

TP 6 : Mise en évidence d'une réaction immunitaire adaptative

Après un rapport sexuel non protégé, un jeune homme de 20 ans est diagnostiqué atteint de syphilis. Son frère jumeau, quant à lui, utilise à chaque rapport un préservatif et n'est pas atteint de cette IST. La syphilis est une maladie infectieuse sexuellement transmissible (IST) pouvant aboutir à des lésions viscérales et nerveuses graves. L'agent de la maladie est une bactérie non cultivable in vitro : le Tréponème pâle appelé ainsi car difficile à observer au microscope.

On cherche à mettre en évidence que l'infection par le Tréponème pâle, agent infectieux de la syphilis,

- **est à l'origine de la mise en place d'une réaction immunitaire adaptative,**
- **et à expliquer le principe de son fonctionnement.**

Activités et déroulement des activités

Activité 1 : Mise en évidence de l'existence d'une réaction immunitaire adaptative (différente de la RIA) par des protéines circulant dans le plasma sanguin, les anticorps. (Ac)

1- Concevoir une stratégie pour résoudre une situation problème (10 min)

A l'aide du matériel proposé et de la ressource ci-dessous, proposez un protocole afin de répondre au problème posé

Matériel proposé : sérum du jumeau sain noté S, et sérum du jumeau malade noté M, cuve à électrophorèse

Ressource : en milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent à une distance caractéristique par rapport à la ligne de dépôt, en fonction de leur taille et de leur charge.

2- Mettre en œuvre le protocole de résolution pour obtenir des résultats exploitables.

Réaliser l'électrophorèse à l'aide de la fiche protocole 1 proposée.

Remarques : Pour distinguer les bandes lors de la coloration, on leur attribue des repères en fonction du sérum déposé (une encoche = individu sain S, deux encoches individu atteint M)

3- Présenter les résultats

Pendant le temps de la migration, traitez des bandes déjà numérisées par Mesurim selon la fiche de protocole 2 jointe afin d'obtenir des protéinogrammes. Réalisez des captures d'écran légendées des bandes et des protéinogrammes. Utilisez le document 1 pour les interpréter Attention sens de migration inversé par rapport au photos traitées avec mesurim.

La bande du haut correspond à l'individu sain S et la bande du bas à l'individu malade M.

4- Exploiter les résultats obtenus pour répondre à la première partie de la question.

Activité 2 : Mise en évidence de l'action de ces anticorps à l'aide d'un test de dépistage

Nous allons voir le mode d'action des anticorps à partir du test de dépistage de la brucellose.

La brucellose est une maladie des bovins qui peut être transmises à l'Homme, elle est liée à des bactéries du genre Brucella.

Ce test permet de réaliser rapidement sur un carton le diagnostic de la brucellose à partir d'un sérum : la présence d'amas visibles à l'œil nu permet d'indiquer un test positif, car les Ac présents dans le sérum ont la capacité d'agglutiner les bactéries par reconnaissance des Ag*.

Si la solution reste limpide, pas d'agglutination, le test est négatif.

*Les Ag correspondent à des molécules détectées comme étrangères par le système immunitaire, et provoquent la formation d'Ac spécifiques.

On dispose d'une suspension de bactéries inactivées (Brucella) colorées au rose Bengale, du sérum d'un Homme atteint de brucellose, du sérum d'un homme non atteint de brucellose.

1- Concevoir une manipulation pour montrer le mode d'action des Ac en utilisant le matériel distribué.

2-Après accord du professeur, faire la manipulation.

2- Schématiser les associations moléculaires qui se réalisent dans le mélange entre sérum d'un individu malade et les bactéries. Pour cela, utiliser les modèles fournis dans le document 2 et les compléter si nécessaire.

3- Répondre à la deuxième partie de la question.

Protocole 1 : SEPARATION DE PROTEINES PAR ELECTROPHORESE

Principe

En milieu basique, les protéines sont chargées négativement. Lorsqu'un mélange de protéines est soumis à un champ électrique, les protéines migrent à une distance caractéristique par rapport à la ligne de dépôt, en fonction de leur taille et de leur charge.
Le rouge Ponceau est un colorant spécifique des protéines, ayant une grande affinité pour elles.

Protocole

Mise en place des bandes d'acétate de cellulose dans la cuve :

1. **Remplir** la cuve à électrophorèse au 2/3 avec la solution tampon, de chaque côté, en évitant tout débordement.
Ne jamais toucher la bande avec les doigts, sinon des traces apparaîtront, tenir la bande sur les cotés ou avec une pince
2. **Sortir** une bande de papier filtre imbibée de solution tampon.
3. **Fixer** la bande de papier filtre sur le portoir de la cuve, tendue autant que possible (sans les déchirer bien entendu) et bloquer avec des pinces vous pouvez mettre deux bandes. Les bandes doivent être parallèles entre elles et perpendiculaires à l'axe du portoir pour permettre une migration des protéines dans l'axe du portoir.
4. **Poser** le portoir dans la cuve et **vérifier** que les extrémités de chaque bande trempent dans le tampon de la cuve.

