

OK

20000949

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DU DEVELOPPEMENT RURAL

INSTITUT SENEGALAIS DE RECHERCHES
AGRICOLAS (I.S.R.A.)

949

DEPARTEMENT DE RECHERCHES SUR LES
PRODUCTIONS ET LA SANTE ANIMALES

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

B.P. - 2057

DAKAR - HANN

COURS SUR LES DIAGNOSTICS DES HEMOPARASITOSE

ANIMALES AVEC INSISTANCE SUR LES

TRYPANOSOMIASES ORGANISE PAR

L'ILRAD DU 1er AU 26 MAL 1989

PAR

MOHMOUDANE MBACKE SEYE

REF. N° 53/PARASITO.

SEPTEMBRE 1989.

PLAN

INTRODUCTION

I- ASPECTS GENERAUX SUR L'IMMUNOLOGIE

I- 1 - L'immunité à médiation cellulaire

I- 2 - L'immunité humorale

I-3 - Les antigènes

I-4 - Les anticorps

I-5 - Le complément

II - PARTIE PRATIQUE

II- 1 - SEPARATION des trypanosomes du sang

II- 2 - Technique de maintenance des trypanosomes au laboratoire

II- 3 - Clonage et stabilisation des trypanosomes

II- 3-1 - Clonage

II- 3-2 - Stabilisation et conservation des trypanosomes
dans l'azote liquide

II- 4 - préparation d'antisérum

II - 5- Immunodiffusion

II- 6 - Immunoélectrophorèse

II- 7 - Isolement et purification des immunoglobulines

II- 7 - 1 - Isolement des globulines

II- 7-2 - Purification des immunoglobulines

II- 7-2-1 - Filtration sur gel

II- 7-2-2 - Chromatographie sur échangeur d'ions

II- 7-2-3 - Chromatographie d'affinité

II- 8 - Préparation d'antigènes

II- 8-1 - Antigènes pour immunofluorescence

II- 8-2 - Antigènes pour l'ELISA

II- 9 - Préparation de conjugué pour l'ELISA

II- 9-1 - Préparation des immunoglobulines

II- 9-2 - Préparation de l'enzyme (Oxydation)

.../...

II - 9 - 3 - Préparation de conjugué

II - 10 - Techniques de diagnostic sérologique

II - 10-1 - Immunofluorescence

II - 10-2 - ELISA

II - 10-2-1- Détection d'anticorps

II - 10-2-2- Détection des antigènes à partir d'anticorps monoclonaux

II - 10-2-2- Technique de détection d'antigènes circulants

CONCLUSION

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION

Le développement de l'industrie animale africaine a été de tout temps entravé par les problèmes de pathologie et surtout les méthodes irrationnelles de gestion des troupeaux qui ne sont pas toujours orientées vers un objectif de production maximum. De nos jours, beaucoup de maladies virales ou bactériennes économiquement importantes peuvent être facilement contrôlées par la méthode de vaccination. Cependant, la situation est tout à fait différente pour ce qui concerne les hémoparasitoses animales parce qu'il n'existe aucune vaccination approuvée et efficace pour ce groupe de maladies.

L'ILRAD s'est donc vu assigné comme premier objectif de développer de manière plus certaine ~~des~~ mesures de contrôle efficaces et économiquement possibles des deux plus importantes maladies du cheptel que sont : la trypanosomiose animale africaine et la Theileriose à theileria parva ou la fièvre de la vallée du Rift.

Ces deux maladies sont responsables de la mort d'approximativement 3 millions d'animaux par an en Afrique et la fièvre de la vallée du Rift à elle seule est accusée de la mortalité de 500.000 animaux par an en Afrique de l'Est. Pour atteindre donc cet objectif, l'ILRAD dont le financement est supporté par le Groupe Consultatif pour la Recherche agricole internationale/^{est} équipé de matériel de haute performance et d'un personnel scientifique et technique très qualifié en faisant ainsi un laboratoire de référence. En vue de répondre à son second objectif qui est la formation, un programme de cours basé essentiellement sur les résultats acquis par les chercheurs et techniciens et les innovations dans les méthodes de travail utilisés d'une part, et l'expérience personnelle des uns et des autres d'autre part est organisé chaque année par l'unité de formation du centre et, le cours que j'ai suivi sur proposition du Directeur des Recherches sur la Santé et les Productions Animales, s'inscrit dans ce cadre. Ce cours a été surtout axé autour de quelques généralités sur l'immunologie et les techniques de détection des différentes hémoparasitoses animales par les méthodes directes d'examen de sang frais, de frottais de sang, de ganglions lymphatiques, de ~~cor~~ cortex etc. . d'abord, ensuite les méthodes de diagnostic sérologique : immunodiffusion immunoélectro-phorèse, immunofluorescence directe et ELISA.

.../...

.../...

Toutes ces techniques ne pouvant pas être traitées dans ce rapport dont l'objet est de rendre compte du déroulement de ces cours seules celles étant les plus habituellement sollicitées dans la conduite des recherches sur ces maladies seront exposées. Dans une première partie seront rappelées quelques notions en immunologie, reçues sous forme d'exposés et de conférences tandis que dans la deuxième partie seront abordées les méthodes de préparation des différents réactifs et les techniques de leur utilisation dans les diagnostics serologiques. Dans une troisième et dernière partie seront tirées les conclusions sur le cours.

I. - ASPECTS GENERAUX SUR L'IMMUNOLOGIE

L'immunologie peut être définie comme étant l'étude de l'immunité vis-à-vis des bactéries, mais cette définition peut être élargie par analogie aux réactions spécifiques ou non d'un antigène tendant à éliminer des substances étrangères.

Les antigènes sont des substances qui réagissent spécifiquement avec des anticorps ou des récepteurs cellulaires et sont capables de stimuler une production d'anticorps ou une réaction cellulaire et la spécificité des antigènes à provoquer une réaction immunitaire définit l'immunogénécité. Dans le système immunitaire, on distingue deux types d'immunité : l'immunité à médiation cellulaire et l'immunité humorale.

