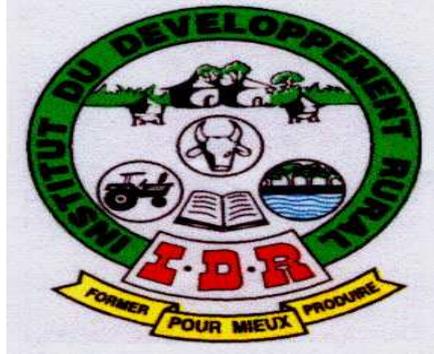


**BURKINA FASO  
UNITE-PROGRES-JUSTICE**

**MINISTERE DES ENSEIGNEMENTS SECONDAIRE,  
SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

-----  
**UNIVERSITE POLYTECHNIQUE DE BOBO-DIOULASSO (UPB)**

-----  
**INSTITUT DU DEVELOPPEMENT RURAL (IDR)**



## **MEMOIRE**

Présenté par :

**Ousmane TRAORE**

*Maître ès Sciences*

Pour l'obtention du :

**Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)**

en

**Biologie Appliquée et Modélisation des Systèmes Biologiques (BA/MSB)**

**Thème :**

***DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE OPERATIONNEL DE PRODUCTION  
D'ANTISERUM MARQUE POUR  
LES TESTS DE DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE (ELISA) POUR  
LE SERODIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMOSE ANIMALES AFRICAINES.***

**Soutenu le 19 avril 2008**

**Devant le Jury :**

**Président : Professeur Georges Anicet OUEDRAOGO, UPB**

**Membres : Professeur Adrien Marie Gaston BELEM, UPB, Directeur de mémoire  
Docteur Zakaria BENGALY, CIRDES Bobo-Dioulasso, Maître de stage**

**Année universitaire 2007-2008**

**N° d'ordre : .....**

## *DEDICACE*

*.....à ma détermination personnelle,  
Je dédie le présent document.*

*La volonté est une arme infaillible,  
L'espoir est juste une rémission dans la bataille...*

*.....au tout puissant, je demande l'assurance de mon  
honneur dans le bonheur d'autrui.....*

## **REMERCIEMENTS**

Le présent mémoire de DEA est le fruit des efforts conjugués de plusieurs bonnes volontés. Ainsi, qu'elles trouvent ici notre profonde gratitude.

Je tiens à remercier particulièrement :

- **Les membres du jury**, pour avoir accepté de juger ce travail.
- **Le Pr. Abdoulaye GOURO**, Directeur général du CIRDES, qui a bien voulu nous accepter au sein de l'institution dont il a la charge ;
- **Le Pr. Adrien Marie Gaston BELEM** de l'Université Polytechnique de Bobo-Dioulasso, notre directeur de mémoire pour avoir accepté de nous encadrer. Nous le remercions car il a cru à nos compétences.
- **Le Dr. Zakaria BENGALY**, notre maître de stage, Immuno-Parasitologue, Chercheur et Chef de l'Unité de Recherche sur les Bases biologiques de la lutte Intégrée (URBIO), pour avoir guidé nos pas, facilité nos travaux et assuré notre encadrement. Malgré ses diverses activités administratives et scientifiques, il a toujours été disponible pour nous encadrer, nous soutenir sur tous les plans. Merci à vous Docteur. Nous vous en sommes infiniment reconnaissant.
- **Le Docteur Issa SIDIBE**, Directeur Scientifique & responsable du projet CORUS au CIRDES. Il a fait montre de sa disponibilité à faciliter notre intégration dans « la vie scientifique » du Centre ;
- **Le Dr. Augustin Babiné KANWE**, Chef de l'URPAN, pour la documentation mise à notre disposition et pour nous avoir fait partagé son expérience en biochimie ;
- **Le Dr. Augustin Ziro BANCE**, Chargé de la formation au CIRDES, pour ses multiples remarques et encouragements;
- **Les autres chercheurs** (les **Docteurs : TALAKI Essodina, El Hadj. Hassane ADAKAL, Dramane KABA, Mathurin KOFFI...**) et le **personnel du CIRDES**, pour leurs apports multiformes ;
- **Les techniciens Léopold MILLOGO, Mathias Zerbo, Hassane SAKANDE, Adrien ZOUNGRANA, Souleymane SYLLA**, pour leur assistance permanente à notre égard, non seulement à travers leur savoir faire mais aussi et surtout pour leur disponibilité ;
- **Le corps professoral du DEA** de Biologie Appliquée et Modélisation de Systèmes Biologiques (BA/MSB) à l'Université Polytechnique de Bobo (UPB) ;
- **Les collègues de DEA promotions 2007-2008, stagiaires au CIRDES et amis**, qui avez contribué et dont les noms ont été volontairement tus, qu'ils retrouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

## ***SIGLES ET ABREVIATIONS***

**ABTS** : 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]

**CIRDES** : Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide

**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité

**D.O** : Densité Optique

**DEA** : Diplôme d'Etudes Approfondies

**ELISA** : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**IgA** : Immunoglobuline de classe A

**IgM**: Immunoglobuline de classe M

**IgY** : Yolk Immunoglobulin

**NK** : Natural Killer

**OIE** : Organisation Mondiale de la Santé Animale

**PAAT**: Programme Against African Trypanosomiasis

**PATTEC**: Pan African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign

**PBS** : Phosphate Buffered Saline

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**TAA** : Trypanosomoses Animales Africaines

## SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
SIGLES ET ABREVIATIONS .....	iii
SOMMAIRE .....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES ANNEXES .....	v
ABSTRACT .....	vi
RESUME.....	vii
INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : TRYPANOSOMOSE ANIMALES AFRICAINE.....	2
1. Définition .....	2
2. Méthodes de diagnostic des TAA : épreuve immuno-enzymatique.....	2
Chapitre II : Organisation fonctionnelle du système immunitaire des oiseaux.....	5
1. Immunité innée.....	6
1.1. Cellules de la lignée myéloïde .....	6
1.2. Système du complément.....	6
2. Immunité acquise .....	7
2.1. Immunité à médiation humorale .....	7
2.2. Immunité à médiation cellulaire.....	7
3. Messagers chimiques de l'immunité : les cytokines .....	8
4. Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) .....	8
5. Transfert de l'immunité maternelle .....	8
6. Activité antigénique du jaune d'œuf et avantages .....	9
Chapitre I : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	12
1. Matériels.....	12
1.1. Le matériel biologique.....	12
2. Méthodologie .....	12
2.1. Purification des IgG .....	12
2.2. Immunisation des poules pondeuses .....	13
2.3. Préparation de l'antisérum anti-IgG bovin .....	13
2.4. Marquage de l'antisérum.....	13
2.5. Esquisse de validation de l'antisérum .....	14
3. Analyse des résultats .....	14
Chapitre II : RESULTATS.....	15
1. Purification des immunoglobulines de classe G (IgG).....	15
2. Immunisation des poules pondeuses .....	16
3. Extraction et purification des IgY .....	16
4. Détermination de l'activité de l'antisérum.....	17
5. Préparation de l'antisérum anti-IgG bovin.....	19
5.1. Le suivi des IgY totaux .....	19
5.2. Extraction et purification des IgY .....	19
6. Marquage de l'antisérum.....	20
Chapitre III : DISCUSSION .....	22
Sites web visités .....	30
<a href="http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/fr/paat/disease.html">http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/fr/paat/disease.html</a> .....	30
<a href="http://www.ird.fr/sais/cgi/Ar?unite=R177">http://www.ird.fr/sais/cgi/Ar?unite=R177</a> .....	30

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>Figure 1</b> : Principe général de la méthode ELISA.....	4
<b>Figure 2</b> : (Bourgeon <i>et al</i> , 2006). Organes immunitaires des oiseaux : exemple chez le poulet. ....	5
<b>Figure 3</b> : profil comparatif électrophorétique d'IgG.....	15
<b>Figure 4</b> : Profil d'évaluation individuelle d'IgY chez les poules expérimentales. ....	19
<b>Figure 5</b> : Profil d'évaluation des pools d'IgY chez les poules expérimentales .....	20
<b>Figure 6</b> : ELISA de détermination de l'immunisation positive .....	21
<b>Figure 7</b> : ELISA comparatif qualitatif de mise en évidence de l'activité de l'antisérum. ....	21
<b>Figure 8</b> : Kit BCA de dosage des immunoglobulines .....	III

## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau 1</b> : Taux d'IgG bovins obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium .....	15
<b>Tableau 2</b> : Récapitulatif des taux d'IgG dans le sérum des poules expérimentales 4 semaines après la dernière immunisation. ....	16
<b>Tableau 3</b> : Table comparative de la production d'IgY chez les poules expérimentales.....	16
<b>Tableau 4</b> : Récapitulatif des pools d'IgY obtenus après 10 semaines. ....	17
<b>Tableau 5</b> : Observation de l'activité des antisérums produits .....	18
<b>Tableau 6</b> : Rapport antisérums.....	18

## ***LISTE DES ANNEXES***

Annexe 1 : Fiche de suivi des poules expérimentales depuis le centre d'élevage .....	I
Annexe 2: Protocole BCA.....	II
Annexe 3 : Protocole électrophorèse.....	IV

---

## ***ABSTRACT***

Animal trypanosomiasis represents the major vectorial disease of livestock in Africa and constitutes a great obstacle to the development of breeding programs. In reference with its socioeconomic impact, the African Animal trypanosomiasis (AAT) was at the origin of numerous projects of control (PAAT, PATTEC...) in order to reduce the costs caused by this disease. In collaboration with other partners, the International Center of Research-Development on breeding in Sub-humid zone (CIRDES) has developed modern techniques of diagnosis of animal trypanosomiasis (PCR, ELISA). Among these methods, the ELISA is one that is most widely used especially during serological surveys. This technique implies the use of antisera which is commercially available, but at a very high price

One objective of this project is to popularize the ELISA in serological diagnosis of TAA, in terms of equipment available at CIRDES, different protocols have been adapted to conduct this study. Indeed, this work marks the starting point for the production of bovine antiserum anti-IgG. This research aims to develop an operational protocol of marked antiserum production for ELISA-test. The experimental work was carried out using serum from cattle immunized by *Trypanosoma brucei* to purify the IgG were then used to immunize laying hens. From the eggs laid, the IgY (anti-IgG antiserum cattle) were collected and purified. The quality of products obtained was tested and was appreciated. These results thus constitute a way for an operational and valid protocol of antiserum's production in CIRDES. Therefore it was found from this study, the possibility to produce the antiserum (IgY = yolk immunoglobulin) usable for serological diagnosis of TAA

---

***Key words:*** Protocol - antiserum Anti - IgG bovin - IgY- TAA serodiagnosis.-ELISA

---

[ousmanetraore2410@gmail.com](mailto:ousmanetraore2410@gmail.com)

---

## **RESUME**

Les trypanosomoses animales représentent la première maladie à transmission vectorielle chez le bétail en Afrique et constituent encore de nos jours un obstacle majeur au développement de l'élevage. Au regard de son impact socio-économique, la trypanosomose animale africaine (TAA), a été à l'origine de nombreux projets de lutte (PAAT, PATTEC...) initiés en Afrique pour réduire les contraintes liées à la maladie. En collaboration avec d'autres partenaires, le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES) a développé des techniques modernes de diagnostic de la trypanosomose animale (PCR, ELISA). Parmi ces méthodes, l'ELISA constitue celle qui est la plus utilisée surtout lors des études sérologiques. L'application de cette technique implique une utilisation d'antisérums, certes disponibles dans le commerce, mais à un prix rendant la technique coûteuse.

