

**ANNEE UNIVERSITAIRE 1973-1974**

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DIAGNOSTIC  
EXPERIMENTAL DES TRYPANOSOMOSES BOVINES  
PAR IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE AU SENEGAL**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement le 18 Avril 1974  
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de DAKAR  
pour obtenir le grade de DOCTEUR VETERINAIRE  
**DIPLOME D'ETAT**

Par

**Malang SEYDI**

Né le 8 Septembre 1943 à BEMET (Sénégal)

Président de Thèse : M. Jacques LINHARD Professeur à la Faculté Mixte de Médecine et  
de Pharmacie de DAKAR



DIRECTEUR : Professeur Jean FERNEY

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT POUR L'ANNEE UNIVERSITAIRE 1973-1974

I - PERSONNEL A PLEIN TEMPS

FERNEY Jean	Professeur	Pathologie médicale - Pathologie de la Reproduction
CUQ Pierre	"	Anatomie - Histologie - Embryologie
BUSSIERAS Jean	"	Parasitologie - Zoologie
ROZIER Jacques	"	Anatomie pathologique - Hygiène des denrées alimentaires d'origine animale
CHANTAL Jean	Maître de conférences	Microbiologie - Immunologie - Pathologie infectieuse
N'DIAYE Ah.Lamine	Maître-assistant	Zootchnie - Alimentation
SERE Alassane	"	Physiologie
GOMEZ Charles	Assistant	Parasitologie - Zoologie
KANE-DIALLO Aby	"	Microbiologie - Immunologie
CORDIER François	"	Clinique et Physiologie
LOEILLLOT Denis	"	Anatomie
DESCHAMPS Bernard	"	Hygiène des denrées alimentaires d'origine animale
RICHARD Christian	"	Parasitologie et Zootchnie

## II - PERSONNEL VACATAIRE

SYLLA Oumar	Professeur Fac. Pharmacie	Pharmacie - Toxicologie
GRAS Georges	Maître de conférences	Toxicologie
BELLOSI André	Professeur Fac. Pharmacie	Biophysique
JOSELIN Jacques	Professeur Fac. Pharmacie	Biochimie
NONGONIERMA Antoine	Assistant Fac. Sciences et IFAN	Botanique
LEPRUN Jean-Claude	Chargé de Recherches - ORSTOM	Agronomie
GIONO Humbert	Professeur Fac. Pharmacie	Pharmacodynamie - Thérapeutique
FOURRIER Charles	Maître de conférences	Droit administratif
NIANG Madiké	Assistant Fac. Lettres	Climatologie

### III - PERSONNEL EN MISSION

LESCURE Francis	Professeur ENV* - Toulouse	Pathologie <b>Mé</b> dicale
MILHAUD Georges	Maître de conférences ENV - Lyon	Nutrition - Alimentation
LENIHOUANEN Jean	Maître-Assistant Agrégé - ENV - Lyon	Pathologie <b>Chir</b> urgicale
FROGET Joseph	Professeur ENV - Lyon	Zootchnie - Productions animales
FARGEAS Jean	Maître de conférences ENV - Toulouse	Neurophysiologie
BADOUIN Robert	Maître de conférences Fac. Sciences Eco. Montpellier	Economie <b>Rur</b> ale

\* ENV : Ecole Nationale Vétérinaire

LA FACULTE DE MEDECINE ET L'ECOLE VETERINAIRE DE DAKAR  
DECLARENT QUE LES OPINIONS EMISES DANS LES DISSERTA-  
TIONS QUI LEUR SERONT PRESENTEES, DOIVENT ETRE CON-  
SIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS ET QU'ELLES  
N'ENTENDENT LEUR DONNER AUCUNE APPROBATION NI IMPROBATION

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS PARENTS ET ONCLES

A MON PERE

Ce travail est l'aboutissement de ta patience  
et des durs sacrifices consentis avec tant de  
compréhension.

Puissé-je te procurer les plus grandes satisfactions.

A MA MERE

Ta bénédiction de tous les jours dictée par  
ton ardent amour pour tes enfants m'a toujours accompagné.

Sois ici remerciée.

A MON EPOUSE

Grâce à ton courage mais aussi à la soigneuse attention  
que tu as toujours portée à tout ce qui me touche,  
tu as su patiemment partager les difficultés d'une  
vie d'étudiant. Je te dédie ce travail, modeste  
témoignage de mon amour.

A MES ENFANTS ET NEVEUX

Votre papa et oncle qui vous adore.

A MES FRERES, SOEURS, COUSINS, ET COUSINES

Votre cousin et frère qui vous souhaite beaucoup  
de chance.

A MON ONCLE Karamo SEYDI ET FAMILLE

A TONTON EL HADJI OUSMANE MANE ET FAMILLE

C'est sous votre guide que j'ai franchi  
mes premières années d'école.

Recevez ici l'expression de toute ma gratitude.

A TONTON Mouhamadou Lamine CAMARA

A TONTON EL HADJI Latir N'DIAYE et FAMILLE

A MES GRANDS PARENTS

Mama Manding SEYDI

Lala DAFEE

en remerciement de l'estime que vous avez toujours eu  
pour moi.

A MES BEAUX PARENTS

Toute ma reconnaissance

A tous mes oncles et Tantes

A tous mes parents, camarades et amis

A la Jeunesse de Bemet

Aux contribuables sénégalais et au FED

Qui m'ont permis de poursuivre mes études

A nos maîtres de l'Ecole Inter-Etats

Vous qui n'avez ménagé aucun effort pour nous dispenser un  
enseignement de qualité malgré les multiples difficultés de  
début. Hommages très respectueux et profonde reconnaissance

*A nos anciens*

Au **Professeur** Jean FERNEY

Directeur de l'Ecole vétérinaire de Dakar  
Pour l'attention que vous portez à vos étudiants  
et à l'Ecole - Hommages très particuliers et chaleureux  
remerciements

Au Docteur M. Souleymane DIALLO

Directeur de l'Elevage et des Industries animales du Sénégal

Au Docteur ORUE

Directeur Régional de l'Institut d'Elevage et de Médecine  
vétérinaires des pays tropicaux  
Qui m'a aimablement accueilli dans son établissement pour  
l'élaboration de ce travail  
Sincères remerciements

Au Professeur François DIENG

En œuvrant pour la création de l'Ecole vétérinaire à Dakar  
Vous nous avez permis de poursuivre nos études sur place  
Très respectueux hommages

Au Docteur BLANC

Premier responsable de l'Institut des Sciences et Médecine  
Vétérinaires de Dakar

Au Docteur Mme Marie Thérèse BASSE

Directrice de l'Institut de Technologie Alimentaire

Au Professeur I. SAVIC et famille

Toute ma sympathie

Au Personnel de l'I.T.A.

Au Personnel de la Section de Parasitologie  
du Laboratoire national de l'Elevage du Sénégal  
Toute sympathie et tous remerciements

A Mesdames NDIAYE et FAYE

Du Secrétariat du Laboratoire national de l'Elevage du Sénégal  
Pour votre compétence



Au Docteur Saydil Moctar TOURE

Chef de la Section de Parasitologie du Laboratoire national de l'Elevage du Sénégal

Il nous a inspiré le sujet de ce travail et nous a guidé dans sa réalisation technique.

Nous lui dédions ce travail, modeste gage de notre indéfectible attachement et de notre profonde reconnaissance

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué soit à ma formation, soit à la réalisation de ce travail.

A notre Directeur de Thèse

Le Professeur Jean BUSSIERAS  
Professeur de Parasitologie et de Zoologie  
appliquée

Votre aide et vos conseils ne nous ont jamais fait défaut. La clarté de votre enseignement jointe à votre affabilité resteront toujours un vivant souvenir pour nous.

Témoignage de notre respect et notre gratitude.

A notre Président de Thèse

Le Professeur Jacques LINHARD

Biologiste des Hôpitaux  
Professeur d'Hématologie  
Directeur du Centre National de Transfusion du Sénégal  
Chevalier de la Légion d'Honneur  
Officier de l'Ordre National du Sénégal

En remerciement pour l'honneur que vous nous faites  
de présider le Jury de notre thèse

Hommages très respectueux

A nos JUGES

Monsieur le Professeur Oumar SYLLA

Pharmacien des Hôpitaux  
Docteur d'Etat-es Sciences Naturelles  
Agrégé de chimie analytique  
Chef du service de chimie organique de la Faculté  
de Médecine et de Pharmacie.  
Chargé d'enseignement à l'Ecole Inter-Etats des  
Sciences et Médecine vétérinaires

Monsieur Pierre CUQ

Professeur anatomie-Histologie et Embryologie

Monsieur Jean CHANTAL

Maître de conférences agrégé  
Pathologie infectieuse - Immunologie

En témoignage de notre gratitude pour l'honneur  
qu'ils nous font de siéger à notre Jury.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DIAGNOSTIC  
EXPERIMENTAL DES TRYPANOSOMOSES  
BOVINES PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE  
AU SENEGAL

PLAN D'ETUDE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : Méthodes générales de diagnostic des  
trypanosomoses - Immuno-fluorescence

CHAPITRE PREMIER : Méthodes générales de diagnostic des trypanosomoses

- A/ Le Diagnostic clinique
- B/ Le Diagnostic expérimental

CHAPITRE II : L'immuno-fluorescence et son application aux trypanosomoses.

- I/ Historique
- II/ Principe général de l'immuno-fluorescence
- III/ Techniques de diagnostic par Immuno-fluorescence
- IV/ Applications de l'Immuno-fluorescence indirecte au diagnostic des protozooses et des trypanosomoses en particulier.

DEUXIEME PARTIE : Essais de diagnostic dans les trypanosomoses  
bovines expérimentales

CHAPITRE PREMIER : Matériel et méthode

- A/ Méthode générale
- B/ Matériel
- C/ Mode d'interprétation des résultats

CHAPITRE II : Résultats des essais de diagnostic

- A/ Epreuves réalisées avant traitement des bovins infectés
- B/ Tests après traitement des animaux
- C/ Etude comparative des immun-sérums avant et après traitement.

D/ L'Immuno-fluorescence indirecte :  
Valeur dans le diagnostic des trypanosomoses  
bovines expérimentales

### TROISIEME PARTIE

Essais de diagnostic dans les trypanosomoses naturelles  
Valeur dans l'épizootiologie des trypanosomoses bovines

CHAPITRE PREMIER : Etude sur troupeaux suspects de trypanosomoses.

- A/ Bovins de Kaffrine et Koungheul
- B/ Bovins de Sokone

CHAPITRE II : Etude sur troupeaux inconnus

- A/ Bovins du Brésil
- B/ Bovins du Fouta

CHAPITRE III : Valeur de l'immuno-fluorescence indirecte dans les  
trypanosomoses bovines naturelles

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

## INTRODUCTION

Les trypanosomoses bovines figurent en bonne place parmi les dominantes pathologiques qui préoccupent les services de l'élevage des pays africains au sud du Sahara. Sans causer les ravages de la peste ou de la péripneumonie contagieuse bovines, elles revêtent tout de même une très grande importance du fait qu'elles sont une des causes de la carence protidique qui affecte les populations africaines par suite des déficits dans les productions de viande. Mornet (31) dans une étude sur les hématozooses animales montre cette importance à travers plusieurs considérations ayant pour corollaire les trypanosomoses et qui se résument comme suit :

- Difficulté de l'élevage des bovins sensibles (zébus, diakorés) surtout dans les régions très riches en glossines,
- péjoration de l'élevage autochtone dans ces régions de type guinéen ou forestier (races trypanotolérantes mais de format très petit),
- privation de l'homme de quantités énormes de viande et de lait,
- soustraction à l'agriculture de tonnages importants de fumiers,
- perte de journées de travail (traction - labourage) qui permettraient d'augmenter les étendues cultivées actuellement très faibles.

Cette étude de MORNET fait bien ressortir l'importance des trypanosomoses animales. Elle retrouve son expression chiffrée dans l'estimation qui évalue à 10 millions de km<sup>2</sup>, les superficies privées d'élevage à cause des glossines vectrices de trypanosomes en Afrique, glossines dont l'absence permettrait à ces zones de nourrir en plus 125 millions de têtes, soit une population bovine supérieure à toute la population bovine actuelle du continent africain (11).



Cette importance est également rapportée par WILSON (5) qui pense que sans les glossines et autres diptères hématophages vecteurs de trypanosomes, certaines régions pourraient nourrir un cheptel double.

Partant de ces arguments, il s'avère normal pour les spécialistes de l'alimentation de dire que le problème des trypanosomoses est l'une des grandes causes de la carence de l'Afrique en protéines animales. Aussi, peut-on justifier avec raison, tout l'arsenal de moyens que les services vétérinaires africains ne cessent de mettre en oeuvre pour venir à bout de telles affections. Et cette lutte entreprise ne saurait être efficace que si elle est menée sur 2 fronts :

- d'abord dans le milieu extérieur où il s'agit de détruire les vecteurs de la maladie : c'est la prophylaxie indirecte et celle-ci constitue l'aspect le plus important de la lutte antitrypanosomienne mais aussi le plus décevant du fait des nombreuses difficultés qu'elle présente (très vastes superficies à traiter, coût élevé des opérations, danger des insecticides qui agissent de façon indiscriminée etc.).
- C'est pourquoi, les efforts sont souvent portés sur la prophylaxie directe et le traitement qui sont eux menés sur l'animal vivant par l'utilisation des trypanocides. Cette 2ème forme de lutte n'est pas cependant si aisée car elle suppose des connaissances de clinique et d'épizootiologie des trypanosomoses ; dépistage des animaux parasités, détermination des espèces de trypanosomes et fréquence de la maladie selon les régions. Cela indique l'importance des méthodes de diagnostic, méthodes dont l'une, l'immunofluorescence indirecte fait l'objet de la présente étude.

PREMIERE PARTIE

METHODES GENERALES DE DIAGNOSTIC

DES TRYPANOSOMOSES - IMMUNO - FLUORESCENCE

## PLAN DE LA PREMIERE PARTIE

### CHAPITRE PREMIER

Méthodes générales de diagnostic des trypanosomoses

- A/ Le Diagnostic clinique
- B/ Le Diagnostic expérimental

- I/ Les méthodes directes
- II/ Les méthodes indirectes

- II/1 - La réaction de fixation du complément ou d'hémolyse
- II/2 - L'hémagglutination indirecte
- II/3 - L'immuno-électrophorèse et l'immuno-diffusion
- II/4 - L'immuno-fluorescence.

### CHAPITRE II

L'immunofluorescence et son application aux trypanosomoses

- I/ Historique
- II/ Principe général de l'immuno-fluorescence
- III/ Techniques de diagnostic par Immuno-fluorescence

- A/ Méthode directe
- B/ Méthode indirecte proprement dite ou méthode de WELLERS et COONS (1954).
  - La méthode par inhibition de la fluorescence
  - La méthode de l'anticomplément
  - La méthode de double coloration.

