p>	<p>Organiser son espace de travail.</p>

POSTE 1 : LA SPECIFICITE DES ANTICORPS**Mise en situation et recherche à mener**

La spécificité d'un anticorps est liée à sa capacité de liaison à un antigène. Cette capacité peut être évaluée par différents tests, dont le test d'Ouchterlony. Dans le monde de l'industrie agro-alimentaire, un anticorps est très utilisé : **l'anticorps anti-BSA** (Bovine Serum Albumine). Il permet en particulier de déterminer la présence de ces protéines dans un produit confectionné et donc de savoir si un individu allergique peut le consommer ou non. Néanmoins, il faut vérifier que cet anticorps est spécifique sinon, il donnera de fausses informations.

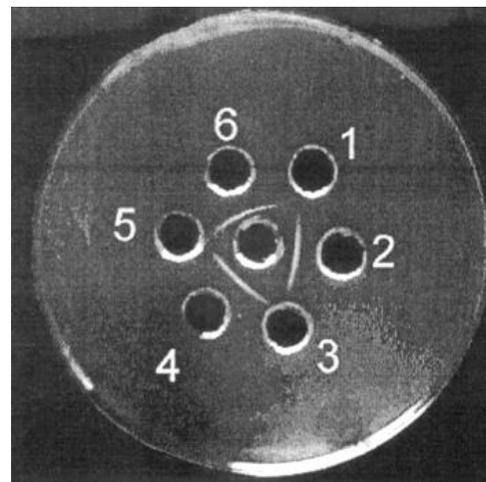
On cherche à savoir si les anticorps dirigés contre l'albumine de sérum de bœuf (BSA) ont une spécificité stricte vis-à-vis de la BSA.

Ressources**Le test d'Ouchterlony :**

Le **test d'Ouchterlony** correspond à un test d'immunodiffusion sur gel d'agarose. Au sein d'un gel, on réalise des puits qui seront remplis avec différentes substances : soit des **antigènes** soit des **anticorps**.

Les solutions déposées vont ensuite diffuser de façon homogène dans toutes les directions autour du puits (invisible à l'œil nu).

Lorsque les auréoles de diffusion se recouvrent, les antigènes et les anticorps peuvent alors interagir entre eux. Si l'anticorps se fixe à l'antigène, il y a alors formation d'un **complexe immun** : c'est un gros complexe formé d'anticorps et d'antigènes liés les uns aux autres. Ce complexe est identifié par la présence d'un **arc de précipitation** : c'est une trace blanchâtre présente entre 2 puits du gel contenant des molécules qui interagissent entre elles.



Exemple de test d'Ouchterlony : les puits 2, 4 et 6 ont réagi avec le puits central.

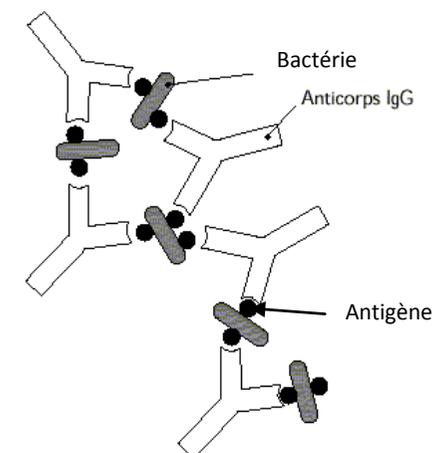


Schéma d'un complexe immun.

Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)

Proposer une stratégie de résolution réaliste permettant de **déterminer** si l'anticorps anti-BSA est spécifique de l'antigène BSA.

Appeler l'examineur pour présenter oralement votre proposition et obtenir la suite du sujet.

Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Mettre en œuvre le protocole de recherche de spécificité d'un anticorps par le test d'Ouchterlony.

Remarque : Si les boîtes sont déjà remplies de gélose, l'étape 1 n'est pas nécessaire.

Appeler l'examineur pour vérifier le résultat et éventuellement obtenir une aide.

Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Sous la forme de votre choix présenter et traiter les données brutes pour qu'elles apportent les informations nécessaires à la résolution du problème.

Répondre sur la fiche-réponse candidat, appeler l'examineur pour vérification de votre production.

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats pour déterminer si l'anticorps anti-BSA est spécifique de la BSA.

Répondre sur la fiche-réponse candidat.