I. 1 - L'Immunité à médiation cellulaire

Elle est assurée par la lignée de lymphocytes T développés et muris par le thymus et spécifiquement sensibilisés venant au contact de l'antigène et y agissant par cytotoxicité directe ou libération de médiateurs non spécifiques de l'antigène. cette forme d'immunité est transmissible aisément par des transferts de cellules mais ne l'est pas par le sérum.

I. 2 - L'Immunité Humorale :

Quant à l'immunité humorale, elle est médiée par des molécules spécifiques de l'antigène, les anticorps produits à distance de leur site d'action et la production de ces molécules est assurée par les lymphocytes B qui sont dépendants de la Bourse de Fabricius chez les oiseaux, mais chez les mammifères, l'équivalent de la Bourse de Fabricius demeure toujours inconnu.

.../...

1. - 3 - Les Antigènes

Ils peuvent être définis comme des molécules qui, introduites dans un organisme, induisent une réponse immunitaire par le déclenchement d'un processus biologique impliquant en particulier la prolifération de cellules lymphoïdes et aboutissant à la synthèse par ces dernières de molécules de reconnaissance (anticorps ou récepteurs). Ces molécules ont la capacité de se combiner spécifiquement in vivo comme in vitro avec l'antigène inducteur et éliminer ainsi son effet.

1. - 4 - Les Anticorps

Lorsqu'un animal reçoit un antigène dans certaines conditions, il peut produire un antisérum spécifique ne réagissant qu'avec cet antigène et contenant des protéines responsables de cette reconnaissance. On dit alors que ces protéines sont douées d'une "fonction anticorps" et c'est ce critère fonctionnel qui sert à désigner ces protéines sous le terme d'anticorps ou encore d'une manière plus générale "immunoglobulines" qui peuvent être isolées des autres constituants de sang par des techniques qui seront décrites plus loin.

Ces immunoglobulines sont classées d'après leurs caractères physico-chimiques et leurs critères antigéniques et sur la base de critères généraux, tous les individus d'une même espèce donnée ont en commun diverses catégories d'immunoglobulines appelées isotypes. Chez l'homme par exemple, on a défini 10 isotypes réparties en 5 classes :

- Les IgG sont les immunoglobulines majoritaires du sérum s'attaquant aux micro-organismes et aux toxines et sont capables de traverser le placenta ;

- Les IgM apparaissent très tôt au début de la réponse immunitaire et constituent donc la première barrière contre les agressions mais disparaissent progressivement au profit des IgG. Ils n'ont pas une capacité transplacentaire mais peuvent fixer le complément ;

- Les IgA sont trouvés dans le sérum et dans les sécrétions (colostrum surtout, mucus intestinal ou bronchique, larmes etc...), ils participent au revêtement externe du corps ;

... / ...

- Les IgD : présente; en faible quantité dans le sérum et pouvant jouer un rôle de récepteurs sur les membranes des lymphocytes ;

Les IgE sont les moins représentées des immunoglobulines sériques et jouent un rôle très important en immunopathologie car elles sont le support des manifestations d'hypersensibilité immédiate comme le choc anaphylactique, l'asthme, le rhume des foins.

1. - 5 - Le complément

C'est un système biologique qui intervient dans les processus immunologiques en se fixant sur le complexe spécifique antigène-anticorps formé. Il est composé de 9 séquences de C_1 à C_9 agissant séparément les unes les autres, et dont le C_3 le plus abondant produit le C_3a qui augmente la perméabilité vasculaire à l'histamine et qui est en même temps chimiotactique pour les leucocytes polynucléaires. Le C_3b activé libère le C_5 dont le C_5a a les mêmes propriétés que le C_3a tandis que le C_5b active le C_8 et le C_9 qui participe à la destruction de la membrane des cellules envahisseuses entraînant ainsi leur lyse.

1. - 6 - La réaction Antigène-Anticorps

La mise en présence d'un antigène et de son anticorps correspondant produit un complexe antigène-anticorps qui se traduit par l'union de ces deux éléments d'où la notion de spécificité de cette réaction car un sérum anti-hématies de bovin par exemple ne réagira qu'en présence d'hématies de bovin uniquement et jamais en présence d'hématies de mouton ou de chien. Il ne réagira non plus devant n'importe quel autre antigène même si cet antigène est de provenance d'un bovin.

.. Elle subit l'influence de l'environnement et surtout des conditions thermiques en ce sens qu'une température à 40° peut modifier la conformation des antigènes et des anticorps et conduire à de fausses réactions.

- La teneur élevée en sel ou salinité du milieu dans lequel se produit la réaction amoindrit sensiblement son effet alors ^{que} la faible teneur en sel le favorise

- Elle dépend dans une très large mesure des concentrations de l'antigène et de l'anticorps et se produit très rapidement d'où la nécessité et l'importance d'éviter des contaminations pouvant mener à des résultats très difficilement interprétables.

- Son intensité peut être réduite en fonction de la variation du pH du milieu dans lequel elle a lieu.

II. - PARTIE PRATIQUE

Toutes les techniques relatées sous ce chapitre ont été d'abord présentées au cours sous forme d'exposé avant d'être mises en application pratique au laboratoire.