IV/ Applications de l'immuno-fluorescence indirecte au diagnostic  
des Protozooses et des trypanosomoses en particulier

A/ L'immuno-fluorescence dans les protozooses humaines

B/ L'immuno-fluorescence indirecte dans les trypanosomoses  
bovines

## CHAPITRE PREMIER

### METHODES GENERALES DE DIAGNOSTIC

#### DES TRYPANOSOMOSES (11)

Dans les trypanosomoses animales, les différentes méthodes de diagnostic peuvent se résumer comme suit :

##### A/ - Le Diagnostic clinique

Il est fondé sur une symptomatologie peu caractéristique (fièvre ; anémie ; larmolement ; oedèmes et parésie du train postérieur inconstants). Aussi est-il souvent complété par le diagnostic de laboratoire

##### B/ - Le Diagnostic expérimental

Il dispose de deux groupes de moyens :

Les méthodes directes et les méthodes indirectes.

##### I - Les méthodes directes

Rassemblent l'ensemble des arguments expérimentaux qui permettent de mettre directement en évidence les trypanosomes chez l'animal.

Elles font ainsi appel à :

- l'observation microscopique de trypanosomes
- l'inoculation de prélèvements suspects à des animaux d'expérience
- la culture de matières biologiques recueillies sur l'animal suspect
- le xénodiagnostic ou diagnostic sur l'hôte intermédiaire.

La recherche microscopique des trypanosomes constitue le plus sûr de ces moyens de dépistage lorsque la parasitémie est élevée chez l'individu infecté. Il a également l'avantage d'être rapide et peu onéreux (peu de matériel biologique et chimique). Néanmoins il peut être défailant du fait de la rareté des trypanosomes dans le sang périphérique lors de faibles infections.

Quant aux trois derniers procédés, ils ne s'utilisent surtout que pour la confirmation des autres méthodes de diagnostic du fait de leur coût mais aussi du délai assez long nécessaire à leur réalisation et des nombreux facteurs qu'exige leur réussite (souche de trypanosomes en cause, l'animal utilisé, milieu de culture, élevage de glossines neuves etc.)

C'est pourquoi le diagnostic expérimental se tourne de plus en plus vers les méthodes indirectes pour obtenir des résultats dans des délais relativement courts.

## II - Les méthodes indirectes

L'argument sur lequel se fondent ces techniques est la mise en évidence des traces de la présence ou du passage des trypanosomes dans les humeurs des animaux suspects (sérum en particulier). Elles tentent en somme de déceler des anticorps se rapportant à des parasites connus utilisés comme antigène.

De là, la dénomination expressive de méthodes séro-immunologiques que porte ce groupe de techniques diagnostiques couramment appliquées au domaine de la pathologie vétérinaire ; les principales épreuves de ce diagnostic expérimental indirect sont :

## II/1 - La réaction de fixation du complément ou d'hémolyse

Pour certaines recherches qui lui furent consacrées, la réaction de fixation du complément serait une excellente méthode pour le diagnostic de la dourine des équidés (due à *T. equiperdum*) en zone tempérée : WATSON (22) et BALOZET (1946) (8) sont de cet avis. Pour d'autres, sa valeur serait très limitée sous les tropiques, dans le dépistage des trypanosomoses bovines : c'est ce que font ressortir les travaux de : ROBINSON (1929) sur *T. congolense*, HORNBY et BAILEY (1932) sur *T. brucei* et qui sont rapportés par KILLICK-KENDRICK (1968) (22).

En fait, la réaction de fixation du complément présente comme principale difficulté, l'obtention de l'antigène trypanosomien qui doit être extrait et purifié ; ensuite il y a les difficultés liées à la préparation du sérum hémolytique et à l'obtention du complément. Enfin son utilisation suppose l'existence d'une seule espèce de trypanosomes et selon certains auteurs, ce fait explique les résultats souvent décevants enregistrés en Afrique au Sud du Sahara où les animaux sont exposés à plusieurs espèces de trypanosomes. Aussi, cette méthode est-elle peu utilisée.

II/2 - L'hémagglutination indirecte a comme principe, l'agglutination des globules rouges préalablement traités par l'acide tannique et enrobés d'antigène provenant de trypanosomes broyés, lorsque ces globules sont mis en contact avec le sérum de l'animal suspect.

Ce test serait hautement sensible avec *T. evansi* GILL (1964) (22) bien que sa spécificité ne soit pas connue, et aurait donné de bons résultats avec cette espèce de trypanosomes. Cependant son intérêt est très limité dans le diagnostic sérologique des trypanosomoses bovines africaines en général ; c'est ce que rapportent les travaux de M'WAMBU (1967) (32) et WILSON (1969) (48).

Le diagnostic indirect fait aussi appel à :

II/3 - L'immuno-électrophorèse et l'immuno-diffusion (25)

Ce sont des procédés expérimentaux basés sur la recherche des macroglobulines (IgM) dans certaines matières biologiques recueillies chez les individus suspects (sérum, liquide céphalo-rachidien). Ils sont très connus en médecine humaine grâce aux travaux de MATTERN qui les appliqua aux trypanosomoses de l'homme à partir de 1961-1962 (27-28), CUNNINGHAM et collaborateurs (1966) (15). WERY et collaborateurs (1970) (39-40-41-42). Ces deux procédés auraient donné de bons résultats aussi bien dans le diagnostic individuel que dans les enquêtes épidémiologiques effectuées en zone d'endémie trypanosomienne (République Démocratique du Congo : actuel Zaïre).

Chez l'animal, de telles applications n'ont pas été faites sur une grande échelle ; notons seulement une étude de BIDEAU et GIDEL qui ont essayé la méthode par immuno-diffusion en Haute-Volta (1966) (9). Dans ce domaine, la difficulté essentielle réside dans la nécessité d'isoler des IgM bovines spécifiques d'une seule espèce de trypanosomes, ce qui explique le coût très élevé du réactif. D'autre part, l'interprétation des résultats obtenus par ces procédés suppose une parfaite connaissance de la technique. C'est pour toutes ces raisons qu'ils n'ont reçu qu'une audience très limitée dans le diagnostic des trypanosomoses bovines.

Ainsi donc, parmi toutes ces méthodes ci-dessus exposées, la plus importante et la plus sûre a toujours été l'observation microscopique de trypanosomes. En effet, la découverte de trypanosomes sur une lame, outre qu'elle ne laisse aucun doute sur la présence de trypanosomes chez un animal donné, permet aussi de faire un diagnostic spécifique de l'espèce en cause, ce qui n'est pas possible avec aucune des techniques sérologiques actuellement utilisées. C'est encore une méthode plus aisée, plus rapide qui l'emporte comme il a été dit plus loin sur les épreuves d'inoculation et d'hémoculture qui demandent plusieurs jours avant d'être positives.



II/4 - L'immunofluorescence (21)

C'est une méthode de diagnostic sérologique de pratique relativement récente. Elle a connu de nombreuses applications depuis que le matériel nécessaire à son exécution (microscope à fluorescence, conjugué fluorescent) est commercialisé. En sérologie parasitaire, son succès sans cesse grandissant est parti de l'utilisation que GOLDMAN en a faite pour étudier des amibes parasites de l'homme. Ce succès fut ensuite renforcé par FIFE et MUSCHEL (1959) (18) qui firent les premiers essais d'évaluation de la méthode dans la maladie de CHAGAS (*T. cruzi*). De nombreux autres travaux suivirent en matière de trypanosomoses humaines et dégagèrent l'intérêt de l'immunofluorescence en tant que technique de diagnostic de routine du fait de certains avantages non négligeables qu'elle présente :

- rapidité d'exécution (il est possible d'effectuer une grande série de tests en 2 h.30) ;
- simplicité (elle utilise un antigène facile à préparer contrairement à la réaction de fixation du complément) ;
- économie de matériel biologique (elle emploie peu de sérum pour plusieurs réactions).

Dans les trypanosomoses bovines, les études faites jusqu'ici, sont fragmentaires et ne permettent pas d'emblée de conclure aux possibilités d'utilisation de la méthode sur une grande échelle. Il est donc important de préciser sa valeur dans ce domaine pour l'appliquer éventuellement comme procédé de diagnostic courant dans les enquêtes épizootiologiques et comme moyen de contrôle des actions prophylactiques et thérapeutiques.

## CHAPITRE II

### L'IMMUNO-FLUORESCENCE ET SON APPLICATION

#### AUX TRYPANOSOMOSES

##### I/ - HISTORIQUE

Si la réaction d'immuno-fluorescence connaît actuellement un regain d'actualité et des applications majeures relativement récentes, il faut reconnaître que son principe est décrit depuis assez longtemps (décennie 1930-1940).

En effet, au cours de cette période, un grand nombre de recherches ont abouti à la conclusion importante qu'il est possible de conjuguer des protéines anticorps avec des composés chimiques divers sans que ces anticorps perdent la propriété de réagir spécifiquement avec les antigènes correspondants [MARRACK (1934), HAUROWITZ et BREINL (1932), HEIDELBERGER (1933) HOPKINS et WORMALL (1933)] (10).

Partant de ces observations, COONS et ses collaborateurs (1941) imaginèrent de combiner les protéines anticorps non plus avec de simples colorants, mais avec des substances colorantes à propriété fluorescente. Ils utilisèrent à cet effet l'isocyanate de fluorescéine qui, en se fixant aux immuno-globulines, donne des anticorps fluorescents ou conjugués fluorescents. Les anticorps marqués par le colorant fluorescent (fluorochrome) permettaient de déceler la présence des antigènes correspondants contenus dans un substrat fixé sur lame (1).

Ces travaux de COONS et collaborateurs marquent le début des applications de l'immuno-fluorescence.

Ces mêmes auteurs publient en 1942 une description détaillée de la préparation des conjugués fluorescents et leur utilisation dans la détection des antigènes pneumococciques de souris infectées, puis en 1952, une note sur la synthèse de l'isocyanate (21).

D'autres chercheurs ont entrepris des études sur la technique, tantôt pour la modifier, tantôt pour l'améliorer mais toujours en vue d'étendre ses domaines d'application. On trouve ainsi WELLERS et COONS(1952-1954) (21) qui devaient mettre au point une technique de coloration indirecte et tenter ensuite de l'utiliser comme procédé de diagnostic en Protozoologie.

Cette méthode ainsi élaborée par ces auteurs est actuellement d'application très courante dans nombre de maladies bactériennes ou parasitaires d'étiologie très diverse.

## II/ - PRINCIPE GENERAL DE L'IMMUNOFLUORESCENCE (1-13-19)

L'immuno-fluorescence est une technique immuno-sérologique spécifique, et comme telle, tend à visualiser le micro-complexe immunologique constitué par la liaison antigène-anticorps normalement invisible. Pour ce faire, la méthode a recours à un artifice particulier qui consiste à marquer l'anticorps à l'aide d'un colorant fluorescent ou fluorochrome ; la réaction de l'anticorps sur l'antigène homologue peut être visualisée du fait de la fluorescence observée par excitation du fluorochrome en lumière ultra-violette.

On distingue deux principales modalités d'application de ce principe :

- la méthode directe
- et la méthode indirecte.

### III/ - TECHNIQUES DE DIAGNOSTIC PAR IMMUNOFLUORESCENCE (13-1-19)

#### A/ - Méthode directe :

C'est la technique primitive de COONS et collaborateurs (1942). Elle consiste à mettre l'antigène directement en contact avec l'anticorps marqué ; il se forme un micro-complexe antigène-anticorps si Ag et Ac correspondent l'un à l'autre. Ce complexe fluorescent permet d'identifier l'antigène. Elle est peu utilisée comme méthode de diagnostic de routine, car elle nécessite un conjugué fluorescent pour chaque antigène considéré.

#### B/ - Méthode indirecte proprement dite ou méthode de WELLS et COONS (1954)

Conçue par ses auteurs pour pallier l'inconvénient majeur de la méthode primitive à savoir la nécessité de marquer individuellement les sérums appartenant à une même espèce, l'immuno-fluorescence indirecte fut appliquée pour la première fois par B.K. WATSON et A.H. COONS à l'étude des virus (1).

En Protozoologie, elle constitue également la première tentative d'application du test des anticorps fluorescents comme méthode diagnostique (COONS et collaborateurs 1954) car elle sert à différencier deux parasites intestinaux de l'homme. (*Entamoeba histolytica* et *Entamoeba coli*) (21).

Cette méthode convient à la recherche d'anticorps dans un sérum suspect, au moyen d'un frottis préparé avec l'antigène correspondant, en faisant intervenir une anti-globuline fluorescente qui sert d'indicateur marqué de la réaction Ag-Ac.

L'anti-globuline provient du sérum d'un animal hyperimmunisé avec une globuline de l'espèce à laquelle appartient le sérum à tester. Contrairement à la méthode directe, elle ne nécessite qu'un seul conjugué fluorescent anti-globuline pour examiner tous les sérums appartenant à une espèce animale.

Pour la réaliser, il suffit dans un premier temps, de déposer le sérum à tester sur la lame contenant l'antigène connu et d'incuber en chambre humide pendant 25 mn à 1h. Le micro-complexe Ag-Ac. formé (si le sérum contient les Ac.) est invisible (les Ac. n'étant pas marqués) ; puis dans un deuxième temps après lavage de 15 à 20 mn. de révéler la présence du micro-complexe grâce à l'antiglobuline marquée qui est déposée sur la lame. Au bout d'une nouvelle incubation dans les mêmes conditions que précédemment, la lame est à nouveau lavée, montée et examinée.

A côté des techniques principales présentées ci-dessus, il y a leurs variantes (1) qui sont beaucoup moins utilisées.

Ce sont :

- La méthode par inhibition de la fluorescence (GOLDMAN)(1957) (1)

C'est une variété de méthode indirecte où les réactions positives sont marquées par une absence de fluorescence. C'est un complément de la technique primitive.

- La méthode de l'anticomplément (GOLDWASSER et SHEPARD (1958) (1)

Elle est semblable à la méthode indirecte mais utilise comme conjugué un sérum anticomplément de cobaye préparé sur lapin par injection de complément de cobaye.

- La méthode de double coloration (RIGGS et collaborateurs (1958)(1 et 21)

C'est un moyen de contrôle des méthodes directe et indirecte et permet l'étude simultanée de deux antigènes sur une même lame en utilisant deux conjugués différents : un sérum anti-globuline marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine et la sérum-albumine bovine liée à la rhodamine ; dans le cas d'une réaction positive, il se produit un contraste de coloration entre les deux conjugués utilisés. Selon nombre d'auteurs, ces méthodes se révèlent toutes très sensibles mais exigent une technique rigoureuse pour éviter les fluorescences non spécifiques. Leurs domaines d'application sont multiples.

IV - APPLICATIONS DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE AU  
DIAGNOSTIC DES PROTOZOSES ET DES  
TRYPANOSOMOSSES EN PARTICULIER

A/ - L'immuno-fluorescence dans les Protozooses humaines

Les protozooses les mieux étudiées par la méthode d'immuno-fluorescence sont celles dues aux plasmodiums, toxoplasmes et trypanosomes.

Parmi les travaux cités dans la littérature, on note d'abord ceux de GOLDMAN et collaborateurs sur les amibes (1).