L'un des objectifs de ce projet étant de vulgariser le test ELISA dans les sérodiagnostics des TAA, au regard du matériel disponible au CIRDES, différents protocoles ont été adaptés afin de mener cette étude. En effet, il marque le point de départ pour la production d'antisérum anti-IgG bovin. La présente recherche avait pour objectif le développement d'un protocole opérationnel de production d'antisérum marqué pour les tests de dosage immuno-enzymatique (ELISA). Les travaux expérimentaux ont été effectués en utilisant du sérum de bovin hyperimmunisé au *Trypanosoma brucei*, pour purifier des IgG qui, à leur tour ont été utilisés pour immuniser des poules pondeuses. A partir des œufs pondus, les IgY (antisérum anti-IgG bovin) ont été purifiés. Les produits obtenus de cette méthodologie sont exploitables en terme qualitatif. Ces résultats constituent ainsi une ouverture sur l'élaboration d'un protocole opérationnel et valide de production d'antisérum au CIRDES. Il ressort donc de cette étude, la possibilité de produire de l'antisérum (IgY=yolk immunoglobulin) utilisable pour le sérodiagnostic des T.A.A.

---

**Mots clés :** Protocole-antisérum anti-IgG bovin-IgY- sérodiagnostic des T.A.A.-ELISA.

---

[ousmanetraore2410@gmail.com](mailto:ousmanetraore2410@gmail.com)

## **INTRODUCTION**

Les trypanosomoses animales représentent la première maladie à transmission vectorielle chez le bétail en Afrique et constituent encore de nos jours un obstacle majeur au développement de l'élevage (<http://www.ird.fr/sais/cgi/Ar?unite=R177>).

Au regard de son impact socio-économique, la trypanosomose animale africaine (TAA), a été à l'origine de nombreux projets de lutte (PAAT, PATTEC...) initiés en Afrique pour réduire les contraintes liées à la maladie. Elle demeure cependant un problème non résolu sur le continent. En plus du traitement et de la lutte antivectorielle, le diagnostic constitue un important outil pour élucider la TAA.. Compte tenu des conditions d'exercice dans les laboratoires de recherche en Afrique, ceux-ci sont généralement confrontés aux facteurs limitants que constituent l'approvisionnement et le coût des consommables et réactifs (Akpona *et al.*, 1994). Ainsi, les techniques parasitologiques sont d'application courante pour le diagnostic des trypanosomoses.

En collaboration avec d'autres partenaires, le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES) de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso) a développé des techniques modernes de diagnostic de la trypanosomose animale. Ces techniques modernes, basées sur la biologie moléculaire [*Polymerase Chain Reaction* (PCR)] et sur la sérologie [*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)], ont permis une nette amélioration du diagnostic de la trypanosomose animale (Desquesnes *et al.*, 2002 ; Bengaly *et al.*, 2001 ; Solano *et al.*, 1997 ; Delafosse *et al.*, 1996 ; Desquesnes *et al.*, 1999). Cette dernière méthode, l'ELISA, d'après Bengaly *et al.* (2003), constitue une alternative intéressante pour une meilleure connaissance de l'importance des TAA.

Son application implique l'utilisation d'antisérums, certes disponibles dans le commerce, mais à un prix rendant la technique coûteuse. La production d'antisérum dans ce centre de recherche soulagerait cette situation. Le centre est cependant doté d'appareillages et de compétences capables d'élaborer des procédés immuno-biochimiques à même de produire de l'antisérum à usage sérodiagnostic.

De nos jours, il existe des méthodes de production d'antisérum avec des procédés d'applications simples et très productives; il s'agit notamment de l'utilisation des poules pondeuses qui, à travers leurs œufs, fournissent une matière biologique de choix pour la purification d'antisérum. En effet, cette technique présente plusieurs avantages notamment leur moindre susceptibilité à produire des

anticorps de grande avidité pour les antigènes de mammifères et consiste en une méthode par laquelle il n'y a pas besoin de saigner l'animal (Dean *et al.*, 2003).

La présente étude aborde les bases prospectives d'élaboration d'antisérum au CIRDES avec pour principal mobile, la réduction du coût de la technique immuno-enzymatique de sérodiagnostic. Elle vise donc à développer un protocole de production d'antisérum marqué pour le sérodiagnostic des T.A.A., avec pour objectif principal : améliorer la vulgarisation des tests ELISA. Plus spécifiquement, il s'agit de :

- développer un protocole opérationnel de production d'antisérum marqué;
- mettre en place une technique de purification des immunoglobulines.

Première partie :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## ***Chapitre I : TRYPANOSOMOSES ANIMALES AFRICAINES***

### **1. Définition**

Les trypanosomoses animales africaines (TAA) désignent une maladie causée par plusieurs espèces de protozoaires parasites du genre *Trypanosoma*, transmises de façon biologique par les glossines (genre *Glossina*). Les mouches tsé-tsé infestent 9 millions de km<sup>2</sup> et affectent 37 pays (<http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/fr/paat/disease.html>).

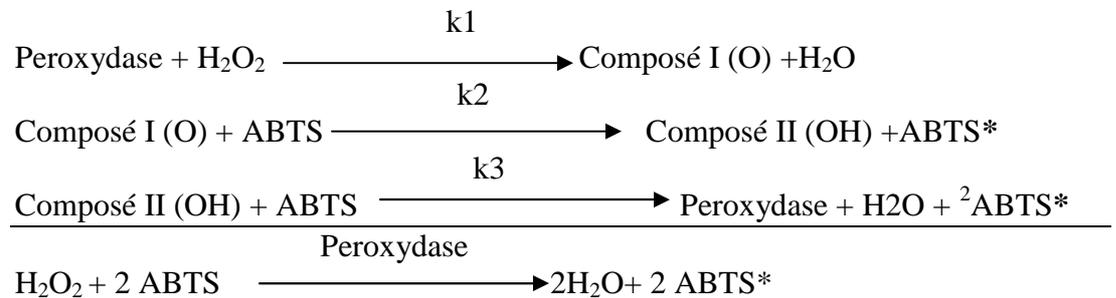
La maladie concerne des espèces variées de mammifères mais, d'un point de vue économique, les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé sont particulièrement importantes chez le bétail. Les espèces pathogènes les plus importantes pour le bétail sont *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei*. *T. uniforme*, *T. simiae* et *T. suis* sont des espèces moins communes transmises par les tsé-tsé. *T. vivax* est également transmis mécaniquement par des mouches piqueuses. Les trypanosomoses transmises par les tsé-tsé affectent également l'homme, provoquant la maladie du sommeil due à *T. brucei gambiense* ou *T. brucei rhodesiense*. Les signes cliniques des trypanosomoses transmises par les mouches tsé-tsé sont généralement une fièvre intermittente, des oedèmes, des avortements et de l'amaigrissement. L'anémie est observée habituellement chez l'animal parasité, suivie d'une dégradation de l'état général, d'une baisse des productions et souvent de mortalité. Le diagnostic doit reposer sur des techniques directes qui confirment la présence de trypanosomose soit par observation microscopique directe, soit par des méthodes indirectes de sérologie, soit encore par l'amplification en chaîne par polymérase (PCR) (OIE, 2005).

### **2. Méthodes de diagnostic des TAA : épreuve immuno-enzymatique**

Le sérodiagnostic des TAA vise à détecter le parasite à travers la capture des antigènes circulants, et à révéler le contact de l'hôte avec le trypanosome. Ces méthodes sont sensibles mais manquent de spécificité à cause des réactions croisées entre espèces ou sous-espèces de trypanosomes. Les méthodes les plus utilisées sont la réaction de fixation du complément, l'immunodiffusion, le CATT, l'hémagglutination, l'immunofluorescence et le dosage immuno-enzymatique (ELISA). Cette dernière technique est largement utilisée dans le diagnostic des TAA.