II. - 1 - Séparation des trypanosomes du sang

Elle a pour objectif d'extraire les trypanosomes du sang et de pouvoir aussi les concentrer en vue des préparations d'antigènes destinés aux tests sérologiques et à ce titre deux techniques sont utilisées,

a) la méthode de Lanham : elle consiste à faire passer le sang infesté de trypanosomes à travers une colonne DEAE cellulose. Les hématies ayant une forte charge négative sont retenues par la colonne et les trypanosomes chargés moins négativement sont élués et collectés dans un bêcher ;

Technique

- Fixer un entonnoir en porcelaine sur un support ou à défaut de l'entonnoir utiliser le corps d'une seringue ;
- Mettre du DEAE cellulose dilué avec du P.S.G. pH 8.0 (500mg de DE 52 pour 2 litres de P.S.G.) dans l'entonnoir ou le corps de la seringue puis laisser se tasser
- Placer un papier filtre découpé suivant la dimension de l'entonnoir et verser du tampon P.S.G. dessus pour ouvrir les pores du filtre, rincer la préparation, et laisser à nouveau se tasser
- Verser lentement le sang prélevé sur anticoagulant et contenant les trypanosomes sur le filtre selon la proportion d'un volume de sang pour 3 volumes de DEA et laisser s'infiltrer
- Verser à nouveau du P.S.G. et laisser éluer
- l'éluat est recueilli dans un bêcher placé sous la sortie de l'entonnoir
- Afin de s'assurer du passage des trypanosomes prélever régulièrement une goutte de l'éluat à la sortie de l'entonnoir et observer entre lame et lamelle au microscope et dès que la présence d'hématie sera constatée arrêter l'opération et transvaser le produit de la récolte dans un tube à essai
- Centrifuger à froid à raison de 1.500 tours/mn pendant 15 mn en vue de concentrer les trypanosomes ainsi récoltés.

II. 2 - Technique de maintenance des trypanosomes au laboratoire

Les trypanosomes peuvent être maintenus soit sur des animaux vivants de laboratoire : souris, rats, lapins, cobayes ou sur de petits ruminants : moutons, chèvre en injectant à ces animaux du sang contenant les parasites, soit sur des tsé-tsé en les faisant nourrir avec du sang d'un animal porteur de trypanosomes, soit sous forme congelée et conservés dans l'azote liquide.

II. 3 - Clônage et stabilisation des trypanosomes

II. 3-1 - Clônage

Le principe du clônage consiste à développer chez un animal une souche de trypanosome dont la population qui en sera issue proviendra d'un seul et même trypanosome et pour ce faire deux techniques peuvent être utilisées :

- a) - la première consiste à procéder à une série de dilutions progressives du sang parasitaire partant de 10^8 trypano/ml pour déboucher vers une concentration de 1 trypanosome/ml; Prélever un ml de cette dilution, l'injecter en I.V. à une souris par la veine caudale et suivre l'évolution de la parasitemie
- b) - la deuxième technique quant à elle, présente beaucoup plus de certitude par le procédé d'isolement d'un seul trypanosome à partir de la méthode suivant :
 - prélever du sang infesté de trypanosomes dans un tube hépariné
 - à l'aide d'une aiguille très fine, prélever une toute petite goutte de sang et la déposer dans le godet d'une lame creuse ou lame d'entomologie,
 - déposer quelques gouttes de glycérol tout au tour du creux de la lame afin d'éviter l'assèchement de la goutte de sang et recouvrir d'une lamelle 22 x 22,
 - examiner la préparation au microscope et s'assurer qu'on ne voit qu'un seul trypanosome dans toute la préparation et tel est le cas
 - retirer la lamelle et ajouter une ou deux gouttes de glycérol à la préparation pour la diluer.
 - aspirer la totalité de cette préparation dans une seringue à insuline et injecter tout le contenu en I.V. à une souris par la veine caudale comme précédemment
 - garder la souris en élevage et procéder à des examens quotidiens de sang en vue de contrôler la sortie de trypanosomes.

Dans le cas d'un résultat positif tout le sang de cette souris pourra être prélevé et conservé dans l'azote liquide après avoir préalablement stabilisé les trypanosomes qu'il contient.

II. 3 - 2 - Stabilisation et conservation des trypanosomes dans l'Azote liquide

La stabilisation décrit la méthode, de conservation des trypanosomes dans l'azote liquide tout en évitant de leur faire subir un choc pouvant conduire à leur altération,

- Prelever une quantité de sang hépariné à partir d'un donneur fortement parasité (concentration finale d'héparine 5-10 unité par ml de sang)
- Ajouter quelques gouttes de glycérol jusqu'à une concentration de 10%
- Laisser pendant 15mn pour équilibrer
- Prendre une rangée de microtubes et à l'aide d'une pipette pasteur, remplir chaque microtube à moitié (environ 70 microlitres/tube)
- Laisser un espace vide aux deux extrémités de chaque tube puis les boucher chacune avec du plasticine
- transférer les microtubes dans de petits tubes à essai en matière plastique et introduire à l'intérieur un morceau de papier portant toutes les indications relatives au prélèvement : n°, date, origine. Puis en se servant d'une grosse aiguille pratiquer des trous à chaque extrémité du tube pour permettre l'infiltration de l'azote liquide à l'intérieur
- Introduire les tubes à essai contenant les microtubes dans une bouteille en plastique et à large ouverture aménagée à cet effet par un système d'isolation, en la recourant d'une couche de plasticine d'une épaisseur d'1 cm environ maintenue tout autour avec du sparadrap.
- . Maintenir la bouteille en suspension dans le container d'azote liquide afin qu'elle soit entièrement recouverte par les vapeurs pendant 2 heures pour refroidir
- . Après refroidissement transférer les tubes à essai contenant les microtubes dans les canisters du container d'azote liquide.

Le transfert devra être opéré à l'entrée du container ou en utilisant un bain d'azote liquide pour éviter une hausse de la température et après quoi les canisters sont plongés entièrement dans l'azote.

.../...

- Extraire un microtubo, le rechauffer, le couper et déposer une goutte entre lame et lamelle, puis observer au microscope pour s'assurer de la survie des trypanosomes.

II. 4 - PREPARATION D'ANTISÉRUM

L'injection répétée à un animal d'une certaine dose d'immunoglobulines en provenance d'une espèce différente a pour effet chez l'animal qui reçoit cet antigène la production d'anticorps spécifiques dirigés contre ces immunoglobulines et désignés sous le nom d'anti-immunoglobulines qu'on retrouve dans le sérum de cet animal qui porte ainsi le nom d'antisérum.