Ces chercheurs ont en effet appliqué en 1953 la technique de COONS comme moyen de différenciation immunologique entre *Entamoeba histolytica* et *E.coli*. (et comme dit plus loin, ce fut la première tentative d'utilisation de la méthode en parasitologie). Ils devaient par la suite (1954-1960) compléter ces études sur les amibiases en se servant d'un micro-fluorimètre (1).

Après ces recherches, plusieurs auteurs dont AMBROISE-THOMAS (2-3 et 4) ont essayé d'appliquer le test des anticorps fluorescents au diagnostic du paludisme.

Pour ce qui est des trypanosomoses, l'étude-clef qui ouvrit la voie à la technique de WELLERS et COONS fut celle réalisée par FIFE et MUSCHEL (1959) (18) pour détecter la maladie de CHAGAS (*T.cruzi*). Elle fut suivie par de nombreux autres travaux dont le but était tantôt d'étudier la structure antigénique des trypanosomes, tantôt de faire le dépistage sérologique des maladies que ces parasites provoquent :

SADUN et *al* (1963) (33) en faisant le diagnostic sérologique des trypanosomoses humaines africaines (*T.rhodesiense* et *T.gambiense*) et américaine (*T.cruzi*) aboutirent à des résultats très importants : grande sensibilité de l'immunofluorescence; existence de réactions croisées entre les trois types de trypanosomes humains, réactions croisées plus nombreuses entre trypanosomoses et leishmanioses qu'entre trypanosomoses et d'autres infections; enfin réactions croisées entre *T.lewisi* et les trypanosomes pathogènes. Pour ces auteurs, les résultats obtenus laissent supposer d'une manière générale que l'immunofluorescence pourrait fournir un procédé simple et pratique pour le diagnostic des trypanosomoses mais ils pensent que les applications, pour sortir du domaine expérimental, doivent attendre une documentation plus riche pour la raison particulière que la différenciation entre réactions positives et réactions négatives n'est pas aussi nettement évidente avec les trypanosomoses qu'avec les helminthoses; par contre, l'accroissement des expériences avec l'observation au microscope à fluorescence peut réduire le nombre de réactions douteuses. SADUN et son équipe devaient d'ailleurs améliorer par la suite (34) leurs techniques en utilisant, en même temps que l'isothiocyanate de fluorescéine, la rhodamine pour inhiber la fluorescence non spécifique. Des épreuves faites sur lapins infectés par *T.rhodesiense* et *T.gambiense* allaient révéler une grande sensibilité de la méthode.

En 1965, CUNNINGHAM (M.P.) et GRAINGE (E.B.) trouvèrent dans l'immunofluorescence indirecte un moyen de dépistage des affections de l'homme dues à *T.rhodesiense* (16). Ils affirment avoir obtenu de bons résultats et selon eux, la coloration non spécifique correspond à l'action du conjugué seul sur l'antigène, ce qu'on peut éviter par absorption du conjugué sur poudre d'organe.



Un an plus tard, CUNNINGHAM et d'autres collaborateurs (15) reprennent la même étude en utilisant cette fois-ci la méthode dite des confettis, c'est-à-dire du sang recueilli sur papier-filtre; leurs observations satisfaisantes se traduisant par l'obtention de tous les degrés de fluorescence dans les réactions (de +++ jusqu'à la fluorescence nulle).

Toujours par cette technique utilisée parallèlement à des dilutions de sérums, WERY et collaborateurs (1970) (39) firent le diagnostic de la trypanosomose humaine africaine (*T.gambiense*) et arrivèrent à la conclusion que l'I.F.I.\* est très sensible dans la détection des trypanosomoses; en effet, les nouveaux cas de maladie peuvent être décelés jusqu'à des dilutions de sérums de 1/320 tandis que les témoins indemnes de la maladie sont parfaitement négatifs à la dilution de 1/20. De plus, un technicien de laboratoire non spécialisé peut effectuer la réaction sur une centaine d'échantillons de sang séché en une demi-journée; les auteurs insistent sur la valeur potentielle de la méthode de WELLERS et COONS comme test sérologique de routine. Toutes ces observations devaient être confirmées dans les applications au diagnostic de masse effectuées par :

- WERY et collaborateurs (40-41) (42)
- van WETTERE (1971) (43).

---

\* I.F.I. : Immuno-fluorescence indirecte

## B/ L'immunofluorescence indirecte dans les trypanosomoses bovines

Parallèlement à l'étude des trypanosomoses humaines, quelques travaux ont été consacrés à l'application de la méthode aux affections similaires des animaux.

WILSON et collaborateurs (1966) (46) étudient des trypanosomoses bovines en utilisant comme antigènes *T. brucei*, *T. vivax* et *T. congolense*. A cet effet, ils ont d'abord employé des sérums, ensuite des disques de papier-filtre imprégnés de sang des animaux à tester (méthode dite des confettis).

Dans le cas des sérums, ces chercheurs constatent l'existence d'anticorps communs aux différentes espèces de trypanosomes utilisées comme antigènes. Leur conclusion sur la valeur de l'utilisation des confettis est que ce procédé pourrait être appliqué à l'examen d'un grand nombre de prélèvements de sang d'animaux pour établir la répartition géographique de la maladie.

En reprenant le travail précédent, WILSON (1969) (48) opère de sur des échantillons de sérums prélevés sur 467 bovins entretenus dans deux régions distinctes de l'Ouganda de l'Est et compare l'immunofluorescence indirecte (sérums et confettis) à la méthode d'agglutination. De ses épreuves, il ressort que le test de séroagglutination a un intérêt limité, tandis que l'immunofluorescence donne des résultats satisfaisants car elle permet à la fois de suivre l'évolution de la maladie et la détection des cas chroniques.

C'est ce que confirment d'ailleurs les travaux de M'WAMBU et de OMASET (1967) (32) qui ont fait les mêmes essais, mais cette fois en comparant la technique aux autres méthodes de diagnostic (goutte épaisse, inoculation d'animaux sensibles).

D'autres recherches furent menées par la suite :

[ WILSON (1967) (47), WIESENHUTTER (1969) (45), SCHINDLER (1972) (35-36) etc.. ]  
et que nous reprendront dans les discussions.

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS DE DIAGNOSTIC DANS LES  
TRYPANOSOMOSSES BOVINES EXPERIMENTALES

Ils ont été effectués au Laboratoire national de l'Elevage du Sénégal et ont porté sur des bovins d'expérience infectés par différentes souches de trypanosomes

## PLAN DE LA DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODEA/ METHODE GENERALE SUIVIE

- 1/ Opérations préliminaires
- 2/ Epreuves proprement dites

B/ MATERIELI - PREPARATION DES CONJUGUES

I/1 - Préparation de l'immun-sérum anti  $\gamma$  globuline

I/2 - Isolement des  $\gamma$  globulines

I-2/1- La concentration des anticorps par précipitation de la fraction globulinique

I-2/2- La dialyse de la solution globulinique reconstituée et la détermination de son taux d'azote

- 2-2/1- Dialyse
- 2-2/2- Détermination du taux d'azote
- 2-2/3- Addition d'un antiseptique

I/3 - La conjugaison des protéines anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine et épuisement de la solution de globuline conjuguée

I-3/1- Conjugaison

I-3/2- Epuisement de la solution de globuline conjuguée sur Gel Sephadex G 50 et concentration dans une solution de polyéthylène glycol PM 4.000

I/4 - La purification du conjugué fluorescent

I/5 - Le titrage ou étalonnage des conjugués

I-5/1- Conjugué A

I-5/2- Conjugués B, C, D, etc...

II - PREPARATION DES ANTIGENES

III - LES ANTICORPS

III/1 - Les sérums

III-1/1- Epreuves préliminaires sur bovins d'expérience

1-1/1- Bovins infectés avec la souche *Trypanosoma  
brucei*

1-1/2- Bovins infectés avec la souche *Trypanosoma  
congolense*

1-1/3- Bovins témoins non infectés (négatifs)

III-1/2- Dilutions des sérums

III/2 - Les confettis ou rondelles de papier filtre

- titrage du conjugué par la méthode des confettis

IV - LA MICROSCOPIE

C/ INTERPRETATION DES RESULTATS

CHAPITRE II - RESULTATS DES ESSAIS DE DIAGNOSTIC DANS LES TRYPANOSOMOSES BOVINES EXPERIMENTALES : VALEUR DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE DANS LE DIAGNOSTIC INDIVIDUEL

A/ EPREUVES REALISEES AVANT TRAITEMENT DES BOVINS INFECTES

- 1/ Antigène *Trypanosoma brucei* : Tableaux 1 à 5
- 2/ Antigène *Trypanosoma congolense* : Tableau 6
- 3/ Commentaire des résultats du diagnostic des trypanosomoses expérimentales non traitées

B/ TESTS APRES TRAITEMENT DES ANIMAUX

- 1/ Antigène *T.brucei* et conjugué fluorescent B : tableaux 7 à 13
- 2/ Antigène *T.congolense* et le conjugué fluorescent B : tableaux 14 et 15

C/ ETUDE COMPARATIVE DES IMMUN-SERUMS AVANT ET APRES TRAITEMENT

1/ Réactions monospécifiques

- a) à T.brucei : tableau 16
- b) à T.congolense : tableau 17

2/ Réactions hétérospécifiques : *T.brucei* - *T.congolense*

- a) antigène *T.brucei* - immun-sérums *T.congolense* : tableau 18
- b) antigène *T.congolense* - immun-sérums *T.brucei* : tableau 19

D/ L'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE : VALEUR DANS LE DIAGNOSTIC DES TRY-  
PANOSOMOSES BOVINES EXPERIMENTALES

CHAPITRE PREMIERMATERIEL ET METHODE (1 et 39)A/- METHODE GENERALE SUIVIE

Elle a été adoptée à la suite d'une série d'essais qui avaient pour but de juger de l'influence d'un certain nombre de facteurs sur la réaction d'immunofluorescence indirecte à savoir :

- la durée d'action du sérum et du conjugué fluorescent
- le temps de lavage
- le milieu de montage.

1°/- Opérations préliminaires

Sur des lames d'antigène préparées comme nous le verrons plus loin, les indications que voici sont portées à l'encre de chine puis recouvertes de vernis à ongles :

- nom de la souche de trypanosomes utilisée comme antigène;
- numéro du sérum utilisé et sa ou ses dilutions; Après quoi, un nombre variable de cercles de diamètre = 5 mm sont délimités par du vernis à ongles sur l'étalement antigénique de chaque lame.

2°/- Epreuves proprement dites

Elles s'effectuent de la manière suivante :

- une goutte de sérum dilué est déposée au centre de chaque cercle de vernis alors que dans la modalité dite des confettis, les cercles sont occupés par des rondelles de papier filtre qui baignent dans une goutte de tampon phosphate pH 7,2\*

---

\* : Tampon phosphate

(NaCl : 8,5 g (Eau distillée : 1.000 ml  
 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 H<sub>2</sub>O : 354 g

Pour l'incubation, l'ensemble est placé à l'étuve à 37°C et en atmosphère humide pendant 35 mn. Trois lavages successifs sont ensuite faits dans des bains du même tampon phosphate en quantités suffisantes pendant une durée de 20 mn et dans l'ordre qui suit :

- premier lavage : 10 mn
- deuxième et troisième lavages : 5 mn chacun et toujours dans des bains différents. Ces lavages sont suivis de l'égouttage des lames pour enlever l'excès d'eau sans toutefois les dessécher entièrement.

Après cette phase (lavage et égouttage), une goutte de conjugué fluorescent de dilution variable, est déposée dans chaque cercle puis incubée dans les mêmes conditions que précédemment.

Pour terminer, les lavages et égouttages précédents sont renouvelés.

Pour l'examen, les lames sont recouvertes de lamelles grâce au milieu de montage que voici : glycérine : 9 parties;  
tampon phosphate : 1 partie.

## B/- MATERIEL

### I - PREPARATION DES CONJUGUES UTILISES (1)

#### I/1 - Préparation de l'immun-sérum anti $\gamma$ globuline bovine

Elle a été faite sur des lapins neufs à partir de sang frais prélevé sur des zébus indemnes de trypanosomoses. Le sérum provenant du sang de ces animaux a été mélangé à parties égales à l'adjuvant de Freund (huiles minérales + extrait bactérien) et inoculé à des lapins selon la technique habituelle de préparation d'immuns-sérums sur lapins (injections périodiques dans les pelotes plantaires ou dans la veine mar-



ginale de l'oreille). La récolte de l'immun-sérum anti  $\gamma$  globuline bovine a lieu 4 semaines après, soit par saignée à blanc, soit par ponction cardiaque.

### I/2 - Isolement des $\gamma$ globulines

Avec l'immun-sérum obtenu, trois opérations sont effectuées pour aboutir au conjugué fluorescent :

#### I - 2/1 - La concentration des anticorps par précipitation de la fraction globulinique

Elle est réalisée classiquement à l'aide d'une solution saturée de sulfate d'ammonium et tend à éliminer au maximum les protéines immunologiquement indifférentes. Pour cela, on mélange le sérum et l'eau physiologique à parties égales, puis on ajoute un volume de sulfate d'ammonium égal à celui de l'ensemble (sérum-eau physiologique).

On fait agir l'agitateur magnétique; cette opération nécessite une température de  $+4^{\circ}\text{C}$  et dure 15 mn. Au bout de ce temps, on laisse reposer pendant 2 heures. Le mélange est ensuite centrifugé à  $+4^{\circ}\text{C}$  théoriquement 10.000 t/mn pendant 15 mn. Ici c'est la vitesse de 4.000 t par minute pendant 45 mn qui a été utilisée. Le précipité obtenu est lavé avec une solution de sulfate d'ammonium demi-saturée refroidie à  $+4^{\circ}\text{C}$  et dont le volume est égal à 4 fois le volume initial du sérum. Ce lavage est suivi d'une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions que précédemment; le culot obtenu constitue la fraction  $\gamma$  globulinique.

#### I - 2/2 - La dialyse de la solution globulinique reconstituée et la détermination de son taux d'azote

##### 2 - 2/1 - Dialyse

Son but est de retirer tout le sulfate d'ammonium que contient la solution. Elle s'effectue dans un boyau à dialyse contre du

soluté physiologique tamponné et se poursuit jusqu'à disparition complète des ions ammonium (contrôle par le réactif de Nessler). En renouvelant le bain de dialyse tous les jours, il n'y a pratiquement plus d'ions d'ammonium au bout de 5 jours.

#### 2 - 2/2 - Détermination du taux d'azote

Elle a été faite à chaque fois par le service de biochimie du Laboratoire national de l'Elevage. Ce taux est d'environ 50 mg par ml pour les diverses préparations réalisées.

#### 2 - 2/3 - Addition d'un antiseptique

Pour permettre une bonne conservation à  $-20^{\circ}\text{C}$  de la solution de  $\gamma$  globuline reconstituée avant la conjugaison, il est nécessaire d'y ajouter un antiseptique. Celui qui a été utilisé ici est le Merseptyl, (acide mercurothiolique) à 1/10.000 de la concentration finale.

