

ZV0000822

REPUBLIQUE DU SENEGAL

MINISTERE DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

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

LABORATOIRE NATIONAL DE L'ELEVAGE
ET DE RECHERCHES VETERINAIRES

RAPPORT SUR UN STAGE D'IMMUNOLOGIE
PARASITAIRE ORGANISE PAR L'ILRAD DE NAIROBI
DU 4 OCTOBRE AU 12 NOVEMBRE 1982

Par Mbaye MBENGUE

REF. N° 53/PARASITO.
JUILLET 1983.

**RAPPORT SUR UN STAGE D'IMMUNOLOGIE
PARASITAIRE ORGANISE PAR L'ILRAD DE NAIROBI
DU 4 OCTOBRE AU 12 NOVEMBRE 1982**

PRESENTATION DE L'ILRAD

Le Laboratoire International pour la Recherche sur les Maladies animales (ILRAD) est situé sur 70 hectares, à proximité de Nairobi, au Kenya. Il fut établi en 1973 au terme d'un accord avec le Gouvernement kenyan.

L'ILRAD est supporté par le Groupe consultatif pour la Recherche agricole internationale (C.G.I.A.R.) qui est une association de fondations privées, de gouvernements nationaux et d'organismes nationaux et Internationaux.

Le C.G.I.A.R. est à son tour garanti par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la Banque mondiale (W.B.) et le Programme des Nations Unies pour le Développement.

L'objectif du C.G.I.A.R. est d'améliorer la production agricole et animale dans les pays tropicaux et subtropicaux,

Deux maladies, de vaste répartition géographique et dont les effets économiques s'avèrent graves sur le bétail, furent choisies par le programme de recherche de l'ILRAD : il s'agit de la Trypanosomiase et de l'East Coast Fever (E.C.F. = fièvre de la côte de l'Est) qui est une forme de Theileriose.

.../...

TABLE DES MATIERES

	Pages
I - <u>INTRODUCTION</u>	2
II - <u>PARTIE THEORIQUE</u>	3
- Généralités sur l'immunologie	4
- Les Immunoglobulines	5
- La réponse immunitaire	7
- Le complément	9
III - <u>PARTIE PRATIQUE</u>	10
- Purification des protéines	11
- Immunofluorescence indirecte (I.F.I.)	14
- Test immunospécifique par couplage enzymatique (E.L.I.S.A.).....	17
- Immunodiffusion et immunoélectrophorèse	19-21
- Transformation lymphoblastique par la concanavaline A	22
- Test d'isolement des lymphocytes du sang	24
- Test d'agglutination sur lame	25
- Test d'incubation et d'infectivité du sang (B.I.I.T.).....	26
- Dosage radioimmunologique	28
IV - <u>CONCLUSIONS ET REMERCIEMENTS</u>	30
- Conclusions	31
- Remerciements	32

I N T R O D U C T I O N

L'une des tâches **fondamentales de l'Institut sénégalais de Recherches agricoles (I.S.R.A.) est la formation et l'amélioration constante du niveau des chercheurs et des techniciens,**

Ainsi **sur l'initiative de son Directeur de département de recherches zootechniques et vétérinaires, j'ai assista à un stage organisé par l'ILRAD (le Laboratoire international pour la Recherche sur les Maladies animales) de Nairobi au Kenya.**

Le programme du stage a comporté :

- * une partie théorique portant sur :**
 - généralités sur l'immunologie
 - les immunoglobulines
 - la réaction **immunitaire**
 - le complément

- des travaux pratiques portant avec les méthodes immunologiques appliquées dans le diagnostic des maladies hémoparasitaires.**

PARTIE THEORIQUE

GENERALITES SUR L'IMMUNOLOGIE

Il existe plusieurs types d'immunité :

l'immunité dite naturelle : peut être innée ou constitutive.. Elle traduit l'état de résistance naturelle vis-à-vis d'un agent pathogène qu'une espèce animale doit à sa propre constitution.

Cette immunité met en oeuvre :

- les cellules phagocytaires
- les facteurs humoraux non spécifiques (le complément, le système properdine)

l'immunité acquise : peut être

- soit active à la suite d'une infection ou d'une immunisation
- soit passive si elle est conférée à un organisme sans que, ce, dernier ne participe à l'installation de cette immunité,

Les réactions antigène - anticorps sont réversibles et sont caractérisées par des interactions moléculaires non covalentes.

Lors de la réponse primaire, les anticorps produits sont généralement de nature IgM. Au cours de cette réponse, l'affinité des anticorps est faible mais l'avidité est élevée.

En réponse secondaire, l'affinité des anticorps prend le pas sur l'avidité : cette réponse est le plus souvent de nature IgG.

Deux antigènes ayant quelques déterminants antigéniques identiques peuvent donner des réactions croisées.

LES IMMUNOGLOBULINES

Les immunoglobulines ont une structure peptidique formée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques reliées entre elles par des ponts disulfures.