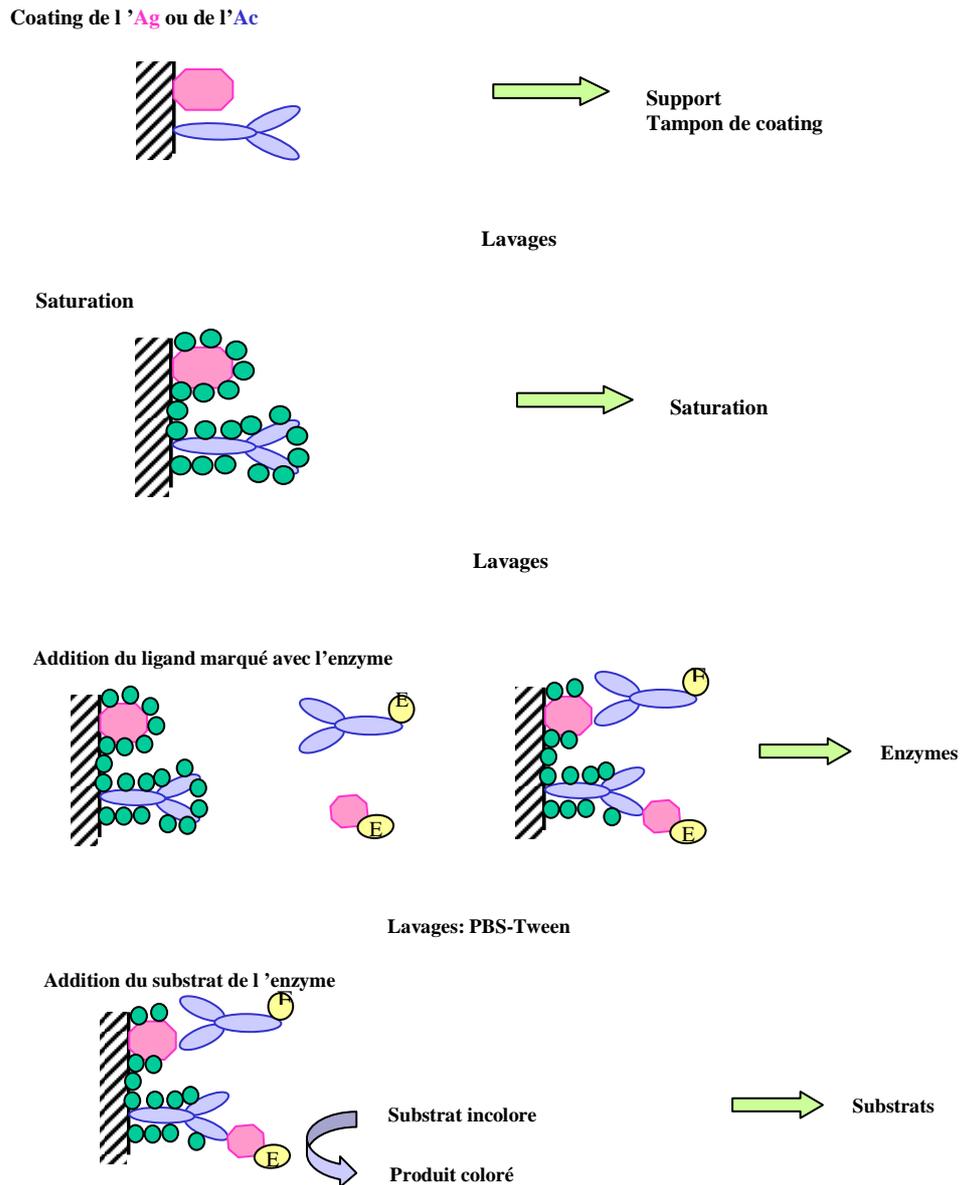
## Principe de base de l'ELISA

L'une des principales applications quantitatives des immunodosages est l'ELISA: (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Pour mesurer la nature du signal dans un ELISA, on utilise l'activité enzymatique d'une enzyme (phosphatase alcaline, peroxydase de raifort, etc.). Les ELISA peuvent se baser sur une détection colorimétrique simple ou, de plus en plus, sur la chémiluminescence (Gaastra, 1984). La méthode ELISA décrite par Engvall et Perlmann (1971) a été adaptée au diagnostic de nombreuses maladies infectieuses du bétail (Voller *et al.*, 1976) dont la trypanosomose. Elle consiste à la détection des anticorps circulant. L'ELISA-indirect est une variante de l'ELISA, et a servi pour le dosage des anticorps (IgG) au cours de cette étude. Son principe repose sur la sensibilisation des microplaques en polystyrène (phase solide) par des antigènes solubles extraits du parasite (par sonication et ultra-centrifugation), de manière à former un immunosorbent. Les anticorps, présents dans les sérums à tester, se fixent sur les antigènes et forment des complexes incolores, qui sont reconnus par des anti-anticorps de bovins (ou d'IgY) couplés à la peroxydase de Raifort (E.C.1.11.1.17). La révélation est faite à l'aide de deux substrats (peroxyde d'hydrogène / ABTS<sup>1</sup>) selon la réaction ci-dessous. La lecture des plaques est faite à l'oeil nu ou à l'aide d'un spectrophotomètre du type MCC/340 à 405 nm couplé à un ordinateur (Ferenc *et al.*, 1990). La figure 1 illustre le principe général de la méthode ELISA.



<sup>1</sup> 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]

<sup>2</sup> Radical libre du substrat ABTS

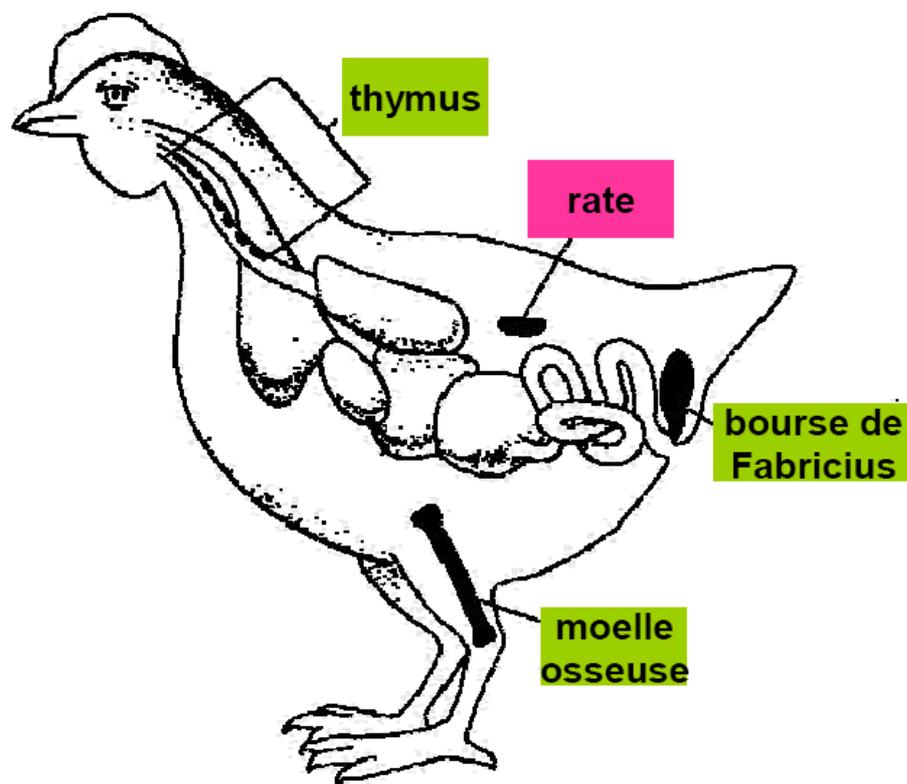


**Figure 1** : Principe général de la méthode ELISA

Cette technique immuno-enzymatique, ELISA-indirect n'est pas spécifique à une espèce car des réactions croisées envers les trypanosomes pathogènes (*T. vivax*, *T. congolense* et *T. brucei brucei*) (Desquesnes, 1997a et b) peuvent interférer avec les résultats. En revanche, elle est très sensible. La latence de la réponse immunitaire impose l'existence d'un délai de séroconversion dans les 2 semaines qui suivent l'infection. Mais la sensibilité est influencée par la persistance des anticorps après guérison ou après un traitement stérilisant (Desquesnes, 1997c), ce qui fausse souvent l'interprétation des résultats. Malgré toutes ces limites, la méthode ELISA-indirect reste le meilleur outil dans les enquêtes épidémiologiques, car facilement reproductible, peu coûteuse et très sensible.

## Chapitre II : Organisation fonctionnelle du système immunitaire des oiseaux

Les virus, les bactéries, les champignons et les parasites ayant pénétré dans l'organisme des vertébrés sont reconnus par le système immunitaire. La moelle osseuse hématopoïétique et le thymus en constituent les organes lymphoïdes primaires. Les ganglions lymphatiques et la rate sont quant à eux des organes lymphoïdes secondaires. Le système immunitaire des oiseaux se distingue de celui des mammifères par la présence d'une bourse de Fabricius (organe lymphoïde primaire où a lieu la maturation des lymphocytes B), qui est localisée dans la partie dorsale du cloaque, et par l'absence de ganglions lymphatiques anatomiquement individualisés (on retrouve seulement des nodules lymphatiques) (figure 2).



**Figure 2 :** (Bourgeon *et al*, 2006). Organes immunitaires des oiseaux : exemple chez le poulet.

La moelle osseuse, le thymus et la bourse de Fabricius constituent les organes lymphoïdes primaires (en vert). La rate (en rose) et les nodules lymphatiques (non représentés) représentent les organes lymphoïdes secondaires. Le système immunitaire des oiseaux se distingue ainsi de celui des mammifères par la présence de la bourse de Fabricius (lieu de maturation des lymphocytes B), localisée dans la partie dorsale du cloaque. Hormis ces particularités anatomiques, il est fort

semblable à celui des mammifères. Le système immunitaire met en jeu deux processus qui sont étroitement intriqués chez les vertébrés : l'immunité innée et l'immunité acquise (Roitt *et al.* 1998).

## **1. Immunité innée**

### **1.1. Cellules de la lignée myéloïde**

L'immunité innée ou non spécifique, d'action immédiate fait intervenir différents types de cellules issues de cellules souches myéloïdes. On distingue tout d'abord les macrophages dans les tissus ou monocytes dans le sang qui détruisent, digèrent et éliminent microbes et autres corps étrangers à l'organisme. De plus, les granulocytes se subdivisent comme chez les mammifères en trois groupes : les hétérophiles, les éosinophiles et les basophiles. Les hétérophiles, également appelés pseudo-éosinophiles, sont les équivalents des polynucléaires neutrophiles des mammifères. Ils manifestent une activité phagocytaire importante, surtout lors de la réaction inflammatoire. Les éosinophiles ont des fonctions encore mal connues chez les oiseaux (antiparasitaires chez les mammifères). Les basophiles jouent un rôle dans l'inflammation et l'hypersensibilité. Par ailleurs, les thrombocytes, cellules nucléées, en plus de leur rôle dans la coagulation sanguine (équivalent des plaquettes des mammifères), manifestent également une activité phagocytaire très importante. Les mastocytes, équivalents des basophiles dans les tissus, participent à la réponse immune antiparasitaire mais aussi à l'hypersensibilité. L'activité des cellules Natural Killer (NK) varie en fonction de l'âge chez les oiseaux : elle est faible pendant les premières semaines de la vie et augmente ensuite progressivement. Ces cellules sont surtout retrouvées dans la rate et ne sont ni phagocytaires, ni auto-adhérentes (rôle dans l'immunité antivirale et anti-tumorale chez les mammifères). Enfin, les cellules Killer (K ; dérivent des NK à la suite de leur activation par des cytokines) sont présentes dans la rate et la circulation périphérique. Leur cytotoxicité est médiée par les anticorps. Les cellules NK et K sont des cellules cytotoxiques (Roitt *et al.* 1998).