### I/3 - La conjugaison des protéines anticorps à l'isothiocyanate de fluorescéine et épuisement de la solution de globuline conjuguée

#### I - 3/1 - Conjugaison

Dans un premier temps, on calcule le volume final auquel la solution de globuline doit être amenée pour obtenir une concentration de 1 p.100 de protéine; puis la poudre d'isothiocyanate de fluorescéine est pesée à raison de 0,05 mg par mg de protéine contenue dans la solution de globuline titrée.

Cette poudre est dissoute dans un volume de solution saline tamponnée\* égal au 1/100 du volume final à obtenir;

---

\* : Solution saline tamponnée pH 9

Puis la solution globulinique est mélangée à la solution d'isothiocyanate de fluorescéine et le tout est complété par une solution saline tamponnée jusqu'au volume final calculé précédemment.

La préparation est placée dans un bécher et conservée pendant 18h. à +4°C pour aboutir à l'union des globulines et du fluorochrome.

I - 3/2 - Epuisement de la solution de globuline conjuguée sur Gel Sephadex G 50 et concentration dans une solution de polyéthylène glycol PM 4.000 (carbowax)

L'épuisement est destiné à retirer l'excès d'isothiocyanate et est préférable à la dialyse qui est longue (chaque dialyse demande une semaine).

Pour ce faire, il a été utilisé un gel de Sephadex G 50 dans une colonne à chromatographie selon la technique indiquée par Ambroise-Thomas (1). La solution de polyéthylène glycol permet de concentrer les globulines dont la dilution est augmentée par le passage dans la colonne de SEPHADEX.

I/4 - La purification du conjugué fluorescent

Le premier conjugué obtenu (designé B) avait donné de la fluorescence aussi bien avec des sérums témoins négatifs qu'avec les témoins positifs. Ce que l'on attribua à des fluorescences non spécifiques dues à un excès de fluorescéine ou à des réactions croisées.

Pour supprimer cette cause d'erreur, nous avons purifié par la suite l'antisérum obtenu, par absorption sur poudre d'organe selon la méthode classique de Coons et Kaplan (1) qui se pratique de la manière suivante : le conjugué rapidement décongelé est mélangé avec la poudre de foie de lapin par quantités progressives (pour un total de 100 mg de poudre par ml de conjugué), tout en agitant de temps à autre pendant une demi-heure à 37°C.

Le mélange est centrifugé à 6.000 t par mn pendant 5 à 8 mn. Outre l'absorption sur poudre de foie, l'un des conjugués (conjugué C) a subi le traitement par le bleu d'Evans comme décrit par AMBROISE-THOMAS (2); ce traitement constituerait aussi une purification de l'antisérum fluorescent. C'est grâce à ces techniques classiques de préparation ci-dessus décrites que nous avons obtenu 3 des 4 conjugués utilisés lors de nos essais (conjugués B, C et D), le 4ème étant commercial (conjugué A).

#### I/5 - Le titrage ou étalonnage des conjugués

Il s'effectue au moment de l'emploi et consiste à tester des sérums témoins (positifs et négatifs) et les conjugués à des dilutions diverses. La dilution optimale de conjugué finalement retenue, correspond à la plus haute dilution qui donne la plus vive fluorescence avec un sérum témoin positif hautement dilué et la moindre fluorescence avec un sérum négatif faiblement dilué. Ce titrage permet d'obtenir une bonne reproductibilité des réactions d'immunofluorescence indirecte.

#### I - 5/1 - Conjugué A

C'est un conjugué fluorescent anti  $\gamma$  globuline bovine commercial qui a été éprouvé à la dilution de 1/15 considérée comme titre optimal. Il a conduit à des résultats satisfaisants.

#### I - 5/2 - Conjugés B, C, D, Etc...

Dans les essais pratiqués, ces conjugués sont employés à une dilution optimale comprise entre 1/10 et 1/20, ceci compte tenu des résultats enregistrés lors des étalonnages. D'ailleurs, le détail de ces titrages est exposé plus loin.

## II - PREPARATION DES ANTIGENES

Les antigènes utilisés proviennent d'animaux de laboratoire (souris, rats) pour les souches : *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* et de chèvres pour *T. vivax*.

Le sang renfermant les trypanosomes est étalé sur les lames en couche très mince. Le moment optimal pour la préparation de ces lames correspond à celui de forte parasitémie chez les animaux de laboratoire.

Après étalement, les lames fixées à l'acétone pur pendant 10 mn sont conservées à -20°C en prenant soin de les envelopper dans du papier fin, puis dans un sac de polyéthylène. Au moment de l'utilisation, la préparation se poursuit telle qu'elle est indiquée plus haut dans le paragraphe "méthode générale".

## III - LES ANTICORPS

### III/1 - Les sérums

Ils ont été obtenus à partir de bovins.

Les bovins donneurs sont :

- soit infectés expérimentalement et traités ou non;
- soit négatifs (non infectés) : ils servent alors de témoins des réactions.

### III - 1/1 - Epreuves préliminaires sur des bovins d'expérience

Ce sont des animaux dont on a une connaissance précise de l'état de santé du point de vue parasitaire.

III-1-1/1- Bovins infectés avec la souche *Trypanosoma brucei*

Ce sont des sujets inoculés 15 jours avant la première épreuve. Ils sont au nombre de cinq. Ces animaux portent les n<sup>os</sup> 354 - 355 - 356 - 358 et 352. Quatre d'entre eux ont été traités au Bérénil (acéturate de Diminazène), après l'apparition de la parasitémie : il s'agit des bovins n<sup>os</sup> 354 - ~~355~~ - 356 - 358 et 352; le bovin n<sup>o</sup> 355 est mort avant traitement avec une parasitémie très élevée; c'est son sérum qui est utilisé comme sérum de référence positif.

1-1/2 - Bovins infectés avec la souche *Trypanosoma congolense*

Il s'agit des n<sup>os</sup> 285 - 357 - 359 - 360 et 365, qui ont été inoculés 33 jours avant le premier prélèvement de sérum et traités comme les animaux du lot précédent.

1-1/3 - Bovins témoins négatifs

Ils sont représentés par un groupe de cinq zébus non infectés et qu'un examen parasitaire pouvait faire considérer comme négatifs.

III - 1/2 - Dilutions des sérums

Elles ont lieu dans du tampon phosphate pH 7,2 suivant un ordre croissant. Le titre optimal est indiqué par test préalable sur les sérums témoins positifs qui réagissent jusqu'à 1/160.

III/2 - Les confettis ou rondelles de papier filtre

Ils servent après numérotage, à prélever du sang veineux (oreille - veine jugulaire) sur les animaux à tester sous forme de gouttes épaisses déposées sur disques de papier filtre. Ces disques de

papier ainsi imprégnés de sang sont placés dans un dessiccateur pour permettre leur dessèchement au moment de l'emploi. Les rondelles sont découpées avec un emporte pièce de cordonnier faisant des trous de 4 mm; par ce procédé, il n'y a pas de dilution possible.

#### - Titration du conjugué par la méthode des confettis

Des rondelles provenant de témoins positifs et négatifs sont utilisées à la place des sérums de référence. La dilution optimale du conjugué correspond à celle avec laquelle toutes les rondelles positives donnent une fluorescence de ++++ ou +++, et toutes les rondelles négatives une fluorescence de 0 à +. Cette méthode utilise le même tampon phosphate que celui indiqué plus haut pour maintenir les confettis sur les lames d'antigène.

#### IV - LA MICROSCOPIE

L'examen des lames a lieu dans les 24 h. qui suivent l'épreuve. Il est effectué à l'aide d'un microscope à fluorescence Wild M 20 doté d'une base de fluorescence à vapeur de Mercure HB 200 et équipé d'un appareil de microphotographies. Des indications sur les prises de photographies sont données avec les résultats. Les préparations sont examinées à l'objectif x 10 et à l'oculaire x 6 dans une salle obscure.

#### . C/- INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

C'est l'échelle conventionnelle des croix qui a été adoptée pour exprimer les résultats des examens microscopiques; quand dans un cercle, une épreuve est positive, cela se traduit par une fluorescence des trypanosomes :

- trypanosomes difficiles à voir : +
- trypanosomes visibles sans fluorescence nette +
- trypanosomes avec une faible fluorescence mais qui donnent un contraste sur fond noir : ++
- trypanosomes présentant une fluorescence nette sur fond noir : +++
- trypanosomes présentant une fluorescence très nette sur fond noir ++++

Parfois, pour rétrécir la marge d'erreur, l'échelle simplifiée suivante a été utilisée [WERY, (39)] .

- épreuves positives : ++++ et +++
- épreuves douteuses : ++
- épreuves négatives : + à 0 fluorescence.

Dans les tableaux que nous avons dressés pour consigner les résultats, les croix sont remplacées par les chiffres 4, 3, 2, 1 et 0 correspondant chacun à un nombre déterminé de ces croix.

Remarque :

Ce mode d'interprétation n'est pas dénué de subjectivité. C'est pourquoi, à chaque fois, nous avons fait appel à d'autres observateurs pour que nos résultats soient entachés du minimum de subjectivité.



CHAPITRE IIRESULTATS DES ESSAIS DE DIAGNOSTIC DANS LES TRYPANOSOMOSSES  
BOVINES EXPERIMENTALES : VALEUR DE L'IMMUNOFLUORESCENCE IN-  
DIRECTE DANS LE DIAGNOSTIC INDIVIDUEL

Plusieurs expériences ont été réalisées et comportent :

- des réactions monospécifiques où des sérums connus sont testés contre les antigènes homologues.
- des réactions hétérosécificiques où sérums et antigènes hétérologues sont mis en contact.

Les souches de trypanosomes qui ont été les plus utilisées sont *T. brucei* et *T. congolense*.

Les tableaux ci-dessous donnent les résultats où le degré de fluorescence est chiffré de 0 à 4 comme indiqué précédemment dans le paragraphe intitulé "interprétation des résultats" (page ).

A/- EPREUVES REALISEES AVANT TRAITEMENT DES BOVINS INFECTES1°/- Antigène *Trypanosoma brucei* - Tableaux 1 à 5

Tableau n°1

Test monospécifique à *T.brucei* effectué  
15 jours après infection des zébus

- le conjugué A est dilué au 1/15

N° des bovins		Dilutions des sérums			
		Pur	1/10	1/20	1/40
Infectés	352	0 à 1	1	1	2
	354	2	2	2	2
	355	0 à 1	1	0 à 1	0 à 1
	356	0 à 1	2	1	1
	358	2	2	2	2
Témoin non infecté	359	0	0	0	0
Conjugué seul	Fluorescence nulle				

Constatations :

1°/- L'observation ne révèle dans l'ensemble que des fluorescences relativement faibles aux différentes dilutions des sérums infectés considérés.

2°/- Les deux témoins négatifs représentés par le sérum non infecté n°359 et le frottis traité par le conjugué fluorescent seul sont demeurés parfaitement sombres.

Tableau n°2

Epreuves monospécifiques à *T. brucei* pratiquées  
22 jours après infection des animaux selon les  
deux types de prélèvements (confettis et sérums)

- le conjugué A est dilué au 1/15

N° des bovins		Dilutions des sérums			Confettis
		1/10	1/20	1/40	
Infectés	352	2	2	2	1
	354	3	3	2	0
	355	2	2 à 3	2	3
	356	(1)*	(1)*	(2)*	(2)*
	358	0 à 1	1	1	0 à 1
Témoin non infecté	359	1	0 à 1	0 à 1	1
Conjugué seul		Fluorescence nulle			

- fluorescences sensiblement plus intenses que celles observées lors de l'épreuve précédente pour les sérums à tester. En particulier, le n° 355 donne avec le papier filtre une brillance correspondant à +++, papier filtre qui du reste, ne vaut pas ce que valent les sérums dans cette épreuve.

► : Résultats douteux puisque ++ à la dilution de 1/40.

Tableau n°3

Etalonnage du conjugué fluorescent B en présence

- d'un sérum positif (de l'animal 355 infecté par *T. brucei* ou S<sup>+</sup> et
- d'un sérum négatif (de l'animal 289 jamais infecté ou S<sup>-</sup>

Dilutions du conjugué	Témoins utilisés	Dilutions des sérums		
		1/40	1/80	1/160
1/10	S <sup>+</sup>	4	4	4
	S <sup>-</sup>	2	2	1
1/40	S <sup>+</sup>	3	3	3
	S <sup>-</sup>	1	1	0 à 1
1/80	S <sup>+</sup>	2	3	2
	S <sup>-</sup>	0 à 1	0 à 1	0 à 1
Conjugué seul		Fluorescence nulle à toutes les dilutions du conjugué		

Constatations

- 1°/- Au 76ème jour de l'infection, le sérum 355 est positif jusqu'à la dilution de 1/160, tandis que le témoin non infecté demeure sombre dès la dilution de 1/40.
- 2°/- Le conjugué fluorescent est utilisé jusqu'à la dilution de 1/80 mais son titre ou (dilution optimale) se situe entre 1/10 et 1/40 et donne à ce niveau le minimum de fluorescence avec les témoins non infectés. Aussi a-t-il été utilisé à la dilution de 1/10 dans la suite des tests pratiqués avec ce conjugué B.
- 3°/- Une légère fluorescence avec le sérum témoin négatif aux faibles dilutions.

Tableau n°4

Réactions monospécifiques à *T. brucei* 76 jours après infectiondes Bovins- le conjugué B est au 1/10

N° des Bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
Témoins	S <sup>+</sup> 355	4	4
	S <sup>-</sup> 283	2	1
Infectés	354	4	4
	356	3	3
	358	3	3
Non infectés	353	2	0 à 1
	284	1	0 à 1
Conjugué seul au 1/10		Fluorescence nulle	

Constatations

- 1°/- Le conjugué dilué au 1/10 a fidèlement reproduit les résultats observés avec les sérums de référence lors de l'étalonnage (voir tableau n°3).
- 2°/- L'observation révèle des réactions nettement positives (++++) jusqu'à la dilution de 1/160 au lieu de 1/40 pour les sérums testés 15 et 22 jours après infection.
- 3°/- Faible fluorescence (négligeable) du témoin non infecté.



- Fluorescence très nette de *Trypanosoma cruzi* (++++)  
utilisé comme antigène et mis en contact avec le  
sérum homologue n° 355 du tableau n°4

Examen à l'objectif x 10 et l'oculaire 6

Le temps de pose est 5 minutes.

Tableau n°5

Epreuves hétérospécifiques : titrage d'immun-sérums  
*T.congolense* (33 jours après infection) contre l'an-  
tigène *T.brucei* et avec le conjugué B précédent  
à la même dilution

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
Infectés	357	2	1
	359	1	0 à 1
	365	2	1
Témoin non infecté	289	1	0 à 1
Conjugué seul		Fluorescence nulle	

Fluorescence faible observée à la dilution de 1/80 du sérum

2°/- Antigène *Trypanosoma congolense*

Tableau n°6

Tests des immun-sérums *T. brucei* (76 jours après infection)  
et *T. congolense* (33 jours) après infection, testé contre  
l'antigène *T. congolense*

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés par :</u>			
a) <u><i>T. brucei</i></u>	354	2	2
	356	2	2
	358	1	1
b) <u><i>T. congolense</i></u>	285	1	1
	357	1	1
	359	1	1
	365	0 à 1	0 à 1
Non infectés	284	0 à 1	0 à 1
	289	1	0 à 1
	353	1	0 à 1
Conjugué seul		Fluorescence nulle	

- faible fluorescence des réactions monospécifiques ne pouvant pas être considérée comme pathologiquement significative.
- fluorescence modérée pour les réactions hétérosécifiques telle que nous l'avons observée avec le test dont les résultats sont consignés dans le tableau n°5.