Technique : 1° : émulsionner à parties égales une solution d'immunoglobulines titrant 20 µg/ml avec de l'adjuvant complet de Freund puis injecter 2ml du produit à la plante du pied d'un lapin en répartissant la dose en deux endroits différents (le contrôle d'une bonne émulsion peut s'opérer en déposant une goutte de cette émulsion dans un bêcher contenant de l'eau. Dans le cas d'une réussite, la goutte reste intacte et flotte à la surface de l'eau tandis qu'elle fond et se dissipe en cas de non réussite et ainsi l'opération devra être poursuivie jusqu'à l'obtention d'un bon résultat)

2° : 15 jours après répéter la même injection et aux mêmes endroits d'une autre émulsion faite avec cette fois-ci l'adjuvant incomplet de Freund et titrant 15 µg/ml.

3° : 15 jours après, la deuxième injection reprendre comme pour la 1ère injection

4° : 10 jours après, prélever environ 15ml du sang de ce même lapin par ponction veineuse, recueillir le sérum et le tester en immunodiffusion ou immunoélectrophorèse pour détecter la présence d'anticorps anti-immunoglobulines.

II. 5 - IMMUNODIFFUSION

Le principe de l'immunodiffusion est la détection directe d'anticorps contenus dans un sérum donné en mettant ce sérum en contact avec l'antigène pour lequel les anticorps sont recherchés.

Technique

- Étaler une couche d'agarose à 0,15% sur la lame + 0,05% de Na₂S₂O₃ puis laisser sécher
- Pratiquer 4 ou 5 creux à la surface du gel d'agarose d'abord, et tout autour de chacun d'eux ensuite creuser des puits d'un diamètre beaucoup plus petit que celui des premiers.

- Déposer l'antigène dilué dans chaque creux tandis que les sérums à tester sont disposés dans les petits puits situés autour
- Incuber pendant 24 heures à 37° dans une boîte de petri contenant 0,05% de NaV_2
- Les résultats positifs c'est à dire les sérums contenant l'anticorps spécifique de l'antigène se traduisent par des arcs de précipitation visibles à l'oeil nu et dont l'intensité est variable selon la teneur du sérum en immunoglobulines.

II. - 6 - IMMUNOELECTROPHORESE

Le principe de l'immunoélectrophorèse est le même que celui de l'immunodiffusion à la différence que dans cette technique on fait migrer l'antigène dans une chambre électrophorétique.

TECHNIQUE :

- Etaler une couche d'agarose à 0,15% et 0,01% de thiomarsalate
- Creuser des puits en surface toujours dans le sens de la longueur de la lame.
- Déposer l'antigène dans chaque puits puis laisser migrer dans une chambre électrophorétique pendant 1 nuit
- Les résultats positifs sont révélés par la présence d'arcs de précipitation comme en immunodiffusion d'autant plus marquée que la réaction antigène anticorps est élevée.

II. 7 - ISOLEMENT ET PURIFICATION DES IMMUNOGLOBULINES

II. - 7 - 1. - Isolément des globulines

La méthode utilisée est la méthode de précipitation par le sulfate d'ammonium qui permet de séparer les globulines ou anti-immunoglobulines des autres composants du sang.

TECHNIQUE :

Prendre un volume donné de sérum auquel on ajoute goutte à goutte un égal volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (soit 550 gr $\text{NH}_4 \text{SO}_2$) en agitant tout doucement. laisser 30 mn à 1 heure à la température ambiante puis centrifuger à froid à raison de 3.000 tours/mn pendant 15mn. redissoudre le culot de centrifugation dans un volume d'eau distillée égal au volume de sérum initial utilisé. Renouveler la précipitation une deuxième puis une troisième fois puis dissoudre le dernier culot dans du

PBS 5M PH 7,8 à un volume égal à la moitié du volume de sérum initial. Dialyser contre le tampon PBS et vérifier la présence de l'ammonium en mélangeant 1ml du produit de dialyse à un égal volume d'une solution à 10% de chlorure de barium. Le virage au trouble de ce mélange témoigne de la présence d'ions d'ammonium et dans ce cas, la dialyse devra être poursuivie jusqu'à la réaction négative c'est-à-dire l'obtention d'un mélange clair,

II. 7 - 2 - Purification des immunoglobulines

Tandis que la précipitation permet d'isoler la totalité des globulines sériques, d'autres techniques sont utilisées pour éliminer la sulfate d'ammonium ou bien pour obtenir une classe ou une sous-classe d'immunoglobulines.

II. 7 - 2. 1 - Filtration sur gel

Le principe consiste à éluer la substance désirée à travers une colonne de Séphadex G 25 par le principe d'exploitation des différences de dimensions de molécules permettant de faire passer rapidement les unes pendant que le passage des autres est retardé.

TECHNIQUE

- Mettre du gel de Séphadex G 25 préalablement équilibré avec un tampon PBS 5M à un pH 7,8 dans une colonne de chromatographie puis laisser se tasser.
- Rincer la préparation en ajoutant du P.B.S. puis laisser égoutter
- Verser lentement la solution de globulines en surface, ajouter du tampon PBS pour diluer et laisser éluer
- L'éluat constituant la fraction d'immunoglobulines est recueilli dans des tubes et chaque tube devra être contrôlé pour vérifier la présence de sulfate d'ammonium comme précédemment en ajoutant du chlorure de baryum.

II. 7 - 2. 2 - Chromatographie sur échangeur d'ions

En faisant passer une substance à charge électrique donnée à travers un gel à charge contraire, on crée un effet de rétention de la substance par le gel sous forme

de liaison. Cette liaison gel-substance peut être rompue lorsqu'on ajoute un tampon à charge électrique de même nature mais plus forte que celle de la substance retenue. Et c'est suivant ce procédé que les $I_g G_1$, $I_g G_2$ et $I_g M$ sont isolés.