### **1.2. Système du complément**

Chez les oiseaux, le complément constitue un élément également essentiel de la défense anti-infectieuse agissant par cascade protéolytique. Comme chez les mammifères, le composant C3 joue un rôle immunologique important : il représente la molécule clé de l'activation du complément, ce qui permet entre autres d'opsoniser les bactéries, et facilite ainsi la fixation des cellules phagocytaires comme les macrophages à leur surface (Roitt *et al.* 1998).

## **2. Immunité acquise**

L'immunité acquise ou spécifique prend le relais de l'immunité innée lorsque celle-ci n'est pas suffisamment efficace. Elle se développe en quelques jours et dépend de la reconnaissance spécifique de la substance étrangère. En effet les lymphocytes, qui sont issus des cellules souches lymphoïdes, sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène grâce à leur récepteur membranaire et d'adapter la réponse en conséquence. Celle-ci peut être à médiation humorale, relayée par les lymphocytes B et la production d'anticorps, ou à médiation cellulaire, actionnée par les lymphocytes T cytotoxiques. De plus, cette immunité se caractérise par la mise en place d'une mémoire immunologique qui permet de protéger l'organisme contre les antigènes déjà rencontrés (Roitt *et al.* 1998).

### **2.1. Immunité à médiation humorale**

Les lymphocytes B, originaires de la bourse de Fabricius chez les oiseaux, sont les cellules de l'immunité humorale ; ils produisent les anticorps appartenant à la catégorie moléculaire des immunoglobulines (Ig). Ces glycoprotéines, constituées au moins de quatre chaînes polypeptidiques (deux chaînes lourdes et deux chaînes légères), qui sont assemblées de façon à former au moins deux sites de reconnaissance par molécule, servent au départ de récepteur d'antigène à la surface des cellules B. Selon leurs caractères physicochimiques, leur masse moléculaire, leur coefficient de sédimentation et leur structure chimique, on distingue chez les oiseaux trois classes d'immunoglobulines : les IgY, IgM et IgA. Bien que les IgY aviaires aient les mêmes propriétés fonctionnelles que les IgG des mammifères, elles sont à défaut souvent appelées IgG dont elles ne présentent pas la même structure.

### **2.2. Immunité à médiation cellulaire**

Dans la circulation sanguine, les cellules T représentent 60 à 70 % des lymphocytes. Les précurseurs des cellules T migrent de la moelle osseuse vers le thymus où ils prolifèrent et se différencient avant de gagner la périphérie. Leur différenciation conduit à la formation d'une population hétérogène de lymphocytes dotés de rôles variés. On distingue les lymphocytes T helper, et les T cytotoxiques. Les premiers sont chargés d'orienter la réponse spécifique vers un type plutôt humoral en stimulant les lymphocytes B, ou vers un type plutôt cellulaire en stimulant les cellules cytotoxiques (NK, macrophages, lymphocytes T cytotoxiques). Les seconds sont chargés de reconnaître et de détruire les cellules de l'organisme devenues dangereuses

(contaminées par un virus par exemple). Leur activité est déclenchée par l'interaction de l'antigène, présenté par des cellules de l'organisme, avec le récepteur qu'ils expriment à leur surface.

### **3. Messagers chimiques de l'immunité : les cytokines**

Les cytokines sont des composants glycoprotéiques solubles sécrétés principalement par les cellules immunitaires qui sont responsables d'une part de la production des cellules hématopoïétiques par l'organisme et d'autre part de la régulation de la réponse immunitaire.

Ces molécules jouent donc un rôle fondamental dans la communication des cellules du système immunitaire entre elles, mais aussi avec d'autres cellules comme celles du système endocrinien ou celles du système nerveux central. On distingue plusieurs groupes tels que les facteurs stimulants les colonies, les interleukines ou encore les chimiokines.

### **4. Complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**

L'organisation génétique des mammifères, des oiseaux et des amphibiens est en effet la même. Le CMH est une région du génome dont les gènes codent pour les molécules d'histocompatibilité qui ont pour fonction de présenter les antigènes aux lymphocytes T, lesquels doivent ensuite différencier les antigènes de l'organisme (soi) des antigènes étrangers (non-soi) pour éliminer ces derniers. Les gènes du CMH forment un groupe multigénique (supérieur à 30 gènes), multiallélique (1 à 200 allèles par gène) et d'expression codominante.

### **5. Transfert de l'immunité maternelle**

Bien que la compétence immunitaire commence à se développer vers la fin de la vie embryonnaire, les réponses immunitaires du poussin nouvellement éclos sont faibles ; et la majeure partie de son système de défense tout comme chez les mammifères nouvellement nés, se compose des anticorps maternels passivement acquis. Dans le cas du poussin, ceux-ci doivent être présents dans l'oeuf une fois pondue. Le transfert de l'immunité passive de la poule au poussin est bien connu et le mécanisme du transfert des anticorps de la circulation maternelle au jaune de l'oeuf a été passé en revue par Brambell (1970). Plus récemment, la présence d'immunoglobulines dans le blanc d'oeuf et dans l'embryon a été démontrée (Kramer & Cho, 1970 ; Rose *et al.*, 1974). L'immunoglobuline présente dans le jaune d'oeuf est l'IgG qui dérive de la circulation maternelle et qui est sélectivement transmis à travers l'épithélium folliculaire de l'ovaire pendant la croissance très rapide de l'oocyte. L'IgA et l'IgM ont été détectés dans le blanc d'oeuf et dans l'intestin de l'embryon à la fin de l'incubation. L'IgA et l'IgM maternelles présentes dans les sécrétions de

l'oviducte, semblent être acquis par l'oeuf lors de son passage sous l'oviducte où le blanc d'œuf est produit. Pendant l'incubation le blanc s'écoule du sac d'albumine dans l'amnios et se mélange avec le liquide amniotique qui est alors absorbé par l'embryon pour atteindre le conduit respiratoire puis l'intestin (Rose *et al.*, 1974). L'IgG est retrouvée seulement dans le sérum de l'embryon en croissance et du poussin nouvellement éclos, et passe probablement dans le jaune d'œuf par la vitelline et la circulation hépatique. Des anticorps d'une variété d'agents infectieux ont été détectés dans ces emplacements (Buxton, 1952; Kramer & Cho, 1970). Ainsi, chez les oiseaux comme chez les mammifères, il semble y avoir un mode de transmission particulier pour chacune des différentes classes d'immunoglobuline maternelle: le passage trans-ovarien d'IgG ressemble à la transmission trans-placentale et l'acquisition d'IgA et d'IgM par ingestion du liquide d'albumine/amniotique ressemble à la transmission par l'intermédiaire du lait.

Après avoir éclos, la demie vie de l'IgG chez le poussin est approximativement deux fois plus longue que chez la poule adulte, correspondant ainsi à une « épargne » d'IgG qui se produit chez la plupart des mammifères juste après la naissance (Patterson *et al.*, 1962).

## **6. Activité antigénique du jaune d'œuf et avantages**

L'activité antigénique du jaune d'œuf a été attribuée aux  $\gamma$ -livetines, également appelées IgY (Yolk Immunoglobulin) (Leslie et Clem, 1969). Les IgY sont synthétisées dans le sérum sanguin des poules puis transférées dans le jaune pour immuniser l'embryon. Les  $\gamma$ -livetines sont des glycoprotéines. Constituées de chaînes lourdes (60 à 70 kDa) et de chaînes légères (22 kDa), elles représentent environ 3% de la matière sèche du jaune (Akita et Nakai, 1992). Une poule pondant 290 oeufs par an produit environ 5 kg de jaune. Le taux d'IgY dans le jaune varie entre 9 mg/ml et 25 mg/ml (Rose *et al.*, 1974). Par conséquent, une poule peut produire environ 60 g d'IgY par an (Nakai *et al.*, 1994). La production d'IgY par les poules est ainsi potentiellement 30 fois plus importante que la production d'IgG par les lapins. C'est pourquoi le jaune d'œuf est aujourd'hui considéré comme une source potentielle importante d'anticorps. Par ailleurs, il est possible de diriger et d'amplifier la production de différents types d'IgY dans le jaune d'œuf en immunisant les poules à l'aide d'antigènes spécifiques : protéines, bactéries, virus, parasites, toxines (Hatta *et al.*, 1997). La production d'anticorps par les poules constitue de plus une alternative intéressante à la production d'anticorps par les mammifères en terme de bien-être animal (la collecte des oeufs se fait sans intervention directe sur l'animal) et en raison des techniques simples et rapides qui ont été décrites pour l'extraction et la purification des IgY (Meulenaer & Huygebaert, 2001, Tini *et al.*, 2002). De plus, contrairement aux IgG des mammifères, les IgY ne se fixent pas aux molécules

complément des mammifères (protéines A et G). Toutefois, une limite à leur utilisation pourrait provenir de leur moindre résistance thermique par rapport aux IgG, avec des températures maximum de 73.9°C et 77°C pour respectivement les IgY et les IgG. De nombreuses utilisations des IgY de poule ont été récemment testées et évaluées : chez l'homme contre la formation de la plaque dentaire (Hatta *et al.*, 1997) ou contre les diarrhées à rotavirus (Sarker *et al.*, 2001), pour la protection des truites contre *Yersinia rucckeri* (Lee *et al.*, 2000), ou pour la maîtrise des maladies respiratoires d'origine bactérienne chez le porc (Shin *et al.*, 2001). Des IgY de poule, spécifiques de certaines protéines ont également été produites dans un but de quantification d'organismes biologiques (moisissures) par des méthodes telles que la détection par ELISA (Vohringer et Sander, 2001).

Deuxième partie :  
ETUDE EXPERIMENTALE

# ***Chapitre I : MATERIELS ET METHODES***

## **1. Matériels**

### **1.1. Le matériel biologique**

#### **1.1.1. Sérum de bovins**

Du sérum de bovins hyperimmunisés au *Trypanosoma brucei brucei*, provenant du laboratoire du CIRDES, a été utilisé pour les différents essais de purification d'immunoglobuline G.

#### **1.1.2. Poules pondeuses**

Quatre (04) poules âgées de 27 semaines, ont servi d'animaux expérimentaux. Elles proviennent d'une ferme avicole de la ville de Bobo-Dioulasso (« DIALLO œufs »). Leur programme de prophylaxie depuis l'éclosion jusqu'à la ponte est connu (voir annexe 1).

#### **1.1.3. Œufs**

Les œufs pondus par les poules expérimentales, dès leur première immunisation, ont été collectés, marqués du numéro des poules et de la date de ponte, puis gardés en chambre froide (4° C).