3°/- Commentaire des résultats du diagnostic des Trypanosomoses  
Expérimentales non traitées

Des constatations faites sur les résultats des tests pratiqués sur des sérums recueillis 15-22 et 76 jours après infection par *T.brucei* et sur d'autres recueillis 33 jours après infection par *T.congolense*, tous éprouvés par les conjugués A et B contre les souches de trypanosomes précédentes, utilisées comme antigène, il nous est permis d'affirmer que :

- 15 jours après infection, le taux d'Ac est relativement faible
- 22 jours après infection, il y a eu une légère augmentation du taux d'Ac (tableau n°2)
- 76 jours après infection, la teneur en Ac des sérums est manifestement très importante
- Jusqu'à 33 jours après infection, *T.congolense* ne donnait dans les sérums des individus infectés aucune trace appréciable de sa présence (tableau n°6)
- Il existe des réactions croisées entre *T.brucei* et *T.congolense*, mais plus visibles dans les épreuves hétérospécifiques où *T.brucei* est utilisé comme antigène, plutôt que dans le cas inverse (tableaux 5 et 6). Cela conduit naturellement à s'interroger sur l'action immunigène de chacune des 2 souches dans les trypanosomoses animales.

B/ - TESTS REALISES APRES TRAITEMENT DES ANIMAUX1°/ - l'Antigène *T.brucei* et le conjugué B : Tableaux 7 à 13Tableau n°7Réactions monospécifiques à *T.brucei* 15 jours après  
traitement et en présence du conjugué B au 1/10

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés</u>	354	3	3
	356	3	3
	358	3	3
<u>Témoins non infectés</u>	353	1	0 à 1
	284	0 à 1	0 à 1
	289	0 à 1	0 à 1
Conjugué seul		Fluorescence nulle	

Fluorescence vive voisine de celle observée lors des essais avant traitement (tableau n°4)

Tableau n°8  
Test 15 jours après traitement des immun-sérums  
*T. congolense* utilisant le même conjugué

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés</u>	285	2	2
	357	2	2
	359	1	1
	365	2	1
<u>Témoins non infectés</u>	289	0 à 1	0 à 1
	353	0 à 1	0 à 1
Conjugué seul		Fluorescence nulle	

Fluorescence moins marquée, à peine différente de celle donnée par le test pratiqué avec les sérums au 33ème jour de l'infection des sujets.

Tableau n°9

Test d'immun-sérums *T. brucei* 65 jours après traitement  
contre l'antigène correspondant *T. brucei*

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés</u>	354	3	3
	356	3	3 à 4
<u>Témoins non infectés</u>	284	0 à 1	1
	289	2	0 à 1
	353	1	0 à 1
<u>Conjugué seul</u>	Pur 0		1/10 0

Les réactions sont positives au même titre que celles données par les sérums recueillis 15 jours après traitement.

Tableau n° 10

Immun-sérums *Trypanosoma congolense* 65 jours après  
traitement : test contre l'antigène hétérologue  
*Trypanosoma brucei*

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Sérums infectés</u>	285	2	1
	357	2	1 à 2
	359	1	1
	365	1	0 à 1
<u>Témoins</u>			
a) <u>Non infectés</u>	284	0 à 1	1
	289	2	0 à 1
	353	1	0 à 1
b) <u>Conjugué seul</u>		Pur	1/10
		0	0

L'examen révèle une brillance faible voire nulle pour certains sérums à la dilution de 1/160 contrairement aux observations précédentes (tableau n°8). Ce qui dénote une baisse du taux des anticorps.

Tableau n°11

Etalonnage du conjugué fluorescent C en présence  
de sérums dilués au 1/80

N° des bovins	Dilutions du conjugué		
	1/2	1/4	1/10
<u>Positifs infectés par</u> <u><i>T. brucei</i> 355</u>	3	3	2
<u><i>T. congolense</i> 357</u>	3	3	3
<u>Non infecté (négatif) 284</u>	1	1	0 à 1
<u>Conjugué seul</u>	0	0	0

- Fluorescences non spécifiques très réduites
- La dilution optimale du conjugué correspond au 1/4  
(vive fluorescence avec les sérums positifs et fluorescence faible à nulle avec les sérums négatifs).

Tableau n°12

Test des immun-sérums *T. brucei* et *T. congolense*  
106 jours après traitement : le conjugué C est  
dilué au 1/4

N° des bovins		Sérums au 1/80
a) <u>Infectés par <i>T. brucei</i></u>	354	3
	356	3
	358	3
b) <u>Infectés par <i>T. congolense</i></u>	357	0 à 1
	365	1
<u>Témoins</u>		
a) <u>positif : 355 ou S<sup>+</sup></u>		2 à 3
b) <u>négatif : 289 (S<sup>-</sup>)</u>		0 à 1
<u>Conjugué seul</u>		0

- Les réactions s'expriment sensiblement avec les mêmes degrés de fluorescence que ceux qu'elles ont manifestés dans les tests post-thérapeutiques des 15ème et 65ème jours. (tableaux 7-8-9 et 10).
- Les immun-sérums *T. congolense* ont donné moins de satisfaction que ceux des périodes précédentes (15ème et 65ème jours).

Tableau n°13

Epreuve avec sérums *T. brucei* et *T. congolense*  
145 jours après traitement

- Contre coloration des lames d'antigène par le bleu d'Evans (2)  
(1/10.000 avec tampon phosphate pH 7,2)
- (Observation à l'objectif x 10 et oculaire x 6)
- Le conjugué C est dilué au 1/4

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/40	1/80
<u>Infection par :</u>			
a) <i>T. brucei</i>	354	3	3
b) <i>T. congolense</i>	357	2	1
	365	2	1
<u>Témoins :</u>			
(S <sup>+</sup> 355		3	3
(S <sup>-</sup> 289		0 à 1	0 à 1
<u>Conjugué seul</u>		Fluorescence nulle	

- Le bleu d'Evans utilisé pour renforcer l'inhibition des fluorescences non spécifiques ne semble pas avoir influé sur la qualité des réactions.
- 145 jours après le traitement, il y a toujours une nette fluorescence dans les réactions monospécifiques (*T. brucei*).



2°/ - Antigène *T.congolense* et le conjugué B : Tableaux 14 et 15

Tableau n°14

Immun-sérums *T.brucei* et *T.congolense* 15 jours  
après traitement; le conjugué est dilué au 1/10

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés par :</u> <i>T.brucei</i>	354	1	1
	356	2	1
<i>T.congolense</i>	285	2	1
	357	2	1
	359	1	1
	365	1	1
<u>Non infectés</u>	284	0 à 1	0
	353	1	1
Conjugué seul		Fluorescence nulle	

Seuls quelques sérums dilués au 1/80 ont permis aux réactions de manifester une timide fluorescence.

Tableau n°15

Epreuve avec immun-sérums *T. brucei* et *T. congolense*  
65 jours après traitement; conjugué B au 1/10

N° des bovins		Dilutions des sérums	
		1/80	1/160
<u>Infectés par :</u> a) <i>T. brucei</i>	354	0 à 1	0
	356	2	1
b) <i>T. congolense</i>	285	2	1 à 2
	357	1	0 à 1
	359	1 à 2	1
	365	2	1
<u>Non infectés</u>	284	0 à 1	0 à 1
	289	0	0
	353	0 à 1	0
<u>Conjugué seul</u>		Fluorescence nulle	

C/- EIUE COMPARATIVE DES IMMUN-SERUMS AVANT ET APRES TRAITEMENT

1°/ - Réactions monospécifiques (à *T. brucei* : tableau n°16  
(à *T. congolense* : tableau n°17)

Tableau n°16a) - Réactions monospécifiques à *T. brucei*

Dilutions (sérums 15 et 22 jours après infection : 1/40  
(pour les autres dates : 1/80)

Nombre de jours		Résultat du test sur les bovins				
		N°352	N°354	N°355	N°356	N°358
<u>A/ Après infection</u>						
	15	2	2	0 à 1	1	2
	22	2	2	2	2	1
	76		4	4	3	3
<u>B/ Après traitement</u>						
	15		3	3	3	3
	65		3		3	3
	106		3		3	
	145		3			

Dans les infections à *T. brucei*, il y a eu baisse de l'intensité de la fluorescence dans les épreuves sur sérums prélevés 15 jours après traitement. Néanmoins, le degré de fluorescence observé semble se maintenir au même niveau, tout au long des prélèvements qui suivent.

Tableau n°17

b) - Réactions monospécifiques à *T.congolense*

Dilution des sérums = 1/80

Nombre de jours		Résultat du test sur les bovins			
		N°285	N°357	N°359	N°365
A/ <u>Après infection</u>	33	1	1	1	0 à 1
B/ <u>Après traitement</u>	15	2	2	1	1
	65	2	1	1 à 2	2

- Après traitement des animaux inoculés, la fluorescence révélée par l'examen, a augmenté et conservé pratiquement la même brillance jusqu'au dernier prélèvement effectué au 65ème jour du traitement.
- Cela peut se concevoir du fait que, le traitement trypanocide en tuant les trypanosomes entraîne une libération d'antigène pouvant induire une production d'anticorps.

2°/ - Réactions hétérospécifiques (antigène *T.brucei* - Immunsérums  
 (*T.congolense* : Tableau n°18  
 (antigène *T.congolense* - Immun-  
 sérums *T.brucei* :Tableau n°19

Tableau n°18

a) - Antigène *T.brucei* et immunsérums *T.congolense* 1/80

Nombre de jours		Résultat du test sur les bovins			
		N°285	N°357	N°359	N°365
A/ <u>Après infection</u>	33		2	1	1
B/ <u>Après traitement</u>	15	2	2	1	2
	106		0 à 1		1
	145		1		1

- Les fluorescences révélées sont faibles.

Tableau n°19

b) - Antigène *T.congolense* et immunsérums *T.brucei* (1/80)

Nombre de jours		Résultat du test sur les bovins				
			N°354	N°355	N°356	N°358
A/ <u>Après infection</u>	76		2	0 à 1	2	1
B/ <u>Après traitement</u>	15		1		2	
	65		0 à 1		2	

La brillance des réactions est encore faible.

D/- L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE : VALEUR DANS LE DIAGNOSTIC DES  
TRYPANOSOMOSSES BOVINES EXPERIMENTALES

A la lumière des quelques observations faites sur les résultats exposés plus haut, nous pouvons dire que la méthode, outre les qualités qu'on lui connaît déjà (simplicité, rapidité d'exécution, bon marché), présente aussi une certaine sensibilité du fait que dans la majorité des essais pratiqués, les sérums à tester ont montré une fluorescence à la dilution de 1/160 alors que les témoins non infectés sont demeurés parfaitement sombres à la plus faible dilution utilisée (1/10 - tableau n°1). Il faut cependant noter que cette sensibilité est plus grande dans le système homologue *Trypanosoma brucei* que dans les réactions hétérologues, ou les réactions utilisant *Trypanosoma congolense* comme antigène. C'est ce que constatent aussi WILSON et collaborateurs (1966) (46). Ces auteurs ont même pu obtenir de bonnes réactions jusqu'à la dilution de 1/320 et ils ont également pu utiliser dans les réactions hétérologues d'autres souches de trypanosomes (*T. vivax*).

Par ailleurs, SCHINDLER (1972) (35 et 36), van MEIRVENNE et collaborateurs (1972) (30), MEHLITZ et collaborateurs (1973) (29) tirent de leurs recherches les mêmes conclusions sur la sensibilité de l'immunofluorescence.

Par contre, la spécificité de la méthode, du point de vue du diagnostic des espèces est sujette à discussion : On remarque notamment que dans les infections dues à *T. brucei*, le test monospécifique permet d'observer les meilleures fluorescences. Ces fluorescences sont moins vives quand il s'agit de test homologues à *T. congolense*. Il en est de même dans les tests hétérospécifiques (voir tableaux n°s 17, 18, 19). C'est dire que l'immunofluorescence indirecte présente dans les trypanosomoses bovines une certaine spécificité, spécificité globale au niveau du genre qui lui permet de déceler de façon indiscriminée la présence de l'une ou l'autre des souches de trypanosomes envisagées. Cela constitue aussi un inconvénient non négligeable quand on sait que l'utilisation des trypanocides chimiques suppose la détermination précise du trypanosome impliqué dans l'affection.

SI MEHLITZ et *al* (1973) (29), van MEIRVENNE et *al* (1972) (30) abondent dans le même sens que nous, il n'en est pas de même pour SCHINDLER (1972) (36) qui a fait des recherches similaires et qui pense que la méthode pourrait probablement permettre un diagnostic spécifique du fait que les réactions croisées sont pour lui, faibles voire inexistantes. Certains auteurs (résultats non publiés) pensent que la pratique de la technique d'immunofluorescence indirecte en tube et non plus sur lame, conduirait à des résultats beaucoup plus spécifiques. Quoiqu'il en soit, l'immunofluorescence indirecte peut être considérée comme méthode statistique d'enquête épizootiologique sur la fréquence des trypanosomes. Mais, il convient de signaler à ce propos que les résultats auxquels nos essais ont abouti obligent à penser que, dans les trypanosomes expérimentales les anticorps ne sont nettement décelables que 3 semaines après le début de l'infection (tableaux n°s 16, 17). De plus, chez les sujets infectés puis soumis à un traitement trypanocide, le taux des anticorps pour les bovins hébergeant *T.congolense*, diminue 15 jours après le traitement et demeure sensiblement au même niveau jusqu'aux environs du 65ème jour. Cette diminution est plus lente pour les bovins parasités par *T.brucei* (145ème jour).

Autrement dit, avec l'immunofluorescence indirecte, il n'est pas possible d'établir le diagnostic d'une infection récente due à des trypanosomes; en outre, en présence d'une réaction positive, on ne saurait dire si l'infection est actuelle ou d'un passé récent mais jugulée par trypanocide. Ces remarques rejoignent la plupart des faits relevés dans la littérature [MEIRVENNE (30), CUNNINGHAM et *al* (17), WILSON et collaborateurs en particulier (46)].



## T R O I S I E M E   P A R T I E

ESSAIS DE DIAGNOSTIC DANS LES TRYPANOSOMOSES  
NATURELLES : VALEUR DANS L'EPIZOOTIOLOGIE DES  
TRYPANOSOMOSES BOVINES

Ils ont porté sur des troupeaux de Bovins (Zébus NDama - Diakoré ou métis Ndama - Zébu) dont l'état sanitaire n'est pas déterminé mais qui vivent dans des localités bien connues du Sénégal: une autre série d'épreuves a été effectuée sur un noyau de Zébus Guzera provenant du Brésil et destiné au Centre Zcotechnique de Dara.