L'hydrolyse de la molécule d'immunoglobuline par la papaïne donne deux fragments identiques (Fab) capables de se lier à un antigène monovalent et un troisième fragment Fc (fragment cristallisable) qui ne peut pas se lier à l'antigène. Ce dernier fragment Fc assure des fonctions biologiques secondaires (récepteur des cellules phagocytaires, fixation du complément).

L'analyse des protéines de myclome a montré que les régions amino-acide terminal des chaînes lourdes et des chaînes légères sont variables.

Chez l'homme, on trouve cinq types de chaînes lourdes correspondant à cinq classes d'immunoglobulines qui sont l'IgG, l'IgA, l'IgM, l'IgD et l'IgE.

Dans le sérum normal, il existe au moins 10^8 molécules d'immunoglobulines de spécificité différente,

IgG : la mieux connue de tous les Ig, représente 80 p.100 des Ig du sérum humain ;

IgA : est surtout présente dans les substances extravasculaires ;

IgM : est intra et extravasculaire. Elle est secrétée tôt dans la réponse immunitaire. A cause de son degré élevé de valence, elle est un très grand agglutinant bactérien et un médiateur du facteur cytolytique du complément. L'IgM est le premier élément de défense immunitaire, humorale spécifique ;

IgD : se rencontre à la surface des lymphocytes B en cours de différenciation, où elle joue probablement le rôle d'antigène récepteur ;

IgE se retrouve généralement à la surface des mastocytes. Le contact d'un allergène avec l'IgE fixée à la surface des mastocytes entraîne la dégranulation de celui-ci dont le résultat est la libération de substances vasoactives comme l'histamine. L'IgE intervient dans les phénomènes anaphylactiques liés aux infections parasitaires.

Les immunoglobulines portent des marqueurs génétiques :

.../...

les allotypes : sont l'expression de gènes allèles. On les trouve à la fois sur la partie constante et sur la partie variable des Ig.

les idiotypes : sont situés sur la région variable des Ig soit à l'intérieur soit à proximité du site actif,

L'idiotype est héréditaire mais n'obéit pas aux lois de la génétique simple de MENDEL,

LA REPONSE IMMUNITAIRE

Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire alors que les lymphocytes B sont impliqués dans la formation des anticorps et sont responsables de l'immunité humorale.

L'immunité cellulaire qui est la principale source de défense contre les organismes intracellulaires, dépend des interactions de l'antigène vis-à-vis des récepteurs spécifiques présents à la surface des lymphocytes T.

Les lymphocytes T et B portent des marqueurs de surface :

- les lymphocytes T : anti gène θ , récepteurs γ et μ , anti gène Ly
- les lymphocytes B : Ig de surface, facteur C_{3b} du complément.

Il existe plusieurs sous-populations de lymphocytes T parmi lesquelles :

- les T helper (T_H) : Interviennent dans la production des anticorps et la génération des cellules cytotoxiques
- les T suppresseur (T_S) : leur action est de supprimer toute réponse immunitaire qu'elle soit humorale ou cellulaire
- les T cytotoxiques (T_C) : ont pour rôle essentiel la destruction des cellules portant des antigènes de surface différentes de celles de l'hôte.

Les cellules productrices d'anticorps peuvent être mises en évidence par l'immunofluorescence ou la technique des plages de lyse.

Dans la myélogelée, le protéine monoclonale donne une seule bande en électrophorèse sur papier ou un seul arc de précipitation en immunoelectrophorèse. L'activité des lymphocytes peut être augmentée par l'administration d'un adjuvant.

Les gènes de la réponse immunitaire sont en rapport avec les gènes du complexe d'histocompatibilité.

Les lymphocytes T peuvent non seulement augmenter la réponse immunitaire par le biais de la coopération (T_H) mais dans d'autres cas, peuvent exercer une fonction suppressive (T_S).

La tolérance immunologique peut être induite avec des antigènes solubles :

exemple : des lapins ayant reçu à la naissance du sérum albumine bovine, ne produisent pas d'anticorps lors d'une stimulation ultérieure avec cette protéine.

Cette tolérance peut aussi être induite par l'exposition à l'antigène au stade néonatal et à l'état adulte,

exemple : l'injection de cellules de la moelle osseuse de souris CBA à des souris nouveaux-nés de la lignée A, supprime leur capacité à rejeter une greffe CBA au cours de la vie adulte.

Les lymphocytes T ont un degré de tolérance plus élevé que les lymphocytes B comme l'illustre le tableau suivant :

Dose tolérogène en mg	% tolérance induite		
	Lymphocyte T	Lymphocyte B	Rate du donneur
0,1	96	9	62
0,5	99	56	97
2,5	99	70	99

Effet de la dose d'antigène sur l'induction de la tolérance au niveau des lymphocytes T et des lymphocytes B.

Les faibles doses d'antigène rendent tolérants les lymphocytes T alors que les lymphocytes B ne deviennent tolérants que pour des doses élevées d'antigène.

L'activité des lymphocytes T dicte dans une large mesure la réponse de la rate entière, Référence (CHILLER J.M., HABICHT G.S. et WEIGLE W.O., Science, 1971, 171, 813).