TECHNIQUE

- Mettre du DE 52 équilibré à un pH 7,3 avec du tampon PO_4 5 M dans une colonne de chromatographie connectée à un collecteur et laisser se tasser.
- Ajouter la même tampon pour rincer le contenu de la colonne et laisser égoutter avec le même tampon.
- Verser lentement la solution de globulines dans la colonne puis ajouter le tampon PO_4 et laisser élué. Les $I_g G_2$ sont élués en premier lieu et sont recueillis dans les tubes disposés au niveau du collecteur.
- Ajouter du tampon PO_4 10 M pour faire élué le premier pic correspondant au $I_g G_1$ jusqu'à épuisement complet.
- Ajouter du tampon PO_4 50 M pour avoir une dernière élution correspondant à un mélange d'un 1er pic d' $I_g G_1$ et $I_g G_2$ puis d'un deuxième pic d' $I_g M$ et d' $I_g G_1$.

II. 7 - 2 - 3 - Chromatographie d'Affinité

Le principe consiste à coupler un gel appelé matrice à un gel biospécifique appelé ligant et capable de se lier sélectivement avec la fraction qu'on désire isoler d'une substance donnée. Cette fraction peut constituer l'élément à retenir ou alors l'élément à rejeter. Dans le cas où l'élément est à retenir ou alors l'élément à rejeter. Dans le cas où l'élément est à retenir, la liaison avec le ligant devra être réversible afin de pouvoir l'éluer seul après. Dans le cas où il devra être écarté, cette réversibilité n'est plus nécessaire puisque seul l'élément désiré aura traversé la colonne.

TECHNIQUE

- Prendre du gel de Sépharose constituant la matrice couplée avec de la protéine A qui est le ligant.
- Equilibrer avec un tampon PBS 0,01 renfermant 0,2% d'azide de sodin.

-- Mettre dans une colonne connectée à un collecteur.

- Verser la solution de globulines et après leur absorption totale par le gel faire éluer avec du tampon NaH_2PO_4 0,1 M pH 5,9, Pour obtenir le 1er pic des IgG_2
- Après le premier pic, ajouter du tampon NaH_2PO_4 0,1 M pH 5,0 pour obtenir le second pic des IgG_1

Les 2 pics sont collectés séparément et correspondent aux fractions IgG_2 et IgG_1 . La densité optique de chaque pic est déterminée par une lecture au spectrophotomètre en vue du calcul des taux de protéines sériques fractionnées.

II. 8 - PREPARATION D'ANTIGENES

Les préparations d'antigènes utilisés dans les épreuves sérologiques varient en fonction de la technique de diagnostic envisagée. Et c'est ainsi que l'antigène destiné à la technique d'immunofluorescence et composé d'une suspension de trypanosomes sera différent de celui de l'ELISA où les trypanosomes doivent subir une désintégration par le procédé de la sonification.

II. 8 - 1 - Antigènes pour immunofluorescence

- Saigner des animaux dont le sang est fortement parasité sur anticoagulant.
- Centrifuger le sang ainsi recueilli à 2.000 tours/mn pendant 15 mn à froid.
- Verser les 2/3 du surnageant et recueillir l'interphase.
- Diluer le surnageant au 1/2 avec du tampon P.S.G. pH 8,0.
- Séparer les trypanosomes du reste du sang par la méthode de Lanham <écrite plus haut.
- Centrifuger l'éluat trypanosomes recueilli à raison de 2.000 tours/mn pendant 20 mn à froid pour concentrer les parasites
- Prendre un volume d'eau physiologique représentant 10 fois celui du volume de sang initial et remettre le culot de centrifugation en suspension
- Fixer de la manière suivante :
 - 1 volume de suspension de trypanosomes pour
 - 2 volumes de fixateur puis placer sur un agitateur magnétique pendant 1 mn et laisser fixer une nuit à - 20°C.

Composition du fixateur :

Acétone réfrigéré : 80 ml

Formol : 0,25 ml

NaCl à 0,9 % : 19,75 ml

(le fixateur devra être une préparation extemporanée)

- Centrifuger à 1.500 tours/mn pendant 15mn à + 4°C afin d'éliminer le fixateur.

- Resuspendre le culot de trypanosomes dans de l'eau physiologique à raison de 2 fois le volume initial de sang.

- Centrifuger à 2.500 tours/mn pendant 15 mn à 4°C puis répéter 3 fois cette opération afin d'éliminer entièrement toute trace de fixateur.

- Recueillir le dernier culot de lavage et suspendre dans du P.D.S. 0,01 M pH 7,2 renfermant 0,2 % d'azide de sodium.

- L'antigène ainsi préparé, peut être stocké soit à 4°C, soit à la température ambiante après avoir été titré puis reparti dans des flacons de 1 ml.

II. - 8. - 2 - Antigène pour l'ELISA

- Récolter et isoler les trypanosomes comme précédemment.

- Après centrifugation, remettre le culot en suspension dans un tampon tris HCl pH 8,0 contenant 1 M de PMSF (Phényl-méthyl-sulfony-fluoride) et 5 M d'Isoacétamide selon un volume égal au 1/10 du volume initial de sang et répéter cette opération jusqu'à l'obtention d'un volume à peu près de 20 ml. de culot de centrifugation

- sonifier la préparation jusqu'à la lyse complète des trypanosomes dans de la glace avec un appareil de sonification.

- Centrifuger le sonicat à 3.000 tours/mn pendant 15 mn à 4°C.

- Recueillir le surnageant, centrifuger à nouveau à 15.000 tours/mn pendant 30 mn puis filtrer le surnageant à travers un filtre millipore.

Ultracentrifuger le filtrat à 40.000 tours/mn pendant 3G mn.