## **2. Méthodologie**

### **2.1. Purification des IgG**

Les immunoglobulines G seront purifiées par la méthode de précipitation des protéines par les sels. Cette méthode est basée sur la propriété des protéines à précipiter en présence de certains sels (le sulfate d'ammonium), augmentant ainsi la force ionique du milieu. La méthodologie appliquée a été celle développée par Weir *et al.* en 1978 à partir du sérum. L'échantillon de sérum a été mis à précipiter avec un volume égal de PBS et placé sous agitation magnétique dans un récipient contenant de la glace pilée. Le volume requis de sulfate d'ammonium a été ajouté goutte par goutte, puis le tout est mis au frais pendant 10 minutes, ensuite centrifugé à 3000 rpm pendant 15-20 minutes. Le précipité a été repris avec un volume de sulfate d'ammonium à 40% de saturation. Ensuite, il a été centrifugé, puis le précipité nouvellement obtenu a été repris avec le quart du volume initial de PBS. Le produit de cette étape a enfin été dialysé contre 1 litre de PBS durant toute la nuit.

## **2.2. Immunisation des poules pondeuses**

La méthode adaptée par Sriram & Yogeewaran (1999) a été suivie avec une légère modification au niveau du procédé. L'immunisation primaire a consisté à injecter au jour zéro (0), 1 ml d'un échantillon de  $\gamma$ -globuline [contenant 1 mg de  $\gamma$ -globuline dans du tampon phosphate salin 0,15 M à pH 7,4 (PBS)] émulsionné dans 1 ml d'adjuvant complet de Freund (Difco, Détroit, MI). Les immunisations de rappel :

- ◆ Le premier rappel au 14<sup>ème</sup> jour, avec 0,5 ml de l'échantillon de  $\gamma$ -globuline et 0,5 ml de l'adjuvant incomplet de Freund ;
- ◆ Le deuxième rappel au 21<sup>ème</sup> jour, avec 0,5 ml de l'échantillon de  $\gamma$ -globuline et sans adjuvant.

## **2.3. Préparation de l'antisérum anti-IgG bovin**

### **2.3. 1. Extraction et purification des IgY**

Les anticorps ont été extraits des jaunes d'œuf, en utilisant la méthode de dilution à l'eau (Wallmann *et al.*, 1990). Brièvement, le jaune d'œuf a été séparé du blanc et a été dilué au 1/5 de son volume, avec de l'eau distillée. Le mélange est homogénéisé, refroidi à -20 °C pendant au moins 72 h, ramené à 4 °C puis centrifugé (à 2800×g pendant 20 minutes). Les protéines solubles dans l'eau et qui sont dans le surnageant ont alors été précipitées, en utilisant le sulfate d'ammonium, et par la suite purifiées par chromatographie d'affinité. Pour la colonne d'affinité, 5–10 mg d'antigène ont été couplés à 1–2 g de cyanogène Sepharose 4B bromure activé (Sigma). Un aliquote de la solution d'IgY brute a alors été mis à traverser la colonne pour faciliter l'agglutination des anticorps spécifiques à la colonne. Les complexes immuns ainsi obtenus ont été élués en utilisant du tampon glycine-HCl 0,1 M (pH 2.3–2.5). Le résultat de l'élué contient les anticorps spécifiques ; il est collecté puis neutralisé avec un tampon Tris de 1 M (pH 7.2). Par la suite, les anticorps purifiés sont dialysés (en utilisant une membrane de maillage 12–14 kDa) contre du PBS, à 4 °C pendant 24 heures. Le produit de la dialyse est centrifugé (à 2800g pendant 15 minutes) et le surnageant (solution contenant les anticorps purifiés), est stocké à -20 °C jusqu'à usage ultérieur.

## **2.4. Marquage de l'antisérum**

Il a été effectué selon la méthode de couplage de la peroxydase à l'aide du periodate de sodium. Le procédé est le suivant :

- ◆ Dissoudre 2 mg de peroxydase dans 0,5 ml de periodate de sodium 1 M ;

- ◆ Agiter 20 mn à la température du laboratoire ;
- ◆ Ajouter 30µl d'éthylène glycol 1 M pour bloquer l'action du periodate en excès et agiter 5 mn ;
- ◆ Filtrer sur une colonne de Sephadex G 25 fine (1×5 cm) équilibrée avec du tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M, pH 9,5 et récupérer la fraction brune (0,5-1 ml) ;
- ◆ Ajouter 8 mg d'anticorps à partir de solutions à 5 mg/ml préalablement dialysées contre NaCl 0,15 M ;
- ◆ Ajouter 0,1 ml du tampon carbonate-bicarbonate 1 M ;
- ◆ Après 2 heures à la température du laboratoire, ajouter 0,2 ml de borohydrure de sodium à 4 mg/ml ;
- ◆ Laisser 2 heures et dialyser contre du PBS ;
- ◆ Ajouter un volume égal de glycérol.

### **2.5. Ebauche de validation de l'antisérum**

Elle a été faite en réalisant une comparaison des taux d'antisérums commerciaux et ceux élaborés lors de nos essais. Les rapports nous ont permis de nous faire une idée sur le degré d'activité de nos échantillons par rapport au produit commercial. L'antisérum commercial a été considéré comme la référence. Les proportions obtenues ont servi à définir l'activité de nos échantillons.

Estimations : Antisérum commercial : 100 % d'activité.

### **3. Analyse des résultats**

Pour l'analyse statistique de nos résultats et la réalisation de nos graphiques, nous avons utilisé le logiciel Excel 2003. Le test de Student (avec Excel ;  $\alpha = 0,05$ ) a été utilisé pour comparer les valeurs des densités optiques lues, lors de l'appréciation de l'état d'immunisation des poules expérimentales. Les seuils sont les suivants :

- $p < 0,05$  : significatif ;
- $p > 0,05$  : non significatif ;
- $p < 0,01$  : très significatif ;
- $p < 0,001$  : très hautement significatif.

## Chapitre II : RESULTATS

### 1. Purification des immunoglobulines de classe G (IgG)

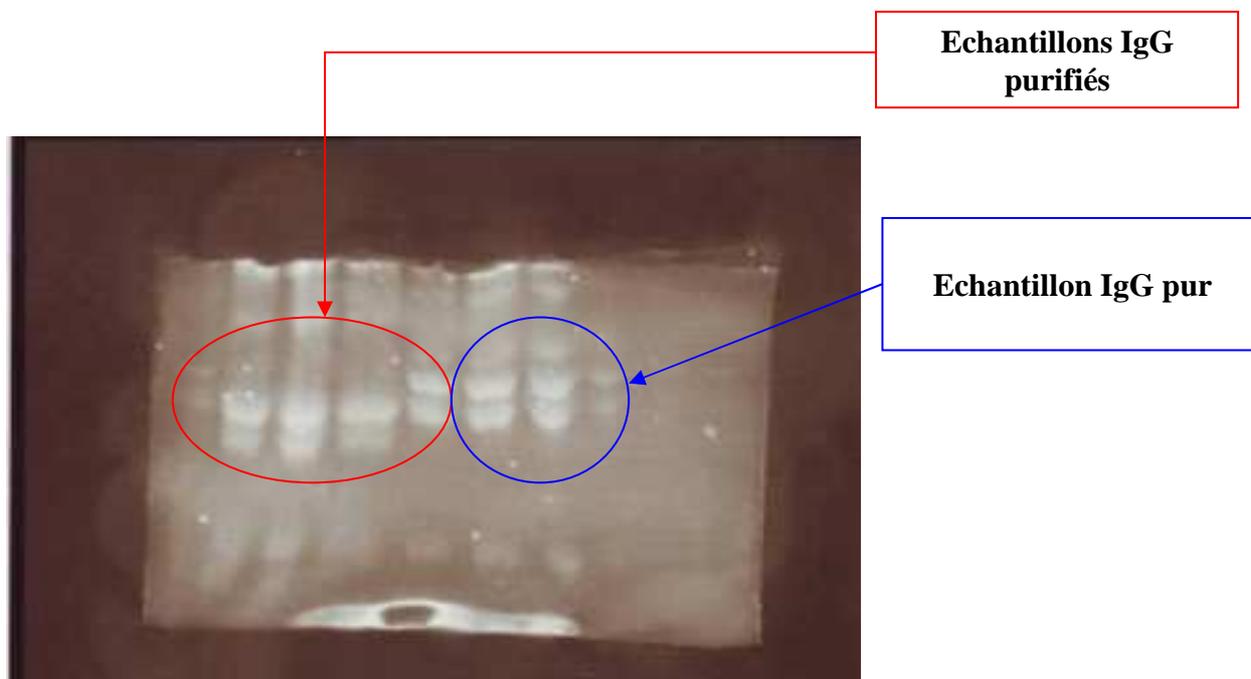
La purification des IgG à partir de sérums bovins hyperimmunisés a été réalisée selon la méthode développée par Weir *et al.* (1978). Cette méthode est basée sur la propriété des protéines à précipiter en présence de certains sels (le sulfate d'ammonium).

Les taux d'IgG bovins totaux ont été dosés à l'aide du kit BCA (bicinchoninic acid : voir protocole en annexe 2). Ces taux sont consignés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : Taux d'IgG bovins obtenus après précipitation au sulfate d'ammonium

<i>Echantillons</i>	<i>IgG bovin 1</i>	<i>IgG bovin 2</i>
<b>D.O</b>	0,48	0,86
<b>[taux] (mg/ml)</b>	8,16	14,44

La pureté des produits d'extraction a été testée en les faisant migrer par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (petit gel ; voir protocole en annexe 3). Le profil de migration ci-dessous est comparatif de l'échantillon d'IgG commercial à ceux obtenus lors de nos essais (figure 3).



**Figure 3** : profil comparatif électrophorétique d'IgG

## 2. Immunisation des poules pondeuses

Suite aux trois injections effectuées chez les poules expérimentales, l'immunisation positive a été observée en réalisant un test ELISA. Du sang a en effet été prélevé chez les poules pondeuses et les IgG ont été purifiées par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium. Les valeurs consignées dans le tableau 2 représentent les taux d'IgG dans le sérum des différentes poules.

**Tableau 2** : Récapitulatif des taux d'IgG dans le sérum des poules expérimentales 4 semaines après la dernière immunisation.