LE COMPLEMENT

La réaction de l'antigène particulaire avec un anticorps peut conduire à une agglutination, une élévation de la phagocytose, une cytotoxicité lorsque l'antigène est constitué par des cellules, .

Le complément recouvre une cascade de réactions enzymatiques dans laquelle le premier composant de l'activation scinde un petit peptide en plusieurs molécules du second composant dont chacun devient une enzyme active capable d'agir sur le troisième composant.

Le complément peut être activé par deux voies :

- la voie classique**
- la VOIE alterne.**

Le plus important composant le C_3 est scindé par une convertase (voie alterne).

Le produit de la scission C_{3a} est chimiotactique pour les leucocytes polynucléaires. Il augmente la perméabilité vasculaire avec l'histamine libérée par les plasmocytes et les basophiles.

Le second produit de la scission C_{3b} active le C_5 en C_{5a} (ayant les propriétés similaires au C_{3a}) et conduit C_{3b} à la séquence des facteurs C_8 et C_9 entraînant la lyse de la cellule.

A travers tous ces effets, le complément joue un rôle important dans la défense de l'organisme contre l'infection.

In vivo, il intervient dans les maladies auto-immunitaires (glomérulonéphrite).

Le complément est utilisé in vitro dans les sérodiagnostics de maladies parasitaires, bactériennes, etc...

PARTIE PRATIQUE

On prépare la colonne de sephadex G 25 : volume de la colonne = $1/3 \times$ mg de protéines. Laver la colonne avec du tampon phosphate 0,01 M pH 7,5 et la remplir de sephadex. Mesurer le pH et la conductivité du sephadex qui doivent être rigoureusement les mêmes. Mettre la solution de protéines dans la colonne. Toutes les 5 mn, les protéines sont recueillies dans des tubes à hémolyse grâce au collecteur de fraction LKB.

Les protéines ainsi prélevées sont mises dans une éprouvette pour la mesure de la densité optique. On détermine la quantité de protéines pures selon la même formule ci-dessus.

On prépare la colonne de DE₅₂ : volume de la colonne = $0,2 \times$ mg de protéines. On met le DE₅₂ dans la colonne en procédant comme pour le G₂₅ : les protéines isolées sont mises dans une éprouvette pour déterminer la densité optique et calculer ainsi la quantité d'IgG.

Le DE₅₂ chargé positivement ne peut éluer que l'IgG qui a la même charge. Donc les protéines prélevées sont essentiellement constituées d'IgG. On a ainsi isolé l'IgG à travers la colonne de DE₅₂.

II - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Purification simple du sérum de chèvre en sous-classes d'IgG₁ et d'IgG₂ par la protéine A sépharose à divers pH

Principe

Dans la biotechnologie de séparation des substances, la chromatographie d'affinité occupe une place importante. Elle constitue un exemple de chromatographie d'adsorption dans laquelle, l'élément destiné à être purifié est adsorbé par une substance complémentaire appelée Ligand, immobilisée par un support appelé Matrix.

L'affinité du fragment Fc des molécules d'IgG de nombreux mammifères pour la protéine A sépharose en fonction du pH, est un fait immunologique connu.

IgG₁ et IgG₂ de chèvres peuvent ainsi être isolées par chromatographie sur protéine A sépharose à différents pH.

Technique

Mettre la protéine A sépharose dans la colonne. Ajouter la solution d'acide acétique 0,1 M pH 2,6, et vérifier^{que} ce pH dans la colonne de sépharose est le même 2,6.

Procéder de la même façon avec une solution de Na_2HPO_4 0,1 M pH 9,6 contenant NaN_3 . La colonne de sépharose est ainsi équilibrée.

Le sérum de chèvre dialysé contre une solution tampon de Na_2HPO_4 0,1 M pH 9,6 est placé dans la colonne.

Les fractions protéiniques sont collectées dans des tubes à hémolyse au fractionnateur LKB.

On procède avec deux solutions tampon de $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1 M pH 5,9

$\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 0,1 M pH 5,0

On obtient deux pics correspondant aux fractions IgG_1 et IgG_2 du sérum de chèvre. La densité optique de chaque pic est déterminée afin de calculer les taux de protéines sériques fractionnées.

IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

I - MARQUAGE DE L'IGG PAR L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCÉINE

Dans une membrane à dialyse, mettre 1 ml de protéines sérique à travers la colonne de DE 52 (IgG pure) + 1 mg d'isothiocyanate de fluorescéine.

Placer la membrane dans un béccher renfermant 10 ml de tampon carbonate bicarbonate pH 9,5.

Dialyser les protéines dans l'isothiocyanate pendant 18 heures,

Purifier les protéines conjuguées à la fluorescéine à travers une colonne de DE52.

Des solutions à doses croissantes de NaCl dans du tampon PO_4 0,01 M pH 7,5 sont ajoutées dans la colonne.