Recueillir le surnageant et le mettre à dialyser contre un tampon tris 50 M pH 8,0 puis lyophiliser le produit de dialyse ainsi obtenu.

- Déterminer le taux de protéines, puis titrer et stocker à - 20°C.

II. - 9 - PREPARATION DE CONJUGUE POUR ELISA

Le test d'ELISA requiert l'utilisation d'un conjugué préparé en couplant la molécule d'anticorps avec l'enzyme, horseradish peroxydase (H.R.P.) et, il est utilisé dans les analyses sérologiques d'une large gamme de maladies animales. Cette technique est le plus souvent utilisée dans les méthodes indirectes de détection de la présence d'anticorps spécifiques d'un antigène connu. La méthode de conjugaison décrite ci-dessous concerne spécialement la préparation d'un conjugué d'antisérum de chèvre anti-immunoglobulines de bovin, toutefois cette procédure de conjugaison peut être utilisée pour le couplage d'antiglobulines produits dans une large variété d'espèces animales.

II.9 - 1. - Préparation des immunoglobulines

Les fractions immunoglobuliniques de l'antisérum sont précipitées par une solution saturée de sulfate d'ammonium à 50%

- Les globulines précipitées sont lavées deux fois avec une solution de sulfate d'ammonium à 50% puis dissoutes dans un tampon PO_4 10 M pH 7,8
- Ensuite dialyser largement contre le même tampon une nuit à 4°
- Fractionner les globulines en faisant passer le produit de dialyse à travers une colonne DEAE 52 cellulose (comme décrit précédemment)
- Tester en immunodiffusion les fractions obtenues et celles qui présentent des bandes de précipitation sont concentrées
- Déterminer au spectrophotomètre le taux de protéines éventuellement présentes dans les fractions.

II. 9 - 2 - Préparation de l'Enzyme (OXYDATION)

- Mettre 10 mn de HRP dans un fiole
- Ajouter 1,8 ml d'eau distillée
- Ajouter 200 µl d'une préparation toute fraîche de sodium périodate (32mg/ml goutte par goutte) et laisser mélanger au fur et à mesure avec un agitateur magnétique pendant 30 mn à la température ambiante pour permettre l'oxydation de l'enzyme.
- Dialyser contre un tampon sodium acetate 1 M pH 4.4 pendant une nuit à 4°.

II. 9 - 3 - Préparation du conjugué

- Prendre 10 Ml de la solution d'enzyme ainsi obtenue auxquels on ajoute 2ml de tampon carbonate 0,2 M pH 9,6.
- Ajouter 30 mgr de la solution d'immunoglobulines (proportion d'1 part d'enzyme pour 3 parts de globulines) et laisser mélanger pendant 2 heures à la température ordinaire.
- Ajuster le pH de la solution à 7,2 avec du $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 0,1 m et laisser à 4° pendant 1 nuit au repos.
- Ajouter 2 ml d'une solution fraîche de glycine (8 mgr de glycine dans 100ml de PBS 0,01 M pH 7,2) ou borohydrate de sodium et laisser à nouveau au repos pendant 2 heures à la température ambiante.
- Séparer le conjugué de protéines du reste, en le faisant passer à travers une colonne séphadex G 100 après une nuit de dialyse,
- Filtrer l'éluat ainsi recueilli à travers une membrane filtrante 0,45 u et mettre dans une bouteille sombre pour protéger contre la lumière.
- Ajouter 0,25 ml d'azide de sodium pour la concentration finale
- Filtrer puis stocker à -20°

Conjugué pour immunofluorescence :

Le conjugué pour les tests d'immunofluorescence est préparé à partir d'un couplage d'immunoglobulines avec l'isothiocyanate du fluorescéine.

- Prendre un volume donné de solution de protéines titrant 10 mgr/ml et le diluer dans un autre volume de tampon carbonate 0,05 M pH 9,6
- Prendre 10 fois le volume du même tampon de dilution des immunoglobulines et dans lequel on diluera 13 fluoresceine à raison d'1 mgr/ ml de tampon.
- Dialyser la solution de protéines pendant une nuit à 4° contre du tampon carbonate bicarbonate pH 9,6.
- Transférer la membrane de dialyse contenant les protéines dans la solution de fluorescéine et procéder à une seconde dialyse de 24h pour faire la conjugaison proprement dite.

- Filtrer à travers une colonne de séphadex G.50 pour éliminer les traces de fluoresceine non fixées.
- Collecter les IgG suffisamment marqués par la méthode de chromatographie sur échangeur d'ions en les faisant éluier à l'aide d'un gradient NaCl dans un tampon PCl_4 0,01 M pH 7,8.
- Mesurer la densité optique de chaque éluat à 280 et 495nm et faire le rapport

$$\frac{\text{d.o. à 495 nm}}{\text{d.o. à 280 nm}}$$

Les éluats dont ce rapport est compris entre 2,5 et 7 constituent les fractions à retenir et ainsi tous les autres se situant hors de ces limites sont éliminés.

- Faire passer à travers un filtre et ajouter 0,2% d'azide de sodium puis diluer au 1/2 avec de la glycérine pure, puis titrer et stocker à -20°

II. 10 - TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

L'immunofluorescence indirecte et l'ELISA sont à l'heure actuelle les deux méthodes de diagnostic sérologique les plus utilisées en raison de leur sensibilité, de leur aspect pratique permet tant d'effectuer des analyses différées et surtout de leur haute spécificité.

II. - 10 - 1 - Immunofluorescence

Le principe consiste à mettre en évidence la présence d'anticorps sériques par contact d'un sérum suspect avec l'antigène agent de la maladie considérée, révélé ensuite par un antisérum spécifique de ce sérum conjugué à l'isothiocyanate de fluoresceine.

TECHNIQUE

- Diluer l'antigène dans un tampon PBS 0,01 M pH 7,2 et le déposer dans les cercles d'une lame à immunofluorescence (disponible dans le marché) puis laisser sécher 15 à 20 mn à la température ambiante ou 5 à 10 mn à 37°C .