Ces animaux appartiennent à trois groupes :

- troupeaux suspects de trypanosomoses mais sans certitude;
- troupeaux trypanotolérants en régions infestées de glossines;
- troupeaux inconnus.

Le diagnostic des trypanosomoses a pu être réalisé par l'examen microscopique pour tous les sujets et par la technique d'immunofluorescence indirecte pour certains d'entre eux.

## PLAN DE LA TROISIEME PARTIE

CHAPITRE PREMIERETUDE SUR TROUPEAUX SUSPECTS DE TRYPANOSOMOSEA/ Bovins de Kaffrine et Koungheul1°/ Examen direct ou observation microscopique2°/ Test d'immuno-fluorescence indirecte

a) Méthode des confettis

b/ Etude des sérums

3°/ Etude comparative des résultats obtenus par les différentes méthodes de diagnostic appliquées aux prélèvements de Kaffrine et KoungheulB/ Bovins de Sokone : Troupeaux d'animaux trypano-tolérants1/ Diagnostic expérimental direct

a) examen du sang des animaux de Keur Aliou Guèye et Sokone (centre)

b) examen du sang des animaux de Firdaoissi

c) examen microscopique sur animaux de N'Diafé - N'Diafé

2/ Diagnostic expérimental indirect par la technique d'immuno-fluorescence

a) Keur Aliou Guèye, Sokone centre et Firdaoissi

b) N'Diafé - N'Diafé

3/ Etude comparative des résultats obtenus par les différentes méthodes d'analyse appliquées aux échantillons de Sokone.

CHAPITRE II : ETUDE SUR TROUPEAUX INCONNUS

A/ Bovins du Brésil

B/ Bovins du Fouta

CHAPITRE III : VALEUR DE L'IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE DANS LES TRYPA-  
NOSOMOSEs BOVINES NATURELLES

## CHAPITRE PREMIER

### ETUDE SUR TROUPEAUX SUSPECTS DE TRYPANOSOMOSES

#### A/- BOVINS DE KOUNGHEUL-KAFFRINE

Le Sine Saloum est la région centre-ouest du Sénégal au sud du 15ème parallèle et la présente enquête a été menée en ses localités de Kaffrine et Koungheul (Koumbidia) situées sur la latitude de Tambacounda à proximité du 14ème parallèle.

L'enquête a d'abord porté sur des troupeaux des unités expérimentales de l'Institut de Recherches Agronomiques Tropicales (IRAT) et ensuite sur des bovins autour de Kaffrine à titre de comparaison; les animaux de cette zone sont de la race Ndama grande ou des métis zébus-Ndama. Dans cette bordure sud de la région, la trypanosomose est sporadique. C'est la raison pour laquelle, cette zone a été choisie pour pratiquer ces premiers essais.

Au total, 152 prélèvements ont été recueillis sur des bovins formant 27 troupeaux; ont été utilisés par la suite :

- à Koungheul (Koumbidia) les échantillons provenant de sujets répartis dans 14 troupeaux;
- à Kaffrine le sang de 52 animaux groupés en 7 troupeaux.

1/ - Examen direct ou observation microscopique

- L'examen de sang à l'état frais intéressant les échantillons de Kaffrine n'a révélé aucun cas de trypanosomoses.
- Quant aux frottis et gouttes épaisses colorés au May Grunwald Giemsa et portant sur l'ensemble des sujets ayant subi l'enquête, ils ont donné les résultats consignés dans le tableau n°1 ci-dessous :

Tableau n°1

Troupeaux et n° des animaux	Localités	Frottis et gouttes épaisses après coloration	
		Trypanosomes	Autres parasites
T1 : 01 ----- 03	Keur Samba	- absents	
T2 : 04 ----- 13		- "	
T3 : 14 ----- 20		- "	
T4 : 21 ----- 22		- "	
T5 : 23 ----- 32	Sinthiou Sali	- "	
T6 : 33 ----- 37	Médina Sali	- "	
T7 : 38 ----- 47	Keur Sagar	- "	Anaplasmes sur n° 41
T8 : 48 ----- 51	Keur Diam Kode	- "	Theileria sur n° 50
T9 : 52 ----- 61	NDiaptopeul	- "	(microfilaires sur 51
T10: 62 ----- 71	Keur Momar Fass	- "	Theileria sur n° 61
T11: 72 ----- 81	Keur Lamine	- "	
T12: 82 ----- 89	Keur birane	- "	Theileria sur n° 81
T13: 90 ----- 91	Keur senimangane	- "	Theileria sur n° 91
T14: 92 ----- 100	Koumbidia Peul	- "	Theileria sur n°s 92 - 93 - 100 - 101

Tableau n°1 (suite)

T15 : 101 --- 112		- absents	
T16 : 113 --- 118	Kaffrine	- "	Anaplasmes sur n° 118
T17 : 119 --- 123		- "	
T18 : 124 --- 132		- "	
T19 : 133 --- 135		- "	
T15 : 136 --- 138		- "	
T20 : 139 --- 146		- "	
T21 : 147 --- 152		- "	

Constatations

- l'examen microscopique (goutte épaisse-frottis) des 152 lames n'a révélé aucun trypanosome
- 12 échantillons de l'ensemble ont présenté à cette même analyse d'autres parasites sanguins tels que *Theileria mutans* (piroplasmes), *Setaria* (microfilaires) et *Anaplasma marginale* (Rickettsies).

2/ - Test d'immunofluorescence indirecte

Sa réalisation a fait appel à ses 2 modalités (la méthode classique de sérums et celle des confettis) qui sont pratiquées sur 119 prélèvements individuels testés contre l'antigène *T.brucei*. Des dilutions de 1/2 et 1/10 puis 1/40 et 1/80 sont respectivement utilisées pour le conjugué fluorescent antiglobuline bovine (C) et pour les sérums étudiés.

Dans ce qui suit, les résultats obtenus par les deux modalités sont successivement exposés et comparés à ceux de l'examen microscopique en vue de juger du degré de spécificité de la technique d'immunofluorescence indirecte.

Tableau n°2

a) Méthode des confettis

- 83 échantillons de sang de bovins prélevés sur papier-filtre et provenant des villages situés dans les unités expérimentales à Koungheul sont étudiés par cette technique. A cet effet, une rondelle de 9 mm de ces papiers-filtre baignant dans 1,3 ml de tampon phosphate est utilisée pour chaque animal au moment des épreuves pour réaliser une dilution voisine de 1/80.

Villages et numéros de troupeaux	Numéros de bovins	Degré de fluorescence	Examen microscopique
Sinthiou Sali T5	23 --- 32 : 10	0	Pas de trypanosomes
Médina Sali T6	33 --- 37 : 5	0	
Keur Sagar NDIAYE T7	38 1	0	
	39 1	0 à 1	
	40 --- 47 : 8	0	
Keur Diam Kodé T8	48 --- 50 : 3	0	
	51 1	0 à 1	
Diapto peul T9	52 --- 61 : 10	0	
Keur Momar Fass T10	62 --- 63 : 2	0	
	64 --- 65 : 2	0 à 1	
	66 1	1	
	67 1	0 à 1	
	68 --- 70 : 3	0	
	71 1	0	
Keur Lamine T11	72 1	0 à 1	
	73 --- 81 : 9	0	
Keur Birane T12	82 --- 88 : 7	0	
	89 1	0 à 1	

Tableau n°2 (suite)

Keur Séni Mangane T13	90	1	0	Pas de trypanosomes
	91	1	0 à 1	
Koumbidia Peul T14	92	1	0 à 1	
	93	1	0 à 1	
	94	1	0	
	95	1	0	
	96	1	0 à 1	
	97	1	0	
	98	1	0	
	99	1	0 à 1	
	100	1	0	
Kaffrine T15	101	1	0 à 1	
	102	1	0	
	103	1	0	
	104	1	0	
	105	1	0 à 1	
<u>Témoin positif n°355</u>				
a) avec conjugué dilué au 1/2			3	<i>T. brucei</i>
b) avec conjugué dilué au 1/80			3	

Constatations

- Absence de fluorescence pour tous les sujets examinés y compris ceux qui hébergeaient des parasites autres que les trypanosomes (voir tableau n°1).
- Le témoin infecté 355 est positif à +++



Tableau n°3

b) Etude des sérums

- Elle a permis d'analyser 36 sérums de bovins de Kaffrine et de Koumbidia peul à Koungheul.
- Ces sérums sont dilués au 1/80 et testés contre *T. brucei* tandis que les dilutions respectives du témoin positif et du conjugué fluorescent (C) sont de 1/40 et 1/2.

N° des bovins	Immunofluorescence	Examen direct
	Degré de fluorescence	Frottis et gouttes épaisses
106	1	
108	0 à 1	
109	0	
111	0	Pas de trypanosomes
112	1	
113	0 à 1	
114	0	
115	0 à 1	
117	0	
118	0	Anaplasmes
119	0	
121	0	
123	1	
125	0	
126	0	Pas de trypanosomes
127	0	
128	1	
129	0	
130	1	

Tableau n°3 (suite)

131	0	Pas de trypanosomes
134	2	
136	0	
137	1	
139	0	
132	0 à 1	Pas de trypanosomes
140	0 à 1	
142	1	
143	0 à 1	
144	0	
145	0	
146	0	
148	1	
149	0	
150	0 à 1	
151	0 à 1	
152	0	
<u>Témoin positif</u> <u>au 1/10</u>	3	
<u>Conjugué seul</u>	0	

Constatations

- inhibition totale de la fluorescence pour tous les échantillons analysés sauf un (n° 134) qui est faiblement positif.
- le témoin infecté présente une fluorescence de +++
- Le témoin antigène éprouvé par le conjugué seul est parfaitement sombre.

Tableau n° 4

3/ - Etude comparative des résultats obtenus par les différentes méthodes de diagnostic appliquées aux prélèvements de Kafrine-Koungheul

Méthodes d'analyse	Nombre de bovins examinés	Résultats		Espèces de trypanosomes identifiées
		Négatif	Positif	
Immunofluorescence indirecte	119	118	1	aucune
Goutte épaisse	152	152	0	"
Frottis	152	152	0	"
Examen à l'état frais	41	41	0	"

- Il y a une concordance presque absolue entre les résultats obtenus par les différentes méthodes de diagnostic aussi bien directes qu'indirectes. Cependant, l'immunofluorescence indirecte (sérum) a mis en évidence un cas faiblement positif.

Sa fluorescence rappelle celle de *T. congolense* retrouvée lors des tests hétérosécifiques (Ag *brucei*-sérum *congolense*).

B/ - SOKONE : ETUDE SUR TROUPEAUX D'ANIMAUX TRYPANOTOLERANTS

C'est encore une localité de la région du Sine-Saloum.

Elle est située plus au sud ouest non loin de la Gambie et est parsemée de forêts qui hébergent *Glossina morsitans submorsitans* et *Glossina palpalis gambiensis* vectrices de trypanosomoses animales. Ceci explique l'existence de ces affections à l'état très fortement endémique dans cette zone ; voilà pourquoi les bovins qui la peuplent ont été choisis pour la pratique des tests sur animaux suspects de trypanosomoses.

Ces tests ont utilisé 66 prélèvements provenant d'individus (N'Dama et métis) répartis dans les troupeaux appartenant aux villages situés autour de Sokone (Keur Aliou Guèye - Firdaoissi - N'Diafé). Aussi gouttes épaisses et frottis sont examinés pour chaque bovin de l'effectif après un examen sommaire de l'état général tandis que l'analyse du sang à l'état frais, et le test d'I.F.I.\* ne sont appliqués qu'à certains échantillons.

Les résultats de ces observations sont successivement exposés dans ce qui suit.

I.F.I. : Immuno-fluorescence indirecte.

1°/ - Diagnostic expérimental direct (tableaux n°5 et 6)Tableau n°5a) - Examen du sang des animaux de Keur Aliou Guèye et Sokone

Villages	troupeaux et numéros des bovins	Parasites après coloration de la goutte épaisse	Parasites après coloration du frottis	Parasites lors de l'examen à l'état frais
Keur Aliou Guèye	T <sub>1</sub> : n° 1 n° 2 n° 3 n° 4 n° 5 n° 6	+ : <u>T. congolense</u>	+ : <u>T. congolense</u>	
	n° 7 n° 8 n° 9 n° 10 n° 11 n° 12			
Sokone	n° 25	+ : <u>T. vivax</u>	+ : <u>T. vivax</u>	+ : <u>T. vivax</u>
Keur Aliou Guèye	T <sub>2</sub> n° 13 n° 14 n° 15 n° 16 n° 17			
	n° 18 n° 19 n° 20 n° 21 n° 22 n° 23 n° 24	+ micro-filaires		

Tableau n° 6

b) - Examen du sang des animaux de Firdaoissi

Villages	Troupeaux et n° des bovins	Parasites après colo- ration de la goutte épaisse	Parasites après colo- ration du frottis	Examen à l'état frais	
Firdaoissi	n° 26				
	27				
	28				
	29	T <sub>1</sub>	+ : <u>T. congo-</u>	+ : <u>T. congo-</u>	
	30		<u>lense</u>	<u>lense</u>	
	31				
	32				
	33				
	34		+ : micro-		
	35		filaires		
	36				
	37				
	38				
	39				
	40	T <sub>2</sub>			
	41				
	42				
	43				
	44				
	45				
46					
47					
48					
49		+ : <u>T. congo-</u>	+ : <u>T. congo-</u>		
50		<u>lense</u>	<u>lense</u>		

### CONSTATATIONS

- sur l'ensemble des 50 animaux examinés à cause de leur mauvais état général, seuls 4 ont présenté des trypanosomes (*T.congolense* et *T.vivax*)
- du sang récolté sur un des sujets positifs (n°25 avec *T.vivax*) et inoculé à une chèvre pour garder la souche a donné lieu à une trypanosomose expérimentale,
- 2 sujets de l'effectif hébergeaient des microfilaires.

On peut noter que le bovin n° 25 (Tableau 5) parasité par *T.vivax* est une vache dont le tableau clinique avait inspiré une forte suspicion de trypanosomose (cachexie - anorexie - abattement - larmolement, agalactie etc.) Son sang inoculé à une chèvre par voies intra péritonéale et en sous-cutanée devait confirmer le résultat de l'analyse à l'état frais car quelques jours après inoculation l'animal présentait des symptômes de la maladie tandis que le prélèvement sanguin révélait des trypanosomes.

c/ - Examen microscopique sur les animaux de N'Diafé-N'Diafé N'dama pure  
(frottis et goutte épaisse)

Tableau n° 7

Village	Troupeau et n° des bovins	Parasites après coloration	
		goutte épaisse	frottis
N'Diafé-N'Diafé	51		
	52		
	53	+ <i>T. vivax</i>	<i>T. vivax</i>
	54		
	55		
	56		
	57		
	58		
	59	<i>T. congolense</i>	<i>T. congolense</i>
	60		
	61	<i>T. congolense</i>	<i>T. congolense</i>
	62		
	63		
	64		
	65		
	66		



2°/ - Diagnostic expérimental indirect par la technique d'immuno-fluorescence

a/ - Keur Aliou Guèye - Sokone - Firadoissi

Il est appliqué à l'analyse de 21 échantillons de sérums bovins. L'antigène *T.brucei* éprouvé par le conjugué fluorescent (anti-globuline bovine D dilué au 1/5 est utilisé pour tester les sérums considérés dilués au 1/80 et 1/320).