Dépôt du mélange

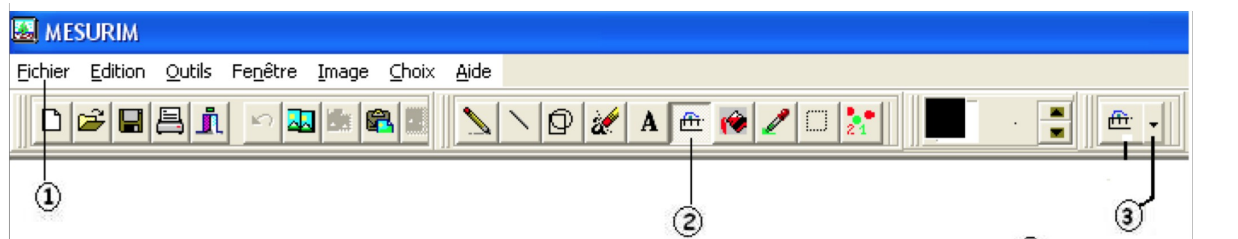
1. **Tremper** l'applicateur dans le mélange, **déposer** rapidement l'applicateur près du bord, du côté de l'encoche et perpendiculaire au grand axe de la bande (faire une application bien nette).

Mise en route de l'électrophorèse

1. **Fermer** la cuve avec le couvercle, côté de la cathode (pôle négatif, borne noire) près du bord avec encoche.
2. **Relier** la cuve au générateur à l'aide du cordon. **Respecter** la correspondance des couleurs entre cordons et douilles.
3. **Régler** la tension de l'alimentation sur 160V.
4. **Raccorder** l'appareil au secteur. **Mettre** sous tension. La migration démarre et durera une demi-heure (minimum).

Protocole 2 : Lecture optique des bandes pour évaluer les concentrations des différentes protéines avec MESURIM

Principe : plus la concentration en protéines est forte dans une portion de bande d'électrophorèse, **plus la coloration est forte**. On peut donc **évaluer** les concentrations des différentes catégories de protéines par mesure optique de la densité de coloration sur la bande. Les bandes de gel d'électrophorèse obtenues dans cette étude ont été numérisées à l'aide d'un scanner et sauvegardées dans un seul fichier image. La densité de couleur des images sera ensuite lue avec les outils du logiciel **Mesurim**.



Lancer MESURIM et ouvrir le fichier, accessible par le menu « *fichier* » 1

Cliquer sur l'icône de mesure 2 puis tracer par cliquer – glisser de gauche à droite une ligne horizontale parcourant l'électrophorèse en son milieu c'est la ligne suivant laquelle la mesure d'absorption de lumière sera faite.

Choisir dans le menu de mesure 3 - Mesure de lumière sur une bande ; une fenêtre de paramétrage apparaît.

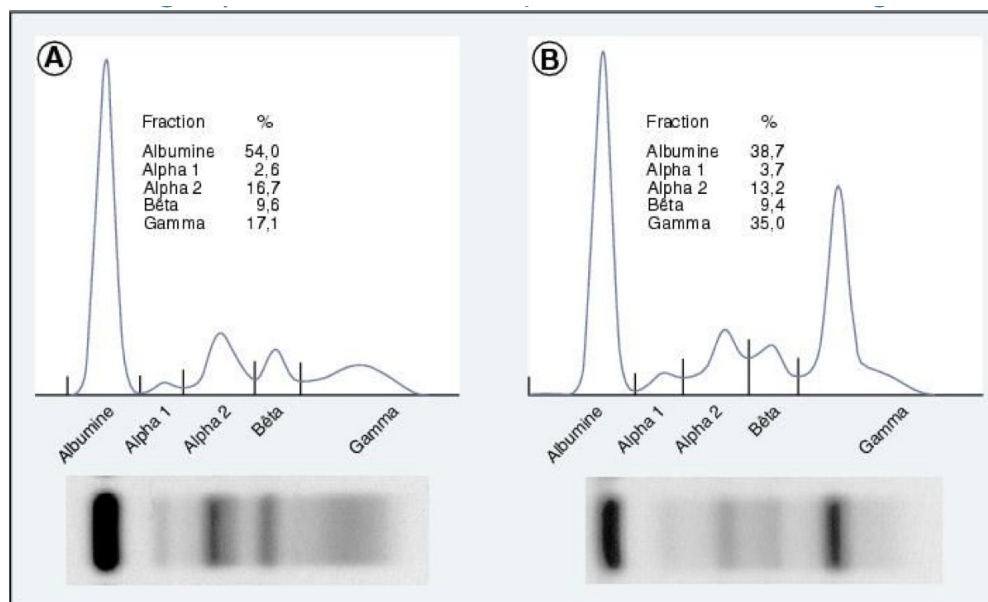
Choisir : « largeur en pixel » : 10

« une mesure en absorption »

« tous » (les canaux de couleurs)

« mesures » linéaires

puis cliquer sur le bouton Mesurer.



Document 1