On obtient différents pics correspondant aux tampons NaCl. La densité optique est lue à 280 et 495 nm pour chaque pic afin de déterminer la quantité de protéines conjuguée par la formule suivante

$$\frac{(D_{280} \times dilution) - \frac{0,25}{1,4} (D_{495} \times dilution)}{1,4} \times \text{volume}$$

La solution d'IgG conjuguée à la fluorescéine est concentrée au filtre amicon ou dans le polyéthylèneglycolle.

Le conjugué IgG à la fluorescéine est ainsi prêt pour le test d'immunofluorescence indirecte.

II - IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Principe :

Détection indirecte des anticorps sériques par un substrat chromogène qui se fixe sur le complexe Ag - Ac éventuel formé. L'isothiocyanate de fluorescéine a été conjugué à une IgG obtenue après purification par chromatographie d'échange d'ions.

Le résultat est obtenu par l'appréciation du degré de positivité allant de + à ++++.

.../...

Technique : Trois procédés ont été utilisés :

1. Procédé utilisant comme Ag des Trypanosoma brucei vivants
2. Méthode classique à partir de Trypanosoma brucei tués et fixés sur lames au méthanol.
3. Procédé utilisant des piroplasmes : Theileria parva et Theileria mutans.

Procédé 1 :

On dispose de Trypanosoma brucei isolés par chromatographie d'échange d'ions à travers la colonne de DE52 équilibrée avec du tampon PSG pH 8.0.

Les trypanosomes isolés ont été comptés. Le comptage a été ajusté à 2×10^7 trypanosome/ml. 100 μ l de la solution de trypanosomes isolés renferme 2×10^6 trypanosomes/ml. Mettre dans des tubes à centrifuger coniques 100 μ l de trypanosomes vivants + 100 μ l de serum dilué (chaque tube correspond à une dilution de serum) et incubé dans la glace pendant 20 mn.

Ajouter 3 ml de tampon PSG pH 8.0 et centrifuger à froid 3.000 tours/mn x 5 mn. Rejeter le surnageant et reprendre le lavage avec le tampon PSG comme précédemment.

Ajouter 100 μ l de conjugué dilué au 1/100 et incubé dans la glace pendant 20 mn. Laver 2 fois comme précédemment.

Ajouter 10 μ l de glutaraldehyde à 2 p.100 aux 100 μ l Ag-Ac conjugué pour bien fixer les trypanosomes. Prendre 10 μ l de trypanosomes vivants fixés, les déposer sur une lame dont les parois sont lutées avec du vernis à ongle. Examiner au microscope à immunofluorescence pour apprécier le degré de positivité.

Méthode de diagnostic très sensible. Cependant, les trypanosomes sont souvent dans la glace pour assurer leur survie. Si les trypanosomes meurent au cours du test, il sera impossible d'interpréter la fluorescence.

Procédé 2 :

Couramment utilisée dans notre laboratoire; la différence avec le procédé 1 est que l'on travaille sur des trypanosomes tués.

Procédé 3 :

On dispose de Schizonte de Theileria parva purifié par chromatographie d'échange d'ions et de Theileria mutans sur frottis de sang.

La souche de T. parva est diluée au 1/10 dans du serum albumine humaine à 2 mg/ml. Le frottis de sang de T. mutans est plongé dans du tampon PBS pH 7,2 pendant 5 mn pour permettre la déshémoglobination : laisser sécher et délimiter deux rangées de 5 cercles sur la lame à l'aide du vernis à ongle.

Pour T. parva : On utilise la lame prête, délimitée dans laquelle on met 25 µl de T. parva dans chaque cercle et on laisse sécher.

T. mutans : a déjà été fixé sur le frottis de sang.

Dans chaque cercle, déposer 25 µl de dilution de serum à tester. Les deux lames sont incubées en chambre fermée à la température du Laboratoire pendant 30 mn.

Jeter l'excès d'anticorps et laver dans du tampon PBS pH 7,2 2 x 15 mn.

Ajouter 10 µl de conjugué dilué au 1/1000 mélangé à 1000 µl de serum Albumine humaine et 10 µl de Bleu Evans dilué au 1/10.000.

incuber 30 mn et laver 2 x 15 mn comme précédemment.

Laisser sécher et faire le montage dans une solution de glycérol à 50 p.100 à pH 8.0. Examiner les lames au microscope à fluorescence.

Les Theileria parva : apparaissent très fluorescents dans les lymphocytes en cas de réaction positive.

Les Theileria mutans : deviennent fluorescents en cas de positivité.

Technique très sensible donnant de bons résultats.

L'intérêt du bleu Evans est de supprimer tout ce qui n'est pas spécifique à la fluorescence,

.../...

TEST IMMUNOSPECIFIQUE PAR COUPLAGE ENZYMATIQUE (E.L.I.S.A)

I - CONJUGAISON DE LA PHOSPHATASE ALKALINE TYPE VII-S A L'IGG POUR LE TEST ELISA

La phosphatase alcaline est centrifugée à froid. On rejette le surnageant et on ajoute l'IgG à la phosphatase alcaline.