Tableau n°8

Villages	N° des bovins	Degré de fluorescence observé aux dilutions des sérums	
		1/80	1/320
Keur Aliou Guèye	n° 1	2	1
	2	2	1
	T <sub>1</sub> 3	3	3
	4	2	0 à 1
	5	3	2
	6	3	2
	14	2	1
	15	2	1
	T <sub>2</sub> 16	1	1
	20	0 à 1	0
	21	2	2
	22	0 à 1	0 à 1
Sokone	25	3	1

Tableau n°8 (suite)

Village	N° des bovins	Degré de fluorescence observé aux dilutions des sérums	
		1/80	1/320
Firdaoissi	n° 26	1	1
	27	1	0 à 1
	28	2	1
	29	3	2
	<u>T<sub>3</sub></u> 38	2	2
	<u>T<sub>4</sub></u> 39	1	0 à 1
	40	2	1
	41	0 à 1	0 à 1
	<u>Témoins :</u>		
	<u>sérum positif</u>		
	355	3	3
	<u>sérum négatif</u>		
	289	1	1
	conjugué seul	0	0

CONSTATATIONS

- fluorescence de +++ pour 5 sérums examinés à la dilution de 1/80 ;
- 3 seulement des 5 sujets précédents avaient présenté des trypanosomes à l'examen direct ;
- pas de fluorescence pour l'animal parasité par des micro-filaires.

CONCLUSION

sensibilité de l'immuno-fluorescence indirecte supérieure à celle de l'examen direct, car elle présente plus de cas positifs.

- b/ - Test d'immunofluorescence indirecte sur sérums de N'Dama pure de N'Diafé-N'Diafé.
- Méthode classique pratiquée sur 6 sérums dilués au 1/80 et 1/320
  - antigène utilisé : Trypanosoma brucei
  - conjugué fluorescent anti  $\gamma$  globuline (D) à la dilution de 1/5

Tableau n°9

Village	N° des bovins	Degré de fluorescence avec dilutions des sérums	
		1/80	1/320
N'Diafé-N'Diafé	51	2	2
	54	2	1
	57	0 à 1	0 à 1
	61	2	1
	63	0 à 1	0 à 1
	64	3	1
	témoins sérum positif : 355	3	3
	sérum négatif 284	1	1
	conjugué seul	0	0

- Un seul cas de fluorescence significative (+++) à la dilution de 1/80. A l'examen direct, cet animal était négatif alors que le n° 61 qui était positif a été faiblement fluorescent (++) .

Tableau n° 10

3°/ - Etude comparative des résultats obtenus par les différentes méthodes d'analyse appliquées aux échantillons de Sokone

Méthodes d'analyse	Nbre de bovins examinés	Résultats		Espèces de trypanosomes identifiées
		positifs	%	
Immuno-fluorescence indirecte	27	6(+++)	22,2	
Goutte épaisse	66	6	9	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>
Frottis	66	7	10,6	<i>T. vivax</i> <i>T. congolense</i>
Inoculation		-	1	<i>T. vivax</i> (N°25 dont le sang a été inoculé à 1 chèvre)

#### CONSTATATIONS

L'examen par immunofluorescence révèle plus de cas positifs que les méthodes directes (goutte épaisse - frottis - examen à l'état frais et inoculation).

CHAPITRE II

Etude sur troupeaux inconnus

A/ Bovins du Brésil

Dans ce cadre, nous avons trouvé intéressant d'éprouver par la technique de COONS des prélèvements sanguins recueillis sur zébus Guzera brésiliens importés par le Sénégal et qui étaient mis en quarantaine à la station d'élevage des Almadies (DAKAR), en attendant leur acheminement vers le centre de recherches zootechniques de Dahra. L'examen direct (goutte épaisse et frottis) pratiqué sur ces échantillons n'a donné aucun résultat positif. Aussi ces prélèvements au nombre de 24 sont soumis à l'analyse par immuno-fluorescence indirecte en utilisant l'antigène *T. brucei* et le conjugué fluorescent anti  $\gamma$  globuline (D) à la dilution de 1/5. Le tableau 11 donne les résultats

Tableau n°11

Numéros des bovins	Degré de fluorescence avec dilutions de sérums au		Examen microscopique
	1/80	1/320	
1	1	0 à 1	Tous les animaux sont négatifs
2	0 à 1	0	
4	0 à 1	0	
5	0	0	
6	1	0 à 1	
7	0	0	
8	0 à 1	0	
9	2	0 à 1	

Tableau n° 11 (suite)

Numéros des bovins	Degré de fluorescence avec dilutions de sérums au		Examen microscopique
	1/80	1/320	
282	2	1	
292	1	0	
295	1	0	
1171	2	1	
1730	0 à 1	0 à 1	
1764	1	0 à 1	
1765	0 à 1	0 à 1	
1766	1	0 à 1	
1768	0 à 1	0 à 1	
1769	1	0	
1770	0 à 1	0	
1771	2	0 à 1	
1778	1	0 à 1	
1781	0 à 1	0 à 1	
1785	0 à 1	0	
1786	0 à 1	0	
<u>témoins</u>			
sérum positif 355	3	3	
sérum négatif 289	0 à 1	0	
conjugué seul	0	0	

CONSTATATIONS

- sur les 24 sujets examinés, seuls 4 présentent une faible fluorescence (++) ;
- le témoin infecté est positif à +++ tandis que les témoins (non infecté et antigène seul) sont parfaitement négatifs.

CONCLUSION

Concordance résultats de l'I.F.I.\* et de l'examen direct car les fluorescences de ++ constatées ici ne peuvent être considérées comme significatives d'une trypanosomose.

\* I.F.I. = Immuno-fluorescence indirecte.

B/ ETUDE SUR TROUPEAUX INCONNUS DU FOUTA (Nord-Est de la région du Fleuve)

Elle est effectuée sur 29 sujets bovins de l'arrondissement de Kanel (sud-est du département de Matam).

- Les lames préparées à cet effet (gouttes épaisses-frottis) et examinées directement au microscope après coloration n'ont révélé qu'un seul cas positif pour *T. vivax*.
- Quant aux sérums, ils ont été soumis à l'analyse par la méthode d'immuno fluorescence indirecte dont les résultats sont figurés dans le tableau suivant.

Tableau n° 12

Diagnostic par immuno-fluorescence indirecte (méthode des sérums utilisant *T. brucei* comme antigène

Le conjugué fluorescent D est utilisé à la dilution de 1/5

Localités	N° des bovins	Degré de fluorescence observé aux dilutions des sérums	
		1/80	1/320
Kanel (12 sérums)	99	3	2
	100	3	2
	101	3	3
	102	3	3
	103	3	1
	104	3	1
	105	3	1
	106	3	2
	107	3	2
	108	3	2
	109	3	2
	110	2	2



Tableau n°12 (suite)

Localités	N° des bovins	Degré de fluorescence observé aux dilutions des sérums	
		1/80	1/320
Foumi-Hari (15 sérums)	112	3	2
	113	2	1
	114	3	2
	115	3	1
	116	3	3
	117	3	3
	118	3	3
	119	3	2
	120	3	3
	121	3	2
	122	3	2
	123	3	2
	124	2	1
	125	3	2
	126	3	2
Diam-Weli (2 sérums)	127	2	2
	128	2	2
Témoins	infectés : <i>T. brucei</i> 355	3	3
	<i>T. congolense</i> 289	2	1
	conjugué seul	0 à 1	0 à 1
	non infecté	2	1

CONSTATATIONS

- pas de trypanosomes à l'examen microscopique des prélèvements de sang sauf dans un cas à *T. vivax* ;
- 24 animaux sont positifs (+++) à la dilution de 1/80 dans l'analyse par I.F.I. (immuno-fluorescence indirecte ).

Il est à noter que les animaux **avaient** transhumé vers le sud (Bakel = zone d'enzootie trypanosomienne et auraient reçu un traitement trypanocide (Bérénil).

CHAPITRE IIIVALEUR DE L'IMMUNO-FLUORESCENCE INDIRECTE  
DANS LES TRYPANOSOMOSES BOVINES NATURELLES

Certaines observations recueillies à l'issue de ces essais démontrent à l'évidence que l'immunofluorescence indirecte est bien une méthode sensible dans le diagnostic des trypanosomoses naturelles bovines. A certains moments, cette sensibilité de la technique de WELLERS et COONS a égalé celle de l'examen microscopique. C'est le cas notamment dans les tests réalisés sur les bovins suspects de Kounghoul-Kaffrine (tableau 3) et dans ceux pratiqués sur les zébus brésiliens.

A d'autres moments cependant l'immunofluorescence indirecte s'est révélée plus sensible que l'examen direct, ainsi qu'en témoigne l'enquête de Sokone (zone d'enzootie trypanosomienne : (tableau 10). En effet, lors de ce diagnostic de masse, sur 27 sujets examinés 6 sont positifs à l'analyse sérologique et parmi ces 6, seuls 3 ont présenté des trypanosomes à l'observation microscopique ; les épreuves de Kounghoul-Kaffrine en font foi aussi, puisque la méthode a pu déceler sur un sujet qui était négatif à la goutte épaisse et au frottis une fluorescence de ++. Une autre preuve de la grande sensibilité de l'immuno-fluorescence indirecte est fournie par les animaux de Matam de statut indéterminé. Ces animaux bien que négatifs pour la recherche des trypanosomes, ont dans l'ensemble répondu positivement à la sérologie (fluorescence de +++ à la dilution de 1/80). L'explication en est que les sujets avaient séjourné dans une zone enzootique (Bakel à l'occasion des transhumances pendant les périodes difficiles de l'année, séjour au bout duquel ils ont reçu un traitement trypanocide par le Bérénil dans le cadre d'une opération de secours intitulée "sauvegarde du bétail".

Mais le test des "Ac fluorescents ne s'est pas seulement révélé sensible. Il a aussi fait montre d'une certaine spécificité. C'est ce que l'on a pu observer avec l'inhibition totale de la fluorescence pour des sérums d'animaux parasités par *Theileria mutans* (piroplasmes) par des microfilaires de *Setaria* et *Anaplasma marginale* (Rickettsies) (voir examen direct tableaux 1 à 3) et testés contre l'antigène trypanosomien.

En fait sensibilité et spécificité de l'immunofluorescence indirecte se retrouvent dans toutes les recherches qui ont utilisé la méthode aussi bien dans les trypanosomoses humaines que dans les affections similaires bovines :

- chez l'homme il y a les travaux de CUNNINGHAM et al (1965) (16), de BAILEY et al (1966) (7). Pour ces auteurs, le test des anticorps fluorescents présente une haute spécificité liée à une bonne fidélité. C'est aussi l'avis de WERY et collaborateurs (39-40-41-42) qui ont pu réaliser un nombre considérable d'enquêtes dans les zones d'endémie trypanosomienne. Voici certaines de leurs observations:

En 1970, sur 135 cas de maladie du sommeil examinés, 133 ont été positifs à l'immunofluorescence indirecte tandis que sur 1170 individus supposés indemnes et examinés par d'autres méthodes, la sérologie a révélé 22 réactions positives, bien que l'examen direct n'ait montré que 17 sujets parasités.

Deux autres enquêtes menées en zone hyperendémique en 1971 montrent à la fois que sur 4500 personnes, 90 ont eu une réaction positive et seuls 57 des 90 étaient positifs à la microscopie classique, d'autre part que sur 1200 prélèvements recueillis dans les mêmes régions 30 ont conduit à une fluorescence positive. Ces auteurs font de plus remarquer que la positivité de la réaction d'immunofluorescence indirecte est constante dans la maladie du sommeil très tôt au cours de l'infection.

D'autres auteurs qui ont appliqué la méthode chez les bovins adhèrent à l'opinion qui veut que la technique de WELLERS et COONS soit un procédé sensible et spécifique de diagnostic des trypanosomoses [WILSON (47), M<sup>W</sup>WAMBU (32), WAIN (38)]. Ces mêmes auteurs s'accordent toutefois à penser que la méthode ne permet pas de dépister des cas d'infection récente dans les trypanosomoses animales.

Ceci est notamment l'avis de M<sup>W</sup>WAMBU et al (32) pour qui l'immunofluorescence indirecte n'est pas utilisable dans le diagnostic précoce de la maladie parce que le taux des anticorps n'atteint un niveau détectable qu'après la phase clinique. Ce fait paraît évident dans leur étude car sur 46 cas positifs par la goutte épaisse, 6 étaient négatifs à la sérologie. ASHKAR et al (1972), ZWART et al (1973) (6 et 49) pensent de même.

De plus, toutes ces études insistent sur le fait qu'après un certain délai, la technique découvre la plupart des animaux qui ont été soumis à l'action des trypanosomes parce que les anticorps induits lors de ce contact demeurent longtemps détectables même après traitement. Ce qui laisse aussi supposer comme, nous l'avons déjà indiqué que la méthode ne permet pas de faire la distinction entre une infection présente et une infection d'un passé récent guérie par des trypanocides. Ceci a été observé dans les analyses se rapportant à la région de Matam où beaucoup de cas sont positifs ; les sérums analysés provenaient d'animaux traités par le Bérénil.

Les recherches faites par les auteurs ci-dessus relèvent aussi l'existence de réactions croisées entre souches de trypanosomes animaux (*T. vivax*, *congolense*, *brucei* et *theileri*).

- WAIN et al 1966 (38) notent l'existence d'anticorps communs à *T. vivax*, *T. congolense*, ZWART et al (49) entre *T. brucei*, *T. congolense* et *vivax*, WILSON (46) entre souches pathogènes (*T. congolense* et *T. brucei*) et non pathogènes (*T. theileri*), bien que dans ce dernier cas, le taux des anticorps soit faible (dilution de 1/20).

Pour notre part, les résultats enregistrés dans les enquêtes en zone d'enzootie dénotent avec certitude l'existence d'une communauté antigénique entre *T. brucei*, *vivax* et *congolense*. C'est pourquoi si la parenté antigénique qui lie les trypanosomes ôte pour le moment au test des "anticorps fluorescents" une stricte spécificité, elle permet cependant le dépistage des trypanosomoses animales, et elle est utilisable sur une grande échelle pour faciliter la lutte contre ces affections dans les zones où elles sont très fortement enzootiques. Aussi l'immunofluorescence indirecte peut-elle être considérée comme un moyen de diagnostic. Elle peut rendre de grands services dans des troupeaux présentant une morbidité d'origine indéfinie, troupeaux dont on est sûr qu'ils n'ont pas reçu de traitement trypanocide. C'est une méthode valable pour juger un troupeau qui a été infecté plutôt que pour juger de l'infection d'un individu.