- Absorber le sérum dans du lysat de lymphocytes à raison d'un volume de sérum pour 39 volumes de lysat et laisser 30 mn à la température ambiante.
- Diluer les sérums à tester dans du tampon PBS pH 7,2 additionné de sérum -albumine de bovin à 2 %.
- Déposer dans chaque cercle 25 ul de dilution de sérum correspondant et laisser 39 mn en atmosphère humide à la température ambiante.
- Laver les lames en les trempant dans du PBS pendant 15 mn et répéter cette opération deux fois successives.
- Déposer dans chaque cercle une goutte de conjugué dilué dans du PBS contenant 2 % de sérum - albumine et 1p. 10.000 de bleu d'Evans.
- Monter une lamelle 22 x 50 à l'aide d'une préparation à parties égales de glycérine et PBS pH 8 ,0 puis lire au microscope à ultraviolet.

Les réactions positives sont révélées par une fluorescence des trypanosomes constituant l'antigène et Sur lesquels s'est fixé l'anticorps lié à l'antisérum marqué. Les réactions négatives par contre sont sombres.

II. 10 - 2 - ELISA

Le principe de l'ELISA comme celui de l'immunofluorescence décrit ci-dessus consiste à déceler la présence d'anticorps ou d'antigènes circulants dans un sérum considéré par le même système de réaction antigène-anticorps révélée ensuite par une substance chromogène

II. 10 - 2, - 1 - Détection d'anticorps

Cette technique sert à détecter des anticorps circulants dans un sérum suspect permettant ainsi de dire si l'animal. a été au moins unu fois en contact avec l'antigène de la maladie recherchée au moment du prélèvement ayant alors provoqué la production d 'anticorps dirigés contre l 'antigène de cette maladie.

TECHNIQUE

- Sensibilisation de plaques de microtitrage : ou 20 ugr/ml
- Diluer l'antigène à la concentration requise : 5 ug/ml 10 ugr/ml/ avec une solution de PBS 0,01 M pH 7,2 contenant 0,02% d'azide de sodium
- Emplir chaque puits de la plaque avec 100 ul d'antigène dilué.
- Incuber la plaque à 37° pendant 2 heures puis transférer à 4° pendant une nuit.
- Verser l'antigène puis laver les plaques 3 fois successives avec du tampon de lavage mélangé à du tween 20 à 0,1% : remplir chaque puits jusqu'aux bords avec le tampon, laisser 3 - 5 minutes en contact puis verser et sécher.
- Bloquer les parois de la plaque avec une protéine de provenance différente de celle de l'espèce animale pour laquelle le sérum est analysé (albumine de chèvre, mouton, lapin, etc...) à une concentration de 0,2 % en distribuant 200 ul du tampon de blocage dans chaque cupule et incuber pendant 30 mn à 37°. Toutefois, ce blocage peut être omis mais dans ce cas, le sérum à tester devra être dilué dans un tampon à 0,5% de protéine. L'intérêt de cette pratique est de saturer la plaque en faisant occuper tous les pores laissés libres par la protéine de sorte à éviter toute fausse réaction,
- Remplir la plaque avec des sérums de contrôle et les sérums à tester dilués à 1/100 avec du tampon de dilution puis incuber à 37° pendant 1 heure ou à la température ambiante pendant 2 heures.

Il est en outre recommandé de tester aussi bien les sérums de contrôle que ceux destinés à être analysés en double c'est à dire en utilisant 2 puits par sérum, et de remplir la rangée 1 de A à H avec du tampon de dilution si on doit utiliser un lecteur multiskan pour mesurer les densités optiques

- Laver la plaque 3 fois successives comme précédemment
- Ajouter 100 ul de conjugué dilué en fonction de son titre de travail dans du tampon de dilution et incuber pendant 1 h à 30° ou 2 heures à la température ambiante,

.../...

- Laver 3 fois de suite de la même manière avec du tampon de lavage et sécher.
- Diluer le substrat O-phenylendiamine à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon citrate 0,05 M pH 5,5 auquel on a ajouté 1% d'hydrogène peroxydase.
- Remplir tous les puits avec 100 ul de cette préparation pour révéler et incubé 15 à 30mn à 37° et dans l'obscurité puis arrêter la réaction en ajoutant 25 ul d'acide sulfurique 2 N dans chaque puit .
- Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre et à une vitesse de 492 nm

II. 10.2 - 2. - Détection des Antigènes à Partir d'Anticorps Monoclonaux

Un anticorps monoclonal est un anticorps produit à partir d'un seul clone de cellule. Par conséquent, sa spécificité est qu'il est dirigé vers un épitope à l'opposé de l'antisérum produit chez les animaux par immunisation qui contient un mélange d'anticorps dirigés vers plusieurs épitopes de l'antigène immunisant. En raison de cette spécificité, les antigènes monoclonaux constituent un excellent moyen pour les analyses de mélange d'antigènes en vue d'identifier et de purifier les antigènes qui conviennent pour un besoin donné.

L'application des anticorps monoclonaux est en hausse non seulement à cause de leur grande spécificité mais aussi la facilité selon laquelle ils peuvent être standardisés et le fait que les cellules hybrides produisant les anticorps monoclonaux peuvent être conservées de manière permanente.

Ces anticorps monoclonaux d'utilisation récente permettent la détection d'antigènes circulants dans le sérum d'un animal donné et d'avoir ainsi des précisions sur l'état pathologique de cet animal à la période exacte selon laquelle le prélèvement de sang a été effectué.

La technique d'utilisation des anticorps monoclonaux dans les méthodes de diagnostic sérologique est à peu près semblable à celle décrite pour la détection d'anticorps par ELISA.