Le mélange est dialysé contre une solution tampon PBS pendant 18 heures. On prendra soin de changer l'eau de dialyse.

Le glutaraldehyde est ajouté à la solution concentrée et est incubée à la température du laboratoire 1 h 30 mn. On concentre de nouveau.

Le rôle du glutaraldehyde est de solidifier la combinaison Enzyme-Immuno-globuline G. On transfère la membrane de dialyse dans une solution tampon tris-HCl 0.05 M pH 8.0 contenant du HgCl₂. On poursuit la dialyse à + 4°C pendant une nuit.

Le conjugué est ensuite dilué avec 4 ml de tampon tris-HCl contenant 1mM de MgCl₂, 1 p.100 de serum de lapin et 0.02 p.100 de NaN₂ (antibactérien). Le conjugué prêt est stocké à + 4°C en milieu sombre.

II - TEST ELISA

Principe : détection indirecte des anticorps sériques. La phosphatase alcaline marquée au glutaraldehyde a été conjuguée à une immunoglobuline G. Le substrat révélateur de la phosphatase alcaline est le paranitrophenyl phosphate qui donne une coloration jaune dont la densité optique est proportionnelle aux taux des protéines sériques.

Technique : 20 µg/ml de Trypanosomes congolense purifiés par la méthode de Lanham sont dilués dans une solution tampon PBS pH 6.3 0,01 M renfermant Na₂N₂.

Déposer 250 µl de trypanosomes dans chaque cupule et incuber + 4°C pendant une nuit. Jeter l'excès d'Ag et laver avec le PBS. Dans chaque cupule, ajouter 250 µl d'albumine de lapin 5 mg/ml dans PBS 0,01M pH 6.3 et laisser à nouveau + 4°C pendant une nuit. Le rôle du serum albumine est d'occuper les places libres laissées par les antigènes qui ne se sont pas fixés (excès d'Ag).

Laver les cupules avec le tampon lavage (PBS 0,01 M pH 7,2 tween 20 à 0,5 p.100).

4 lavages de 5 mn. Les plaques sont ainsi sensibilisées.

.../...

III - TEST PROPREMENT DIT

Les serums à tester sont dilués avec le mélange suivant : PBS pH 7,2 + 0.5 p.100 tween 20 dilutions du 1/100 au 1/31,250.

200 µl de dilution serique sont ajoutés dans chaque cupule. On incube 2 heures à la température du laboratoire et on lave 4 x 5 mn.

200 µl de conjugué dilué au 1/500 sont mis dans chaque cupule et on incube 2 h et on lave 4 x 5 mn.

Ajouter 200 µl de paranitrophenyl phosphate 1 mg/ml dans du tampon carbonate 0.05 M pH 9,6. Incuber à 37°C pendant 30 mn et arrêter la réaction par addition de 50 µl de NaOH 3 M. Lire la densité optique à 405 nm.

Nous avons obtenu de bons résultats dans l'ensemble. Cependant, on peut noter que ces derniers sont susceptibles de varier d'un laboratoire à un autre sous l'effet de certains paramètres parmi lesquels il est nécessaire de mentionner la température. A l'ILRAD, les réactions se sont déroulées à 18°C alors qu'elles devraient normalement avoir lieu à 37°C.

Des erreurs peuvent également provenir du fabricant de la plaque. Le chronométrage des lavages doit se faire exactement sinon il peut aussi induire des erreurs,

IMMUNODIFFUSION

I - PRINCIPE

Détection directe d'anticorps dans le sérum. Le gel d'agarose renferme au centre l'antigène et les sérums à tester sont déposés dans des creux situés tout autour de l'antigène. Il se forme des arcs de précipitation là où antigène et anticorps se rencontrent dans des proportions convenables. Le diamètre des arcs de précipitation est proportionnel à la concentration en antigène. Plus le diamètre de l'arc formé est grand, moins il y a d'antigène et inversement.

II - TECHNIQUE

Recouvrir la lame d'agarose à 0.15 p.100 + 0.05 p.100 NaN_2 et laisser sécher. Recouvrir la lame de nouveau avec une solution d'agarose 0.8 p.100 + 0.01 p.100 Thiomarsalate et laisser sécher. Des trous sont creusés dans le gel. Déposer l'Ag dans le trou du centre et les sérums à tester tout autour. Incuber 24 heures dans une boîte de pétri renfermant 0.05 p.100 de NaN_2 .

Procéder à l'épreuve du pressing de la façon suivante :

La lame déposée sur la pailleasse est recouverte d'eau distillée et de papier filtre Wattman. Mettre sur le papier filtre une quantité importante de Kleenex pour absorber l'eau distillée. Un flacon est déposé sur le Kleenex pendant 1/2 heure. Enlever le flacon, le kleenex et laisser le papier filtre sur lequel on verse l'eau distillée jusqu'à ce que l'on puisse l'enlever sans difficulté.

On constate après que l'agarose devient fine.

Plonger la lame dans une solution tampon PBS pH 7.4 en boîte de pétri pendant une heure. On répète 5 fois le lavage en utilisant de l'eau distillée à la place du PBS toutes les 1/2 heures.