	<i>Poule 1</i>	<i>Poule 2</i>	<i>Poule 3</i>	<i>Poule 4</i>
<b>D.O</b>	0,097	0,1055	0,114	0,1185
<b>[IgG] (mg/ml)</b>	9,02	9,81	10,60	11,02

A la même période, les taux d'IgY ont été dosés à partir des œufs pondus par les poules expérimentales. L'analyse statistique par le test de Student (sur Excel) des différentes valeurs de D.O obtenues après lecture de la plaque ELISA, a donné les valeurs consignées dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Table comparative de la production d'IgY chez les poules expérimentales.

<i>[IgY]</i>	<i>P1 et P2</i>	<i>P1 et P3</i>	<i>P1 et P4</i>	<i>P2 et P3</i>	<i>P2 et P4</i>	<i>P3 et P4</i>
p	0,75	0,84	0,89	0,58	0,67	0,89
Comparaison	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Significativité :  $p < 0,05$  ; P : poule ; p : probabilité test de Student

Ces valeurs comparatives n'indiquent pas de différence majeure entre elles car les différentes probabilités obtenues à l'aide du test de Student sont toutes supérieures à 0,05.

## 3. Extraction et purification des IgY

Suite aux dix (10) semaines de suivi et d'évaluation du taux d'IgY dans les jaunes d'œufs, des pools d'antisérums ont été constitués. Les taux d'IgY dans les différents pools sont consignés dans le tableau 4.

**Tableau 4** : Récapitulatif des pools d'IgY obtenus après 10 semaines.

<i>Nombre de semaine après dernière immunisation</i>	<i>D.O obtenu par kit BCA</i>	<i>Taux IgY totaux (mg/ml)</i>
1	0,73	10,5±5,7
2	1,08	15,4±4,1
3	1,55	22,1±2,3
4	1,67	23,8±2,0
5	1,78	25,4±1,9
6	1,80	25,8±2,0
7	1,98	28,2±2,2
8	2,02	28,8±2,4
9	1,97	28,2±2,3
10	1,84	26,2±1,9

Les valeurs consignées dans ce tableau désignent les taux d'IgY obtenus par pool de production et par semaine. Une augmentation significative est remarquable quant à l'évolution de ces taux par rapport au temps, et ce jusqu'à la huitième semaine où, une légère baisse à partir de cette date est remarquable.

#### **4. Détermination de l'activité de l'antisérum**

Pour cette détermination, l'antisérum [IgY] produit par les poules et dirigé contre les IgG bovines ayant servi à les immuniser, a été purifié à partir des œufs. Il a ensuite été marqué au HPRO<sup>3</sup>. Pour vérifier l'activité de cet antisérum, des sérums positif et négatif ont été testés sur la même plaque ELISA (figure 7). Les densités optiques obtenues à la lecture sont consignées dans le tableau 5 (voir page suivante). Les puits colorés en vert représentent les réactions positives. Les densités optiques obtenues ont permis d'établir des rapports entre l'antisérum commercial et ceux élaborés lors de nos essais (voir tableau 6 : page suivante). Les taux d'activité sont respectivement de 47,33% pour le témoin positif et de 41,47% pour le témoin négatif.

<sup>3</sup> Horse Radish Per Oxydase

**Tableau 5** : Observation de l'activité des antisérums produits

	Antisérum commercial		Antisérum P1		Antisérum P2		Antisérum P3		Antisérum P4	
	TP	TN	TP	TN	TP	TN	TP	TN	TP	TN
<b>Témoins</b>										
<b>D.O essai 1</b>	0,95	0,07	0,43	0,02	0,42	0,03	0,46	0,02	0,50	0,02
<b>D.O essai 2</b>	0,95	0,05	0,42	0,02	0,42	0,02	0,46	0,03	0,50	0,02
<b>D.O moyen</b>	0,95	0,06	0,42	0,02	0,42	0,03	0,46	0,03	0,50	0,02

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; P : poule

**Tableau 6** : Rapport antisérums

<i>Rapport antisérums</i>	<i>D.O</i>	
	<i>témoin positif</i>	<i>témoin négatif</i>
<b>P1/Commercial</b>	0,4464286	0,3731343
<b>P2/Commercial</b>	0,4424779	0,4807692
<b>P3/Commercial</b>	0,4807692	0,4739336
<b>P4/Commercial</b>	0,5235602	0,3311258
<b>Rapport moyen</b>	0,473309	0,4147408

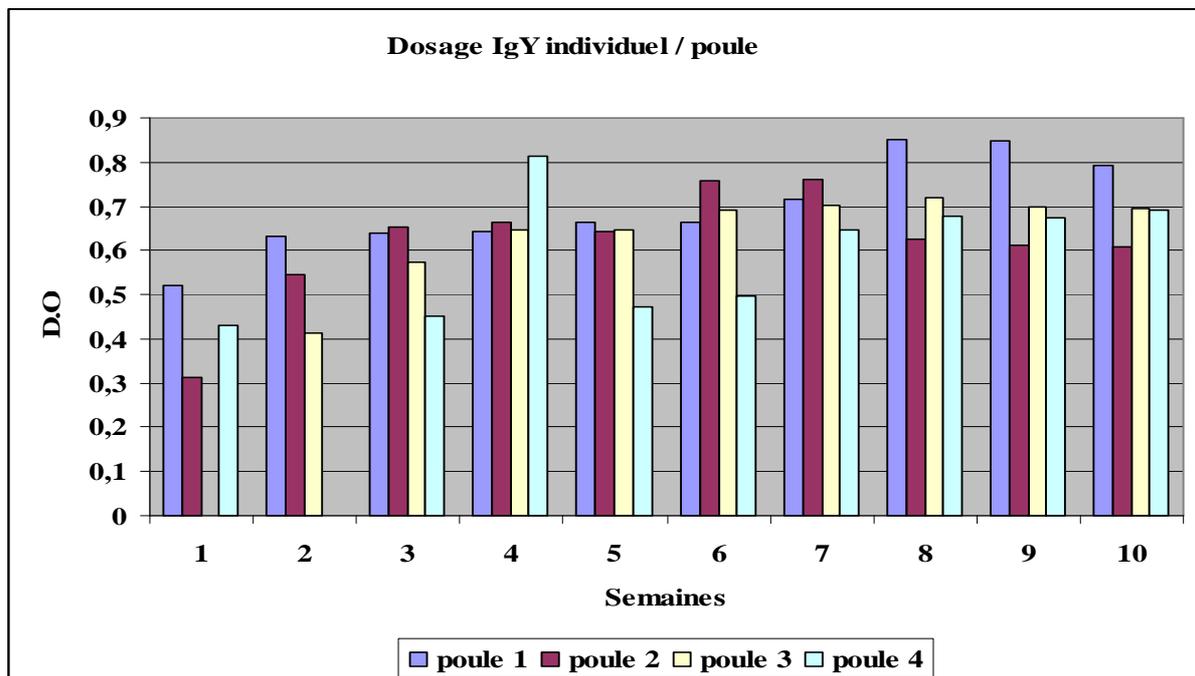
## 5. Préparation de l'antisérum anti-IgG bovin

Pour cette préparation d'antisérum anti-IgG bovin, les travaux ont été menés en deux (02) étapes.

### 5.1. Le suivi des IgY totaux

Cette première étape a consisté à suivre l'évolution des taux d'IgY dans les jaunes des œufs collectés à partir du trentième jour après la dernière immunisation. Pour le dosage, nous avons utilisé la méthode du kit BCA.

Les valeurs individuelles de D.O lues pour chaque poule expérimentale ont permis de faire le tracé de la figure 4.

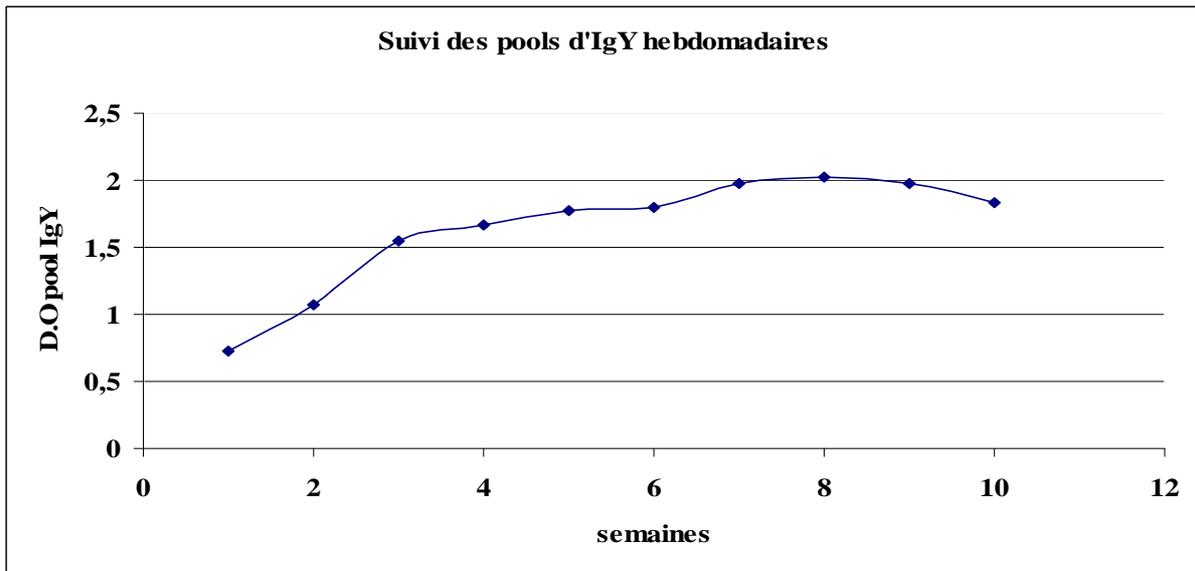


**Figure 4 :** Profil d'évaluation individuelle d'IgY chez les poules expérimentales.

Ce profil montre l'évolution de la production d'IgY chez les poules expérimentales individuellement prises. Il met également en évidence la variabilité du taux d'IgY produit par individu.

### 5.2. Extraction et purification des IgY

Des pools (regroupements d'échantillons) hebdomadaires d'antisérums ont été conçus de sorte à maximiser la production d'IgY. Pour la constitution de ces pools, les œufs collectés au cours d'une même semaine sont traités non seulement par poule, mais aussi par regroupement des produits des quatre poules. La constitution des pools d'IgY par regroupement des échantillons hebdomadaires a permis de faire le tracé de la figure 5.