RECHERCHE DE LA SPÉCIFICITÉ D'UN ANTICORPS PAR LE TEST D'OUCHTERLONY
VERSION « PRODUITS DE SUBSTITUTION »

Fiche protocole - candidat

Matériel :

- une plaque chauffante et une balance électronique, un bécher, une éprouvette graduée ou une pipette + propipette pour mesurer 10 mL
- une coupelle, une pince en bois, un flacon d'Agar, un flacon d'eau distillée, une spatule, du papier absorbant, gants, lunettes
- une boîte de Pétri (6 cm de diamètre) ; un tube emporte-pièce et un cure-dent ou une aiguille lancéolée
- un marqueur (pour marquer la boîte de Pétri), un gabarit de perçage, un récipient poubelle
- sérum de lapin (= S) contenant un produit de substitution correspondant aux anticorps anti BSA
- eau distillée (= E) et 4 solutions de produits de substitution correspondant aux albumines extraites de :
 chèvre = O lait de vache = L sérum de bœuf = B sérum de cheval = C
- une micro-pipette avec embouts ou un compte-goutte pour chaque produit, un chronomètre; une lampe de bureau et une petite feuille de papier noir

A chaque étape, en cas d'erreur, vous pouvez utiliser des boîtes de secours pour reprendre votre manipulation là où vous avez fait l'erreur.

Protocole

I-Préparation d'un gel d'agar (= gélose) à couler dans une boîte de Pétri pour test d'Ouchterlony

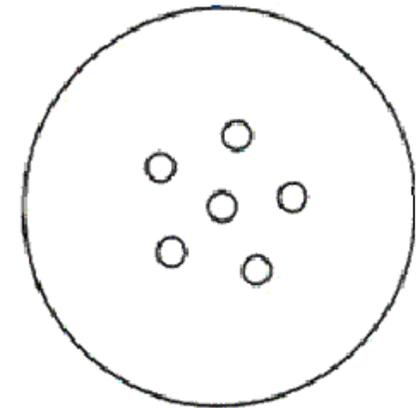
1. **organiser** votre plan de travail pour manipuler proprement et en suivant les consignes de sécurité ;
2. **peser** dans la coupelle 0,2 g d'agar prélevés à l'aide de la spatule ;
3. **verser** 14 mL d'eau distillée puis l'agar dans le bécher et **mélanger** soigneusement l'agar avec la spatule ;
4. **chauffer** le mélange en remuant à la spatule jusqu'à ce que le mélange devienne limpide et **arrêter 20 à 30s après le début de l'ébullition** ;
5. **retirer** à l'aide de la pince en bois, attendre quelques secondes que le bécher refroidisse afin de pouvoir le saisir sans se brûler ;
6. **utiliser** le bécher pour vider environ 1/3 d'agar chaud dans la boîte de Pétri, soit une hauteur d'un 1/2 cm ;
7. **égaliser** le niveau et **supprimer** rapidement les bulles ;
8. **laisser** la boîte refroidir sans mettre le couvercle ;
9. ne pas remuer la boîte avant prise du gel d'agar : au moins 5 mn.

II- Préparation du test

1. **utiliser** le gabarit de perçage ci-contre (ou celui qui vous est fourni) pour **creuser** à l'aide du tube emporte-pièce les puits nécessaires dans le gel d'agar ;
2. **éliminer** les disques de gel avec le cure-dent si nécessaire.

III- Réalisation des dépôts

1. **marquer** sur la boîte de Pétri la disposition des produits à déposer dans les puits permettant de révéler la réaction de l'anticorps étudié avec les différents antigènes proposés. (Utiliser le même ordre que celui que vous avez proposé à la question 2) ;
2. **remplir** les différents puits **sans déborder** : chaque produit devra être prélevé avec un compte goutte propre ou une micropipette à embout propre, puis être déposé dans les puits sans débordement ni bulles et sans endommager le gel d'agar ;
3. **fermer** la boîte ;
4. **observer** les résultats fournis sur fond noir et en éclairage rasant.



Gabarit de perçage
dans le gel d'agar

POSTE 2 : LA STRUCTURE D'UN ANTICORPS**Mise en situation et recherche à mener**

Les anticorps ont la capacité de neutraliser les antigènes selon une réaction spécifique durant laquelle l'anticorps se lie à l'antigène et permet la formation de complexe immun. D'une part, ces complexes empêchent les mouvements et la multiplication des micro-organismes mais ils facilitent également la phagocytose car les phagocytes possèdent des récepteurs qui se lient aux anticorps.