## CONCLUSIONS

Il est de notoriété que les trypanosomoses bovines, de par leur caractère enzootique et insidieux voire mortel, constituent l'une des grandes causes de la carence protidique de certaines populations africaines au sud du Sahara. Dès lors, il s'avère très utile de disposer d'un moyen rapide, efficace et bon marché capable de les déceler afin de faciliter la tâche à ceux qui ont pour mission de les combattre. C'est pour rechercher un tel moyen que la présente étude a porté sur l'immunofluorescence indirecte comme méthode diagnostique des trypanosomoses bovines. Et si notre préférence n'est pas allée à une autre technique, c'est peut-être autant par le regain d'actualité que connaît aujourd'hui le test des "anticorps fluorescents" que par le succès grandissant qu'il ne cesse de remporter dans divers domaines de la pathologie; mais il y a surtout que les travaux utilisant la méthode dans les trypanosomoses animales sont demeurés jusqu'ici trop fragmentaires.

Aussi, pour voir dans quelle mesure l'immunofluorescence indirecte est applicable au diagnostic de ces affections, nous l'avons d'abord évaluée dans des infections expérimentales; nos efforts furent ensuite portés sur son appréciation chez d'autres bovins vivant dans des régions géographiques à situation sanitaire plus ou moins déterminée en matière de trypanosomoses. A l'issue de cette série d'essais, nous nous sommes rendus compte du fait que si l'immunofluorescence indirecte est effectivement sensible, rapide, reproductible et bon marché ainsi qu'il a été d'ailleurs signalé par nombre d'autres recherches qui lui furent consacrées, il n'en demeure pas moins que la méthode se voit apparemment privée pour le moment à la fois, de spécificité stricte lui conférant la possibilité de faire le diagnostic précis de l'espèce de trypanosomes en cause, et de l'aptitude à déceler des cas d'infection récente (moins de 15 jours) ou des cas d'infection ancienne mais traitée. L'explication

de cette insuffisance est qu'il existe non seulement une certaine communauté antigénique entre les diverses souches de trypanosomes animaux, mais aussi que le taux des anticorps chez les sujets atteints de la maladie reste faible avant la phase clinique, augmente par la suite et persiste au même niveau même après traitement. Aussi, pensons-nous que des études particulières d'immunologie sur les trypanosomoses méritent d'être poursuivies pour apporter plus de précision dans l'application de l'immunofluorescence indirecte. En attendant cependant, il nous est loisible de constater que la méthode peut valablement servir de moyen de diagnostic statistique et épizootiologique des trypanosomoses bovines dans les régions où elles sont fortement endémiques.



BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AMBROISE-THOMAS (P.) (1963).- L'immunofluorescence dans le diagnostic direct et indirect des parasitoses. Applications à la toxoplasmose.  
*Thèse Médecine*, Lyon, Imprimerie des Beaux Arts, edit. 121pp.
- 2 - AMBROISE-THOMAS (P.) (1969).- Etude séro-immunologique sur 10 parasitoses par les techniques d'immunofluorescence.  
*Institut de Médecine et d'Hygiène tropicales*, Lyon, edit. 645 pp.
- 3 - AMBROISE-THOMAS (P.) (1970).- Intérêt de l'immunofluorescence dans le diagnostic, le contrôle post-thérapeutique et la surveillance épidémiologique des parasitoses.  
*J. Parasit.*, 56 (4) : 4-5.
- 4 - AMBROISE-THOMAS (P.) et KIEN-TRUONG (T.) (1971).- Intérêt de l'immunofluorescence dans le dépistage et l'étude épidémiologique des paludismes humains.  
*Bull. Org. Mond. Santé*, 44 (5) : 699-706.
- 5 - ANONYME (1967).- Cours sur les techniques d'immunofluorescence.  
*Institut Pasteur*, Paris, 243 + 207 pp. O.M.S.
- 6 - ASHKAR (T.) and OCHILO (M.).- The application of the indirect fluorescent antibody test to samples of sera and dried blood from cattle in the Lambwe Valley South Nyanza Kenya.  
[*Bull. W.H.O.* 1972, 47(6) : 769 - 72] in *Trop. Diseases Bull.* 1973 - 70 (11) : 1057 - 1058 abstracts.

- 7 - BAILEY (N.M.), CUNNINGHAM (M.P.) et KIMBER (C.D.) (1966).- The indirect fluorescent antibody test applied to direct blood samples for the diagnosis of human trypanosomiasis.  
*East-African Trypanosomiasis Research Organization, Tororo, Uganda. Annual Report, pp. 33-34.*
- 8 - BALOZET (L.) (1946).- La réaction de déviation du complément après le traitement de la dourine par la méthode de Cuica.  
[Bull. Acad. Veter., France : p. 240. 1946]. analysé dans *Rev. Elev. Méd. Véter. pays trop.*, 1947, 1 p. 242.
- 9 - BIDEAU (J.), GIDEL (R.) et MOTTY (Y.) (1966).- Note préliminaire sur l'étude immuno-électro-phorétique du sérum de bovins trypanosomés.  
*Bull. Soc. path. exot.*, 59 (5) : 817-825.
- 10 - BOCHET (J.M.) (1963).- L'immunofluorescence et ses applications en Microbiologie : Recherches et résultats personnels.  
*Thèse Médecine, Paris*
- 11 - BUSSIERAS (J.).- Cours magistral de parasitologie professé à l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine vétérinaires de Dakar - 1970-1972.
- 12 - CHANTIAL (J.).- Cours magistral d'Immunologie professé à l'Ecole Inter-Etats des Sciences et Médecine vétérinaires de Dakar - 1972.
- 13 - CLARKSON (M.J.) et Mc CABE (W.) (1970).- *Trypanosoma vivax* in Ruminants.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 64 (1) : 164-165.

- 14 - COURTOIS (D.) et BIDEAU (J.) (1966).- L'immunofluorescence appliquée au diagnostic de la trypanosomiase humaine africaine. Valeur comparée avec le titrage de l'immunoglobuline **IgM**.  
*Bull. Soc. Path. exot.*, 59 (5) : 809-817.
- 15 - CUNNINGHAM (M.P.), BAILEY (N.M.) et KIMBER (C.D.) (1966).- The estimation of Ig.M. immunoglobulin in dried blood for use as screening test in the diagnosis of human trypanosomiasis.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization*, Tororo, Uganda. Annual Report : pp. 35-38.
- 16 - CUNNINGHAM (M.P.), GRAINGE (E.B.) (1965).- A method for diagnosing trypanosomiasis using the I.F.A. technique  
*East African trypanosomiasis Research Organization*, Tororo, Uganda, Annual Report : p. 31.
- 17 - CUNNINGHAM (M.P.), WILSON (A.J.) et KIMBER (C.D.) (1966).- Modification of the indirect fluorescent antibody test as applied to bovine trypanosomiasis.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization*, Tororo, Uganda, Annual Report : pp. 29-32.
- 18 - FIFE (E.H.) et MUSCHEL (L.H.) (1959).- Fluorescent-antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection.  
*Proc. Soc. exp. biol. Med.*, 101 : 540-543.
- 19 - GARIN (J.P.), KIEN-TRUONG (T.), AMBROISE-THOMAS (P.) et HUMBERT (G.), (1969).- Nature immuno-chimique et valeur diagnostique des anticorps fluorescents dans la maladie du sommeil. A propos d'un cas observé en France.  
*La Presse Médicale*, 77 (32) : 1135-1136.

- 20 - GEORGET (J.P.) (1967).- Le diagnostic sérologique de l'amibiase par immunofluorescence.  
*Thèse Médecine, Lyon*
- 21 - GOLDMAN (M.) (1968).- Fluorescent antibody methods.  
*Academic Press, edit. New-York and London - 303 pp.*
- 22 - KILLICK - KENDRICK (R.) (1968).- The diagnosis of trypanosomiasis of livestock. A review of current technics.  
*The Vet. Bull.,* 38 (4) : 191-197.
- 23 - KIMBER (C.D.) (1965).- A method for diagnosing human trypanosomiasis using the indirect fluorescent antibody technic.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization, Tororo, Uganda, Annual Report : pp. 31-32.*
- 24 - KIMBER (C.D.) et WILSON (A.J.) (1966).- Preparation and evaluation of a rabbit antibovine conjugate labelled with fluorescein-isothiocyanate.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization, Tororo, Uganda, Annual Report : pp. 25-26.*
- 25 - LAMY (L.)- Diagnostic des parasitoses à protozoaires et Helminthes au Laboratoire;deuxième édition - Edition de la Tournelle, 5, rue Guynemer, 5 - 94 - Sain Mandé - 371 p.
- 26 - LATIF (B.N.A.) (1972).- The specificity of fluorescent antibody test for *Trypanosoma* infections in rodents.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.,* 66 (2) : 349 (abstract).

- 27 - MATTERN (P.), MASSAYEFF (R.), MICHEL (R.) et PERETTI (P.) (1961).- L'étude immunochimique de la  $\beta_2$  macroglobuline des sérums de malades atteints de la trypanosomose africaine à *T.gambiense*.  
*Ann. Institut Pasteur Paris.* 101 (3) : 382-388.
- 28 - MATTERN (P.) et PERETTI (P.) (1969).- Tentative d'éradication de la trypanosomiase humaine dans un foyer résiduel grâce au dosage d'IgM sérique et céphalo-rachidienne.  
*Med. Afr. Nre.* 16 (1) : 145-146.
- 29 - MEHLITZ (D.), DEINDL (G.) (1973).- Serological studies on cattle experimentally infected with African trypanosomes. Preliminary Communication.  
*Z. Tropenmed. Parasit.*, 23 (4) : 411-417.
- 30 - van MEIRVENNE (N.), MOORS (S.A.) et YANSSENS (P.G.) (1972).- Serological studies on animals experimentally infected by african trypanosomes.  
*Trans. Soc. trop. Med. Hyg.*, 66 (2) : 333-334.
- 31 - MORNET (P.) (1955).- Les hématozooses animales et la carence protidiques des populations humaines.  
*Rev. Elev. Méd. vétér. Pays trop*, 8 (2-3) : 277
- 32 - M'WAMBU (P.M.) et OMASET (P.).- Evaluation of the indirect fluorescent antibody test as used in the diagnosis of bovine trypanosomiasis.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization,*  
Tororo, Uganda, Annual Report : pp. 23-24.

- 33 - SADUN (E.H.) et DUXBURY (R.E.) (1963).- Fluorescent antibody reaction in *Trypanosoma rhodesiense* and *Trypanosoma gambiense* in experimental animals.  
*J. Parasit.*, 49 : 380-384.
- 34 - SADUN (E.H.), DUXBURY (R.E.), WILLIAMS (J.S.) et ANDERSON (R.I.) (1963).- Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of African and American trypanosomiasis in man.  
*J. Parasit.*, 49 : 385-388.
- 35 - SCHINDLER (R.) (1972).- Serological reaction in different animal species after an infection with *Trypanosoma brucei*.  
*Trans.R.Soc. trop. Med. Hyg.*, 66 (2) : 348.
- 36 - SCHINDLER (R.) (1972).- Untersuchungen über die Brauchbarkeit serologischer Verfahren für die diagnose der Rindertrypanosomiasis in Afrika (Etude de la technique indirecte des anticorps fluorescents.  
  
(Etudes sur l'application de méthodes sérologiques pour le diagnostic différentiel de la trypanosomiase bovine en Afrique).  
*Z. Tropenmed Parasit.*, 23 (1) : 78-88.
- 37 - TOURE (S.M.) (1971).- Les trypanosomiasés animales au Sénégal. Epizootiologie et Moyens de lutte.  
*Bull. Off. inter. Epiz.*, 76 : 235-241.
- 38 - WAIN (E.B.), BURRIDGE (M.J.), PULLAN (N.B.), REID (H.W.) et SUTHERST (R.W.), (1966).- Incidence of bovine trypanosomiasis in South Busoga.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization, Tororo, Uganda : Annual Report* : pp. 59-60.

- 39 - WERY (M.), WERY-PASKOFF (S.) et van WETTERE (P.) (1970).- The diagnosis of human african trypanosomiasis (*T.gambiense*) by the use of fluorescent antibody test.  
1/ standardization of an easy technique to be used in mass surveys.  
*Ann. Soc. belges Med. trop.*, 50 (6) : 613-634.
- 40 - WERY (M.), van WETTERE (P.), WERY-PASKOFF (S.), van MEIRVENNE (N.) et MESATEWA (M.) (1970).- The diagnosis of african trypanosomiasis (*T.gambiense*) by the use of the fluorescent test.  
2/ First results of field application.  
*Ann. Soc. belges Med. trop.*, 50 (6) : 711-730.
- 41 - WERY (M.), van WETTERE (P.), WERY-PASKOFF (S.) et MESATEWA (M.) (1971).- Mass diagnosis of african trypanosomiasis (*T.gambiense*) by the use of indirect fluorescent antibody test. Preliminary results.  
*J. Parasit.*, 57 (4) Sect. 2 : 34.
- 42 - WERY (M.) et BURKE (J.) (1972).- Human "Healthy carriers" of trypanosoma (*brucei* type) discovered by immunofluorescence test in the Democratic Republic of Congo.  
*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 66 (2) : 332-333.
- 43 - van WETTERE (P.) (1971).- Note on the epidemiology of sleeping sickness in the Democratic Republic of the Congo.  
*J. Parasit.*, 57 (4), Sect. 2 : 68.
- 44 - WIESENHUTTER (E.) (1973).- Comparative studies on the value of the indirect fluorescent antibody test as an aid to diagnosis bovine trypanosomiasis in Africa.  
*Z. Tropenmed Parasit.*, 24 (1) : 60-66.

- 45 - WIESENHUTTER (E.) (1969).- An evaluation of the indirect fluorescent antibody technique in bovine trypanosomiasis after chemoprophylaxis.  
*Z. Tropenmed. Parasit.*, 20 (2) : 131-136.
- 46 - WILSON (A.J.), CUNNINGHAM (M.P.) et KIMBER (C.D.) (1966).- The indirect fluorescent antibody test applied to bovine trypanosomiasis.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization*, Annual Report, pp. 28-29.
- 47 - WILSON (A.J.) (1967).- Pattern of common antibody in bovine trypanosomiasis.  
*East African Trypanosomiasis Research Organization*, Annual Report, p. 18.
- 48 - WILSON (A.J.) (1969).- Value of the indirect fluorescent antibody test as a serological aid to diagnosis of glossina-transmitted bovine trypanosomiasis.  
*Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 1 (2) : 89-95.
- 49 - ZWART (D.), PERIE (N.M.), KEPPLER (A.), GOEDBLOED (E.) (1973).- A comparison of methods for diagnosis of trypanosomiasis in East African domestic ruminants.  
*Trop. Anim. Hlth. Prod.* 5 (2) : 79-86.



VU :

Le Directeur  
de l'Ecole Inter-Etats des Sciences  
et Médecine Vétérinaires :

Professeur J. FERNEY

Le Professeur Responsable de  
l'Ecole Inter-Etats des Sciences et  
Médecine Vétérinaires

Professeur J. BUSSIERAS

VU :

Le Doyen  
de la Faculté de Médecine  
et de Pharmacie

Le Président de la Thèse

Professeur M. SANKALE

Professeur J. LINHARD

Vu et permis d'imprimer

DAKAR, le

Le Recteur, Président du Conseil Provisoire de l'Université