II. 10, - 2 2 - 1 - Préparation d'anticorps Monoclonaux

- a) Immuniser un animal (rat- souris etc. ..) avec l'antigène qu'on veut rechercher dans sérums à tester et vérifier si la production d'anticorps est abondante en utilisant par exemple la méthode d'immunodiffusion et en cas de réaction positive
- b) sacrifier l'animal, prélever la rate puis la macérer en vue de pouvoir fusionner les cellules spléniques avec des cellules cancéreuses incapables de synthétiser leur propre immunoglobuline et la proportion cellules spléniques : cellules cancéreuses est de 10 : 1
- c) La fusion est assurée par du polyéthylène glycol ou du Sendivirus. Dans le cas d'une bonne fusion la cellule cancéreuse s'approprie le pouvoir immunogène du lymphocyte.
- d) Distribuer le mélange de cellules ainsi obtenu dans les puits d'une plaque de culture tissulaire.
- e) Faire pousser les cellules pendant 10 à 14 jours dans un milieu de culture sélectif qui permet la survie des cellules fusionnées tandis que celles restées libres meurent.
- f) Remplacer le milieu par un autre qui favorise le développement rapide des cellules, avant de tester la présence d'anticorps contre l'antigène immunisant, le choix du test ayant été opéré avant de procéder à la fusion des cellules.
- g) Les cellules contenues dans des puits dont le surnageant composé du liquide de culture présentent, une activité anticorps sont ensuite transférées dans des flacons de culture tissulaire et développées.
- 1) Les cellules ainsi développées sont ensuite clônées par la méthode de dilution ou en utilisant de l'agarose. Ensuite on termine avec une population de cellules provenant d'une seule cellule appelé clone de cellules. L'anticorps synthétisé par ce clone prend alors le nom d'anticorps monoclonal.

II. 10 . 2-2 . . TECHNIQUE DE DETECTION DES ANTIGENES CIRCULANTS

Le test peut être effectué sur une plaque à microtitrage préalablement sensibilisée par l'anticorps monoclonal pour l'étude d'un grand nombre de sérums ou dans de petits tubes à essai dans le cas de diagnostic à titre individuel.

Lorsque l'antigène est présent dans le sérum à tester, cet antigène est retenu par l'anticorps et les éléments non fixés sont éliminés par lavage. Pour révéler la fixation de l'antigène, on ajoute le même anticorps qui a servi à sensibiliser la plaque mais cette fois-ci conjugué à une enzyme qui va se fixer à l'antigène et former ainsi un complexe. Cette combinaison antigène-anticorps est ensuite révélée par addition d'un indicateur approprié. Un changement de couleur se produit par un virage au vert des sérums positifs alors que les sérums négatifs restent claires. La lecture de la densité optique des plaques au spectrophotomètre donne des indications sur le pourcentage d'antigène présent dans l'échantillon.

- 1 - Sensibiliser la plaque avec l'anticorps monoclonal
- 2 - Laver avec du P.B.S.
- 3 - Ajouter 50 ul de sérum à tester et laisser incuber pendant 15 mn à la température ambiante
- 4 - Vider la plaque et laver avec du tampon de lavage
- 5 - Ajouter 100 ul de conjugué et laisser incuber 15 mn à la température ambiante,
- 6 - Laver et rincer 3 fois
- 6 - Ajouter 100 ul de substrat et laisser incuber pour obtenir la coloration.

Les sérums positifs sont colorés en vert tandis que les négatifs restent claires.

.../...

CONCLUSION

Les cours suivis pendant la période qu'a duré le stage ont permis *non* seulement d'enrichir les connaissances théoriques dans les domaines scientifique et technique mais surtout de manipuler des appareils de laboratoire hautement perfectionnés et de pratiquer des méthodes de diagnostics sérologiques de pointe.

Le détection des antigènes circulants à partir d'anticorps monoclonaux qui en est la plus récente présente un avantage certain puisqu'elle permet d'effectuer des diagnostics très précoces en ce sens que leur présence dans le sérum est contemporaine à la maladie. la détection des anticorps quant à elle, n'est possible que deux semaines au moins après que la maladie se soit installée et peut se prolonger jusqu'à 3 mois après la guérison de l'animal.

De telles techniques représentent donc un outil très utile dans les méthodes de diagnostic sérologique à cause de leur rapidité d'exécution et surtout de la fiabilité des résultats qu'ils donnent.

Les autres techniques de laboratoire étudiées dans le même cours (préparation de réactifs surtout) offrent également un intérêt sûr car même si certains de ces réactifs sont disponibles dans le marché, Leur préparation sur place permet de mieux maîtriser leurs performances.

Cependant, la mise en application de toutes ces techniques pour la plupart requiert l'utilisation au minimum d'un matériel de haute perfection qui doit constituer une mesure d'accompagnement étroitement liée, même si des accommodations peuvent être opérées au niveau de certaines exécutions pratiques.

Pendant tout le temps qu'a duré le cours nous avons été l'objet d'une attention toute particulière de la part des autorités de l'ILRAD et à ce sujet, nous tenons à adresser nos vifs remerciements :

Au Dr. GRAY Directeur de l'ILRAD pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé et le suivi constant qu'il a su assurer au bon déroulement du stage.

Au Dr. Jim LENAHAAN, Coordonateur de l'unité de formation pour l'excellente organisation et la richesse du programme de cours et surtout l'assistance continue qu'il a toujours eue à notre égard.

Au Dr. MUSOKE, Directrice du cours pour sa disponibilité, son dévouement et sa modestie qu'elle n'a jamais ménagés afin de nous assurer un séjour très riche d'enseignements.

Au Dr. Mody TOURE responsable des relations scientifiques avec les pays francophones pour l'intéressement qu'il a manifesté à l'organisation et au déroulement du stage.

A tout le personnel scientifique et technique de l'ILRAD qui a témoigné d'un haut niveau de connaissances nécessaires au parfait déroulement des cours.

A tout le personnel administratif pour les facilités accordées à toutes nos sollicitations quotidiennes.