On cherche à identifier la structure d'un anticorps afin de comprendre l'origine de sa fonction.

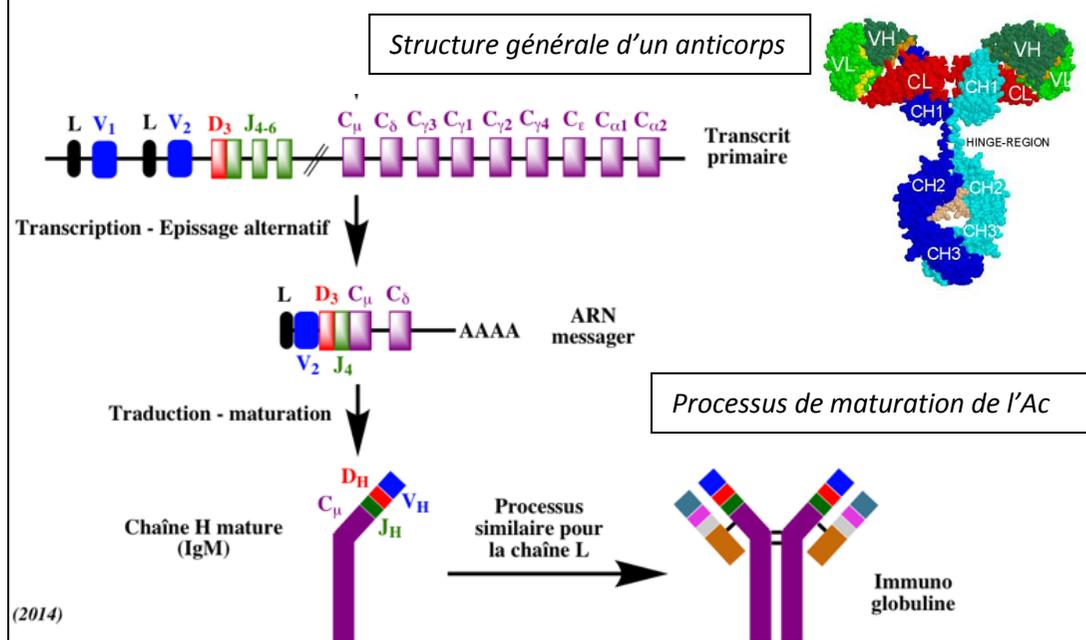
Ressources**Les anticorps :**

Les **anticorps** sont des **immunoglobulines**. Ce sont des protéines synthétisées par les **plasmocytes**, des cellules issues de la différenciation des lymphocytes B (LB).

Chaque LB est spécifique d'un antigène donné et toute sollicitation de ce LB permet sa multiplication puis sa différenciation pour former des anticorps spécifiques de cet antigène (**sélection, amplification et différenciation clonale**). Dans sa structure, l'anticorps possède des zones particulières qui lui permettent de se fixer à l'antigène. Leur forme et leur nombre a une importance dans la réalisation de la fonction.

Les gènes à l'origine de la formation des anticorps :

Les **anticorps** sont des protéines produites suite à la transcription et la traduction de **gènes IGG** (Immunoglobulines G). Les ARNm produits par ces gènes peuvent subir des maturations très nombreuses (**épissage alternatif**) pour permettre la production d'une très grande diversité d'anticorps.

**Etape 1 : Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (durée maximale : 10 minutes)**

Proposer une stratégie de résolution réaliste permettant d'identifier la structure d'un anticorps et de comprendre l'origine de sa spécificité d'action.

Appeler l'examineur pour présenter oralement votre proposition et obtenir la suite du sujet.

Etape 2 : Mettre en œuvre un protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables

Mettre en œuvre le protocole de visualisation de la structure de l'anticorps.

Appeler l'examineur pour vérifier le résultat et éventuellement obtenir une aide.

Etape 3 : Présenter les résultats pour les communiquer

Sous la forme de votre choix présenter et traiter les données brutes pour qu'elles apportent les informations nécessaires à la résolution du problème.

Répondre sur la fiche-réponse candidat, appeler l'examineur pour vérification de votre production.