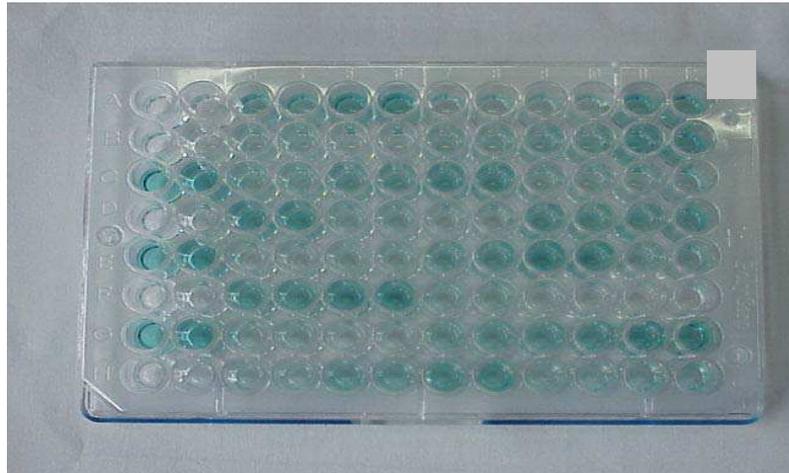
**Figure 5:** Profil d'évaluation des pools d'IgY chez les poules expérimentales

Ce profil met en évidence, l'évolution de l'effet de l'addition par rapport au temps. Il montre également une augmentation de la quantité d'IgY produit par pool de production. Un maximum est atteint à la huitième semaine, puis un début de décroissance est observable à partir de cette période.

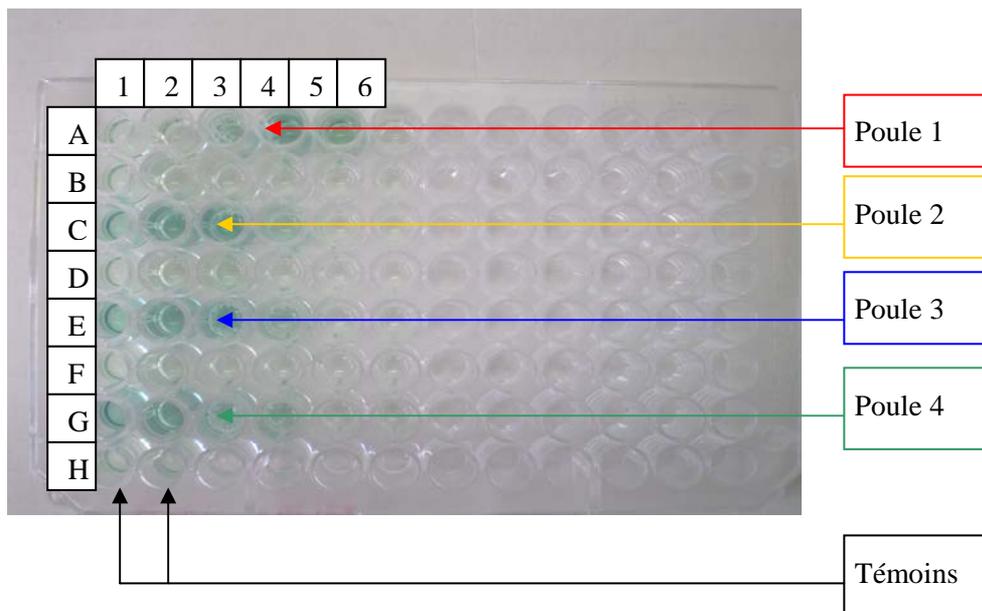
## 6. Marquage de l'antisérum

Les produits de marquage ont été utilisés lors des tests ELISA, réalisés pour déterminer l'immunisation positive et les tests de comparaison des antisérums (figure 6 et 7). Les puits colorés en vert sont caractéristiques de l'activité enzymatique de la peroxydase sur ses deux substrats (ABTS<sup>4</sup> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ces résultats colorimétriques impliquent un couplage réussi entre l'anticorps (IgG ou IgY) et l'enzyme (peroxydase).

<sup>4</sup> 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]



**Figure 6** : ELISA de détermination de l'immunisation positive



**Figure 7** : ELISA comparatif qualitatif de mise en évidence de l'activité de l'antisérum.

### *Chapitre III : DISCUSSION*

Le profil migratoire obtenu en comparant la migration des échantillons d'IgG bovins obtenus après le procédé de purification au sulfate d'ammonium, donne l'assurance quant à leur utilisation pour les étapes ultérieures de nos travaux expérimentaux. Cette méthode de purification ne donne pas un produit de pureté absolue totalement, mais elle est cependant suffisante pour les essais d'immunisation. En effet, Wamwiri et al., (2007) ont utilisé la même méthode et ont obtenu de bons résultats d'immunisation.

La coloration caractéristique de réaction positive observée à la révélation ELISA, en utilisant l'antisérum développé à partir du sang des poules expérimentales, permet de faire les remarques suivantes:

- l'antisérum (IgG de poule anti-IgG bovin) a révélé la présence d'IgG bovines;
- les poules ont produit des IgG dirigées contre les IgG bovines.

Wamwiri et al., (2007), ont utilisé cette méthode basée sur un test cross pour déterminer la spécificité et la sensibilité de l'antisérum produit lors de leur étude. Dans le cas précis de cette étude, il s'est agi de faire une mise en évidence qualitative de l'état d'immunisation des poules expérimentales. Ces résultats pourraient confirmer l'immunisation positive des poules expérimentales.

Les taux d'IgG purifiées à partir du sérum des poules à la quatrième semaine, diffèrent peu des taux d'IgY obtenus à partir des œufs à la même période. Des observations similaires ont été faites par Dean Goldring et al., (2003). En effet, les taux d'anticorps dans les œufs sont comparables à ceux trouvés dans le sang de poulet.

Durant cette étude expérimentale, les œufs ont été journalièrement collectés. Ces œufs ont été stockés à 4°C puis, ceux collectés à partir de la quatrième semaine ont fait l'objet de dosage afin de déterminer les taux d'IgY dans chacun d'eux. Ensuite, des pools hebdomadaires d'échantillons ont été constitués.

Individuellement, les taux d'IgY ont été estimés entre 4,49 mg/ml et 12,16 mg/ml. Soit une moyenne de 8,84 mg/ml. Ce taux moyen de la fraction de protéines hydrosolubles obtenue en utilisant la méthode de dilution à l'eau est pratiquement dans la même marge que celui rapporté par Lee et al. (2002). Cette valeur est tout de même légèrement inférieure à celle

indiquée par Rose et al. (1974) (9-25 mg/ml). Cependant, ce taux moyen est strictement inférieur à ceux rapportés par Akita et Nakai (1993) et Sriram et Yogeewaran (1999) (35-40 mg/ml).

Cette variation du taux d'IgY dans la fraction hydrosoluble pourrait être due au facteur de dilution, au pH des tampons utilisés, aux variations de la température d'incubation et au temps mis pour les différentes étapes de la purification. En effet, ces facteurs affecteraient le dépôt de lipides, influençant ainsi la récupération d'immunoglobulines dans la fraction de protéines solubles dans l'eau (Akita et Nakai, 1992). Les lipides et protéines sont en effet les composants majeurs du jaune d'œuf. Les triglycérides incluant la fraction lipidique, phospholipide et cholestérol constituent approximativement le tiers du jaune d'œuf et sont les principaux constituants solides du jaune d'œuf (Powrie, 1976).

Par ailleurs, l'âge des poules expérimentales (27 semaines) pourrait également influencer sur les taux de purification. En effet, une étude anonyme (ANONYMOUS, 1996) rapporte que la période de ponte et donc de production d'IgY se situe entre la 16<sup>ème</sup> et la 18<sup>ème</sup> semaine de vie des poules expérimentales.

De plus, le stress subi par les poules lors des différentes séances d'immunisation pourrait également avoir un impact sur la production d'immunoglobuline (Sriram et Yogeewaran, 1999).

La purification des IgY totaux à partir des œufs a suivi l'évolution des taux individuels. Les valeurs des taux individuels d'IgY obtenus ne montrent pas une différence significative entre elles, après comparaison (Student test :  $p > 0,05$  ; tableau 3). Cette homogénéité de taux d'IgY pourrait servir d'outil de confirmation de l'homogénéité de la population d'étude (poules expérimentales).

Les taux d'IgY obtenus (4,49 mg/ml à 12,16 mg/ml) sont similaires à ceux obtenus par Bizhanov (2004) ; il a en effet utilisé la même méthode comme l'une des variantes de ses différentes expérimentations. En outre, l'âge de ses poules était voisin aux nôtres. Ces valeurs sont cependant inférieures à celles rapportées par Malmarugan et al. (2005) (35-40 mg/ml) qui a travaillé dans les mêmes conditions. Par ailleurs, il a été rapporté que la race des poules n'influe pas sur la production d'IgY (Li et al, 1998), ni le type d'antigène (Sunwoo et al., 1996) ni enfin l'adjuvant utilisé lors de l'immunisation des poules expérimentales (Erhard et al., 1997). Cependant, les résultats diffèrent en terme de concentration totale d'IgY dans les jaunes d'œuf, conformément aux références indiquées (9-25 mg/ml) (Rose et al., 1974 ;

Shimizu et al., 1989 ; Sunwoo et al., 1996 ; Erhard et al., 1997 ; Li et al., 1998). Cette variation peut être attribuée aux adaptations des diverses méthodes utilisées lors de nos essais pour extraire l'IgY du jaune d'oeuf et pour mesurer la concentration.

Pour la suite des travaux, des pools d'IgY ont été constitués afin de maximiser les taux de production et de diminuer le nombre d'échantillons. Ces regroupements d'échantillons ont permis d'obtenir des taux d'IgY allant de 10,5 mg/ml à 26,2 mg/ml. Ces valeurs se rapprochent de celles rapportées par Rose et al. (1974) (9-25 mg/ml). La plupart des travaux abordés sur la purification d'immunoglobuline à partir des œufs [Bizhanov (2004), Lee et al. (2002), Akita & Nakai (1992) et Wang et al. (1986)...] ont procédé par un regroupement d'œufs atteignant parfois la douzaine. Au regard des résultats rapportés par Larsson et al. (1993), les IgY n'interfèrent pas entre elles, les produits du mélange d'échantillons n'auront donc pas d'effet sur les taux des pools constitués.

Les rapports (tableau 6) des taux d'antisérums, pourraient déjà à l'entame de la procédure de validation confirmer que l'antisérum élaboré a une capacité de reconnaissance des antigènes. En outre, les résultats de la figure 7, pourraient nous donner une idée sur la spécificité des échantillons. En effet, Wamwiri et al., (2007) ont utilisé cette méthode basée sur une réaction en retour pour à déterminer la spécificité et la sensibilité de l'antisérum produit lors de leur étude.