La lame est séchée et colorée par le colorant suivant :

- . Bleu de coomassie : 0,25 g
- . Ethanol : 22,5 ml
- . Acide acétique glacial : 5,0 ml
- . H_2O distillée : 22,5 ml

.../...

La lame est placée dans la botte de coloration pendant 2 heures. On lave et on procède à la décoloration par le décolorant suivant :

. Tout le colorant sauf le bleu de coomassie (ethanol + acide acétique + H₂O distillée).

Le pressing et la coloration nous ont permis d'avoir des réactions facilement interprétables.

.../...

IMMUNOELECTROPHORESE

I - PRINCIPE

Détection directe d'anticorps dans le serum. On fait migrer l'antigène dans une chambre électrophorétique pendant 1/2 heure de l'anode vers la cathode. Le serum à tester est déposé dans un creux sur le sens de la longueur de la lame et on laisse 24 heures à la température du laboratoire. Si le serum contient des anticorps spécifiques à l'antigène, il se forme des arcs de précipitation révélant la réaction Ag - Ac. Il s'en est résulté ainsi une simple diffusion de l'anticorps vers l'antigène spécifique.

II - TECHNIQUE :

Comme pour l'immunodiffusion, la lame est recouverte d'agarose 0,15 p.100 et est séchée. La lame est recouverte de nouveau de gel d'agarose 1,2 p.100 + 0,01 p.100 de Thiomersalate.

L'Ag est déposé dans des trous creusés dans le gel. On place la lame dans une chambre électrophorétique renfermant le Running buffer suivant :

- 55 mg/100 ml Barbitone
- 350 mg/100 ml sodium barbitone pH 8,6
- 51 mg/100 ml de lactate de calcium.

Laisser migrer les fractions antigéniques dans la chambre à 1 mA pendant 1 h 30 mn. Au bout de 1 h 30 mn, creuser dans le sens de la longueur de la lame, une rigole où on place le serum à tester et laisser 24 heures à la température du Laboratoire.

Procéder à l'épreuve du pressing et de la coloration de manière identique à l'immunodiffusion.

.../...

TRANSFORMATION LYMPHOBLASTIQUE PAR LA CONCANAVALINE A

I - PRINCIPE

La concanavaline A provoque la multiplication des lymphocytes T du sang. Sous l'action de la concanavaline A, les lymphocytes subissent des divisions cellulaires ou mitose. La transformation est mesurée par l'incorporation d'UDR 125,

II - TECHNIQUE

• Le sang obtenu par ponction veineuse dans l'héparine est dilué au 1/2 dans une solution saline stérile.

Dans un tube à centrifuger conique, mettre : 5 ml de ficelle hypaque + 6 ml de sang hépariné dilué au 1/2. Laisser écouler doucement le sang de manière à ne pas mélanger le sang au ficelle. Centrifuger 1.500 tours/mn pendant 10 mn.

Prélever les cellules blanches à l'interphase et les mettre dans un autre tube dans lequel on ajoute du tampon Alsever pH 6.1 pour laver (bien mélanger Alsever + Cellules blanches), Centrifuger 3 x 10 mn pour bien laver les cellules blanches. Ajouter au culot 1 ml de milieu de culture L15 après la dernière centrifugation et bien mélanger.

Mettre dans un tube 0.9 ml de Bleu de Toluène + 0.1 ml de cellules blanches et compter le nombre de lymphocytes au microscope ordinaire.

Nombre de lymphocytes/ml de sang = n (nombre compte) x dilution (10) x 10⁴.

Cette étape constitue la purification des lymphocytes du sang.

• Préparation de la Concanavaline A

La concanavaline A est extraite d'une plante la Jackbean et a un poids moléculaire de 71.000. Elle se fixe sur le groupe CHO des protéines et est bloquée par l'α méthyl manoside.

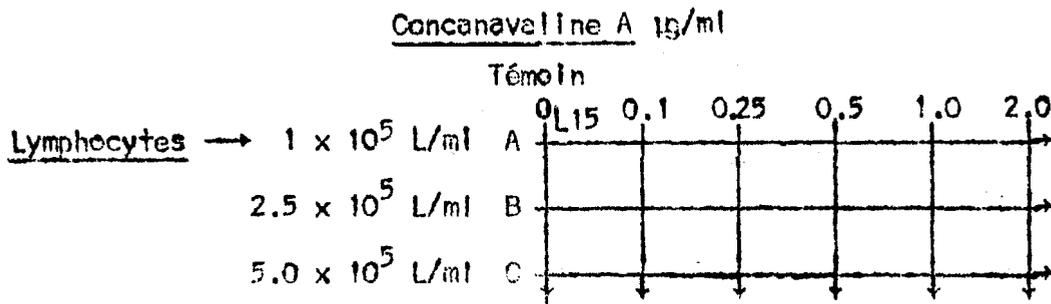
La concanavaline A est obtenue en poudre lyophilisée diluée à 1 mg/ml en solution saline, filtrée, stérilisée et congelée à -80°C.