Etape 4 : Exploiter les résultats obtenus pour répondre au problème

Exploiter les résultats pour de déterminer en quoi la structure de l'anticorps permet sa spécificité vis-à-vis de l'antigène et contribue à la neutralisation de l'antigène.

Répondre sur la fiche-réponse candidat.

Les anticorps ont la capacité de neutraliser les antigènes selon une réaction spécifique durant laquelle l'anticorps se lie à l'antigène.

On cherche à connaître l'organisation de la molécule d'anticorps pour comprendre cette liaison antigène-anticorps.

On dispose pour cela :

- de séquences partielles des 4 chaînes polypeptidiques constituant une molécule d'anticorps
- des 4 chaînes de 2 anticorps différents d'un individu.
- de 2 modèles moléculaires : celui d'une molécule d'anticorps complète et celui d'un fragment de cette molécule d'anticorps liée à un antigène.

Matériel :

- ordinateur avec logiciel ANAGENE et logiciel RASTOP et fiche technique de chaque logiciel
- fichiers ANAGENE
 - « IGG.edi » (séquences polypeptidiques des quatre chaînes d'un anticorps)
 - « 2IGG1ind.edi » (séquences des 4 chaînes de 2 anticorps différents d'un individu) à charger à partir du répertoire Groupe (ts2) > données
- fichiers RASTOP
 - « IGG-LYS.pdb » (fragment d'anticorps lié à l'antigène)
 - « IGG-TOTAL.pdb » (anticorps complet) à charger à partir du répertoire de travail Groupe (ts2) > données

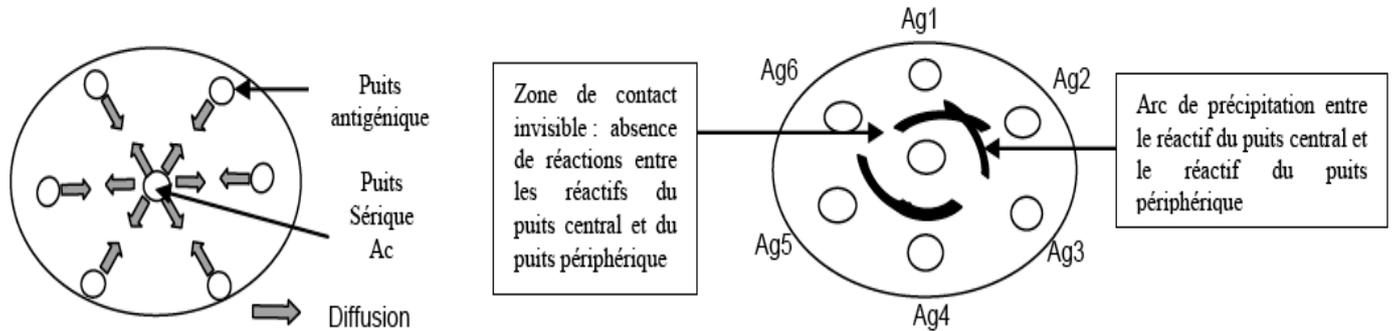
1. **Ouvrir** avec le logiciel RASTOP le fichier « IGG-TOTAL.pdb » à partir du répertoire de travail puis **effectuer un affichage en ruban** des chaînes constituant l'anticorps, les couleurs utilisées (vert, jaune, bleu clair, bleu foncé) devant distinguer ces chaînes.
2. **Afficher** simultanément à l'écran le fichier « IGG-LYS.pdb » en utilisant les mêmes couleurs que précédemment ; l'antigène (appelé « Chain Y ») sera représenté en sphères rouges.
Appeler l'examineur pour vérification
3. **Préciser**, à partir des observations précédentes, dans quelle partie de l'anticorps se fixe l'antigène.
4. **Ouvrir** avec le logiciel ANAGENE les fichiers de molécules « IGG.edi » et « 2IGG1ind.edi » puis **traiter** judicieusement les séquences de façon :
 - à comparer, 2 à 2, les 4 chaînes d'une même immunoglobuline,
 - à comparer, 2 à 2, les 4 chaînes de deux anticorps d'un même individu, dirigés contre deux antigènes différents.

Appeler l'examineur pour vérification

Document 1

Principe de la méthode d'Ouchterlony

C'est l'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. En revanche, elle se traduit par un arc de précipitation visible à l'œil nu lorsque les deux solutions réagissent. Le temps de réaction est de l'ordre de 24h.



Document 2 : structure d'un anticorps