.../...

III - TEST PROPREMENT DIT

II est effectué sur une plaque de microtitration. Chaque cercle renferme un volume final de 0.2 ml. On utilise plusieurs doses de concanavaline A et plusieurs concentrations de lymphocytes.

On procède selon le schéma suivant :



Concanavaline A : 500 μg/ml dilué au 1/25 → 2.0 μg/ml

Les dilutions de concanavaline A et de lymphocytes sont réalisées dans le milieu de culture L₁₅. La plaque est incubée à 37°C en atmosphère humide avec 5 p.100 de CO₂ pendant 3 jours.

Récolte et comptage

Ajouter dans chaque cupule 0.5 μci UDR + ¹²⁵I. Les cellules sont récoltées sur du papier filtre spécial qui retient l'A.D.N. cellulaire et permet l'élimination de la partie radioactive non fixée. Cela est suivi d'une multiplication automatique sur HARVESTER.

La radioactivité est obtenue en une minute au compteur gamma.

.../...

TEST D'ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES DU SANG

I -- PRINCIPE

Les lymphocytes sont isolés dans le sang par la ficolle hypaque.

La vitalité des lymphocytes est estimée par le test d'exclusion du bleu trypan.

- Cellules mortes : colorées en bleu
- cellules vivantes : incolores et bien nettes,

II - TECHNIQUE

Dans un tube siliconé, mettre 3 ml de ficolle hypaque + 2 ml de sang : verser légèrement le sang.

Centrifuger 30 mn. Prélever le surnageant et le mettre dans un tube siliconé dans lequel on ajoute 4 ml de FCS (serum foetus de veau). Centrifuger de nouveau.

Rejeter le surnageant et mettre le culot de cellules blanches dans la glace (200 μ l). Dans un tube à hémolyse, mettre 100 μ l de cellules blanches + 50 μ l de bleu de trypan. Prélever 25 μ l du mélange et compter les cellules blanches dans la chambre au microscope.

Ce test trouve son application en immunité cellulaire dans la différenciation des lymphocytes.

TEST D'AGGLUTINATION SUR LAME

I - **PRINCIPE**

Les trypanosomes vivants sont agglutinés par les anticorps sériques spécifiques. Ces derniers se fixent sur l'antigène de surface du trypanosome, Test simple permettant d'apprécier le degré d'agglutination du trypanosome.

II - **TECHNIQUE**

L'antigène est constitué par des trypanosomes brucei vivants purifiés par la méthode de Lanham dans du FCS à 10 p.100.

Délimiter des cercles sur une lame. Chaque cercle correspond à une dilution de serum.

Déposer 10 µl de trypanosomes vivants dans chaque cercle. Mettre 10 µl des différentes dilutions sériques. Recouvrir la lame d'une lamelle et faire l'examen au microscope.

S'il n'y a pas d'agglutination Incuber la lame 10 mn dans une chambre. Après l'incubation, lire l'agglutination qui est visible si le serum renferme des anticorps spécifiques à l'antigène.

TEST D'INCUBATION ET D'INFECTIVITE DU SANG (B.I.I.T)

I - PRINCIPE

Différentes formes de Trypanosoma brucei peuvent être rencontrées chez l'homme, Les trypanosomes sont mis en présence du serum humain dans un premier temps. Dans le second temps, ils sont Inoculés à des souris qui sont suivies régulièrement par des frottis de sang pour voir la présence ou l'absence de parasites.

S'il y a présence de parasites dans le sang de la souris on note B.I.I.T (+) et l'homme peut être infecté par le parasite (Trypanosoma brucei rhodesiense). S'il n'y a pas de parasites dans le sang de la souris, on a B.I.I.T. (-) et l'homme ne peut être infecté par le parasite.

II - TECHNIQUE

On réalise 3 essais et 3 témoins.

Témoin 1 ml PSG pH 8.0 + 0.2 ml de trypanosomes dans le sang 10^7 /ml

Essai : 1 ml serum humain + 0.2 ml de trypanosomes 10^7 /ml dans le sang.

Nous avons manipulé les 3 souches suivantes :

- 1.702 Trypanosoma brucei brucei
- 1.797 Trypanosoma brucei rhodesiense
- 433 Trypanosoma vivax.

Incuber les tubes à 37°C pendant 5 heures.

Réaliser 3 frottis colorés au giemsa après fixation au méthanol sur les tubes essais après 30 m - 30 m - 180 m - 240 m d'incubation.

A 240 m d'incubation, réaliser des frottis sur tous les tubes aussi bien essais que témoins.

Observer les lames au microscope pour apprécier l'état des trypanosomes s'ils sont lysés ou non.

Le contenu de chaque tube est inoculé à 4 souris à raison de 0.2 ml chacune par voie intrapéritonéale.

Tous les Jours, prise de sang à la queue et observation au microscope ordinaire pour apprécier le degré de parasitémie.

.....

- T. brucei brucei infecte les souris, mais ne peut infecter l'homme à cause d'un glycolipide de poids moléculaire 100.000.
- T. brucei rhodesiense est capable d'infecter l'homme.

Ces deux formes de Trypanosoma brucei sont sensiblement identiques, Par prudence, le port de gants en cours de cette manipulation est indispensable pour éviter les risques d'infection.

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE

I - MARQUAGE DE L'ANTIGÈNE PAR L'IODE 125

Rincer la colonne avec une solution tampon phosphate pH 7.4. La remplir de sephadex G 25 et rincer de nouveau avec le tampon. Le tampon est recueilli dans un bécher et la partie inférieure de la colonne fermée.

Mettre dans un flacon 25 µl de serum albumine bovine (Antigène) + 10 µl d'Iode 125 + 25 µl de Chloramine T et attendre 2 mn.

La chloramine T indique le début du marquage.

Ajouter dans le même flacon 25 µl de métabisulfite de sodium. Le mélange est versé dans la colonne de sephadex G 25.

Le métabisulfite de Na arrête le marquage.

25 µl d'antigène marqué sont récoltés dans des tubes à hémolyse et les fractions sont comptées toutes les 20 secondes.

Ajouter la solution tampon phosphate dans le mélange d'antigène marqué qui est ensuite précipité par la TCA à 20 p.100.

Centrifuger le précipité et mesurer sa radioactivité au compteur gamma.

II - DÉTERMINATION DES DIFFÉRENCES D'AVIDITÉ ENTRE DEUX SÉRUMS PAR FARR ASSAY

Deux antisérums sont dilués dans du tampon PBS à 25 p.100 de même que l'antigène (serum Albumine bovine marqué à l'Iode 125) : 1/10 - 1/100 - 1/1000 - 1/10.000 ; les dilutions sont réalisées dans des tubes à hémolyse.

Dans chaque dilution d'antiserum, ajouter une dilution d'Ag marquée correspondant. Incuber 40 mn à la température du Laboratoire.

Mesurer la radioactivité de la liaison Antigène - anticorps.

Mettre dans chaque tube $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ à 50 p.100 pour précipiter le complexe Ag - Ac. Centrifuger le précipité et déterminer la radioactivité du complexe antigène - anticorps. Ce taux de radioactivité est proportionnel aux taux fixés par l'antiserum.

Représenter le pourcentage du complexe en fonction des différentes dilutions de l'antiserum.

.../...

D'après **notre expérience!** l'antiserum **A** s'est révélé **plus** avide **que** l'antiserum **B**.

Expérience très sensible **et** récente, **ca** **qui** fait **qu'elle** est bien placée **pour être couramment** utilisée **dans** l'avenir.

.../...

CONCLUS IONS ET REMERC IEMENTS

CONCLUSIONS

Les cours suivis à l'ILRAD nous ont permis d'acquérir une série de connaissances théoriques et pratiques :

- Pour la partie théorique : les principes de base de l'immunologie ont été largement passés en revue : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. La biosynthèse des protéines de même que les réactions enzymatiques ont été étudiées.

- Pour la partie pratique : de nombreux tests de diagnostic séro-immunologiques ont été réalisés :

- . par détection indirecte d'anticorps dans le serum ;
- . par détection directe d'anticorps sériques ;
- . par agglutination d'antigène par des anticorps spécifiques.

La plupart de ces techniques sont sensibles et nous ont donné de bons résultats dans l'ensemble.

Le matériel mis à notre disposition pour nos séances de travaux pratiques a été de haute qualité.

Dans la limite de nos moyens, nous pourrions affiner ces techniques dans nos diagnostics immunologiques propres et accomplir ainsi des progrès.

L'ILRAD conduisant ces cours de perfectionnement sur le diagnostic des maladies hémoparasitaires, apporte un grand concours dans le domaine de la recherche vétérinaire dans nos pays.

REMERCIEMENTS

- **A Monsieur le Dr A. GRAY** : Directeur général de l'ILRAD pour l'accueil chaleureux qu'il nous a réservé à notre arrivée à Nairobi. Profonde admiration et hommage respectueux.
- **A Monsieur le Dr Jim LENAHAN** : Chef de la Division de la formation qui nous a accordé l'admission à ces cours avec toute sa sympathie. Nous lui adressons l'expression de notre sincère gratitude.
- **A Monsieur le Dr Jack DOYLE** : Chef du Service de Parasitologie, responsable de l'encadrement de ces cours. Le parfait déroulement des cours témoigne de tant d'efforts consentis pour nous. Nous lui adressons nos plus vifs remerciements.
- Ces remerciements s'adressent également au **corps professoral** de l'ILRAD qui nous a fourni des connaissances de base en matière d'immunologie et de biochimie de par l'excellente qualité de l'enseignement.
- **A Mesdames RAVI et NASEEM** : dynamiques techniciennes du service de Parasitologie du Dr DOYLE qui n'ont jamais cessé de nous apporter le concours nécessaire au bon déroulement de nos travaux pratiques. Nous leur adressons notre profonde gratitude et nos meilleurs souvenirs.