# CONCLUSION

Cette recherche rentre dans le cadre de la vulgarisation des tests ELISA pour le sérodiagnostic des Trypanosomoses Animales Africaines (TAA). Elle a permis de faire une prospection des techniques biochimiques réalisables au CIRDES et utilisables pour produire l'antisérum marqué utilisé pour des fins sérodiagnostics des TAA.

Au regard de l'importance que revêt le test ELISA pour le sérodiagnostic des TAA, sa vulgarisation constituerait un avantage, puisqu'elle contribuerait à améliorer les capacités de diagnostic de la maladie. Ceci constituerait une alternative intéressante pour sa meilleure connaissance afin de mieux maîtriser la maladie.

A la lumière de ces récents travaux, la maîtrise parfaite de la technique de production d'antisérum au sein du CIRDES constituerait une alternative permettant de revoir le coût du sérodiagnostic à la baisse. En effet, d'un point de vue général, l'utilisation des poules pondeuses pour la production de cet antisérum est abordable, du fait de la simplicité et du rendement de la méthode. Les différents résultats obtenus lors de cette étude ont montré une possibilité de réalisation de ce réactif (antisérum), dont le coût constitue un facteur limitant pour son utilisation en routine dans les sérodiagnostics. La présente démarche est opérationnelle et constitue une piste modifiable afin de réarranger et fixer un coût de comparaison à l'antisérum commercial.

Il est important de noter que la matière première nécessaire (IgY) pour les étapes ultérieures de cette démarche scientifique est disponible et en quantité suffisante. Toute fois, une attention particulière doit être apportée à la suite de ces travaux, notamment la validation l'antisérum. Ceci permettrait d'élaborer un protocole de base exploitable pour sa production. Nous espérons que l'opportunité nous sera offerte pour finaliser ces travaux, afin d'achever la validation de l'antisérum en vue de mettre au point un protocole définitif de production de ce réactif nécessaire pour le sérodiagnostic des Trypanosomoses Animales Africaines.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **AKITA, E. M., S. NAKAI (1992).** Isolation and purification of immunoglobulins from egg yolk. *J. Food. Sci.* 57, 629-634.
2. **AKITA, E. M., S. NAKAI (1993).** Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J. Immunol. Methods* 160, 207-214.
3. **AKPONA S.A., AHISSOU A., KORA I., AHYI L., TOURE M., NGOU E., LEBRETON Th., MOURAY M., RIBAS A., REGO P. DO (1994).** Exemple d'utilisation des Immunsérums à visée diagnostic préparés à Cotonou : une raison d'espérer. *J. Soc. Biol. Clin. - Bénin*, 1994, n°1: pp. 32-35
4. **ANONYMOUS (1996).** The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY In: The proceedings of the workshop on the production of avian antibodies, 22-24 March, Berlin, Germany.
5. **BENGALY Z., DESQUESNES M., SIDIBE I., SOME N., MILLOGO L., MEME M.:** adaptation and validation of an antibody-elisa using lyophilised soluble crude *Trypanosoma spp* antigens for epidemiological studies of transmitted trypanosomosis in cattle, In : 27ème Réunion du Conseil scientifique international pour la recherche et la lutte contre trypanosomoses (CSIRLT), Prétoria, Afrique du Sud, 29 septembre - 3 octobre 2003 / Union Africaine. - s.l. : s.n., 2003, p. 87-88
6. **BENGALY Z., KASBRI M., DESQUESNES M., SIDIBE I. (2001).** Validation of Polymerase Chain Reaction assay for monitoring the efficacy of Diminazene aceturate in trypanosome infected sheep. *Vet.Par.* 2012 (2001) 1-13.
7. **BIZHANOV G., JONAUSKIENE I. & HAU J. (2004).** A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. No. 3. 2004. Vol. 31.* pp121-130.
8. **BOURGEON, S., MARTÍNEZ, J., CRISCUOLO, F., LE MAHO, Y., RACLOT, T.** Fasting-induced changes of immunological and stress indicators in breeding female eiders. *General and Comparative Endocrinology*, 147 (3) : 336-342.
9. **BRAMBELL F. W. ROGERS (1970).** *Frontiers of Biology* 18, 20-41.
10. **BUXTON A. (1952).** *Journal of General Microbiology* 7, 268-286
11. **DEAN GOLDRING J. P. AND THERESA H. T. COETZER. (2003).** Laboratory Exercises: Isolation of Chicken Immunoglobulins (IgY) from Egg Yolk. *Biochemistry And Molecular Biology Education.* Vol. 31, No. 3, pp. 185–1870.
12. **DELAFOSSÉ A., BENGALY Z., DUVALLET G. (1996).** Utilisation du test ELISA de détection des antigènes circulants de trypanosomes dans le cadre d'un suivi épidémiologique dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop. (1).* 32-37.
13. **DESQUESNES M. & DAVILA A.M.R. (2002).** Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. *Vet. Parasitol.*, 109, 213–231.
14. **DESQUESNES M., (1997a).** Evaluation of the simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* in the serum of the cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA). *Acta Tropica* 65, 139-148.
15. **DESQUESNES M., (1997b).** Standardisation internationale et régionale des épreuves immunoenzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.* 16, 809-823.
16. **DESQUESNES M., (1997c).** Les trypanosomes du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. Thèse pour le doctorat de Parasitologie, Lille, 26 septembre 1997 ; 409 p.

17. **DESQUESNES M., DAVILA A.R.M. (2002).** Application of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Elsevier veterinary parasitology* 109 (2002) 213-231.
18. **DESQUESNES M., MICHEL J.F., DE-LA ROCQUE S., SOLANO P., MILLOGO L. BENGALY Z., SIDIBE I. (1999).** Enquête parasitologique et sérologique (ELISA-indirect) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.* 52 (3-4), 223-232.
19. **ENGVALL E. et PERLMANN P., (1971).** Enzyme linked immunosorbent assay: quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871.
20. **ERHARD, M.H., SCHMIDT, P., HOHAM, A., BERGMANN, J., MITTEMEIER, P., KAUHANN, P., WIESMULIER, K.H., BESSLER, W.G., AND LOSCH, U. 1997.** The lipopeptide, Pam<sub>3</sub>Cys- Ser-(Lys)<sub>4</sub>: An alternative adjuvant to Freund's adjuvant for the immunisation of chicken to produce egg yolk antibodies. *A 722.* 25: 173- 18 1.
21. **FERENC S.A., STOPINSKI V. et COURTNEY C.H., (1990).** The development of an enzymelinked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the eastern caribbean basin. *Int. j. Parasitol.* 20, 51-56.
22. **GAASTRA W. (1984)** Enzyme-linked Immuno-sorbent Assay in *Methods in Molecular Biology* (part 2) (JM Walker, éd) pp 349-355, Humana Press, Clifton (U.S.A.)
23. **HATTA H., OZEKI M., TSUDA K. (1997)** Egg yolk antibody IgY and its application, In: Yamamoto T., Juneja L., Hatta H., Kim M. (Eds.), CRC Press, Boca Raton (USA) pp. 151-178.
24. **ITARD J. (2000).** Trypanosomoses animales africaines. In : *Précis de Parasitologie vétérinaire tropicale.* CHARTIER C., ITARD J., MOREL P.C., TRONCY P.M. Eds. Universités francophones, AUPELF-UREF, EM inter , Editions TEC & Doc, Londres-Paris- New York,773p.
25. **KRAMER T. T. & CHO M. C. (1970).** *Immunology* 19, 157-167.
26. **LARSSON, A., BALOW, R., LINDAHL T.L., and FORSBERG P. (1993).** Chicken antibodies: Taking advantage of evolution-A review. *Poultry Sci-* 72: 1807- 18 2.
27. **LEE E. N., SUNWOO H. H., MENNINEN K., AND SIM J. S. (2002).** IMMUNOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY: In Vitro Studies of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science* 81:632–641.
28. **LEE S.B., MINE Y., STEVENSON R.M. (2000).** Effect of hen egg yolk immunoglobulin in passive protection of rainbow trout against *Yersinia ruckeri*. *J. Agric Food Chem*, 48: 110-115.
29. **LESLIE G.A., CLEM L.W. (1969)** Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulin of the chicken. *J. Exp. Med.*, 130: 1337-1945.
30. **LI, X., NAKANO, T., SUNWOO, H.H., PAEK, B.H., CHAE H. S., and SIM, J.S. (1998).** Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poultry Sci* 77:266-270.
31. **MEULENAER B., HUYGHEBAERT A., (2001).** Isolation and purification of chicken egg yolk immunoglobulins: a review. *Food Agric. Immunol.*, 13 (4): 275-288.
32. **NAKAI S., LI-CHAN E., LO K. V. (1994).** Separation of yolk immunoglobulin, In: *Egg Uses & Processing Technologies. New Developments.* Sim J.S., Nakai S. (Eds.), CAB International, Oxon (UK), pp. 94-105.
33. **PATTERSON R., YOUNGNER J. S., WEIGLE W. O. & DIXON F. J. (1962).** *Journal of General Physiology* 45, 501-513.
34. **POWRIE W.D. (1976).** Characteristics of edible fluids of animal on& eggs. In *Principles of food science. Part 1. Food chemistry.* eds. Fennema, O.R. and Marcel Dekker, Inc. New York.

35. **ROITT, I.M., BROSTOFF, J., MALE, D.K. (1998).** Immunology. London, Mosby.
36. **ROSE M.E., ORLANS E., BUTTRESS, N. (1974).** Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur. J. Immunol.* 4: 521-523.
37. **SARKER S.A., CASSWALL T.H, JUNEJA L.R, ENAMUL HOQ, IQBAL HOSSAIN, FUCHS G.J, HAMMARSTROM L. (2001).** Randomized placebo-controlled clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *J. Pediat. Gastroent.Nut.,* 32: 19-25.
38. **SHIN N., KIM J., CHOI I. AND YOO H. (2001).** Control of swine respiratory disease using egg yolk antibodies. *Kor. J. Vet Res.*41: 197-202.
39. **SOLANO P., CUNY G., DUVALLET G., CUISANCE D., RAVEL S., SIDIBE I., TOURE S.M. (1997).** Les techniques de génétique moléculaire au service de l'épidémiologie des trypanosomoses. Intérêt de l'étude du polymorphisme des microsatellites des glossines. *Rev. Elev. Med. vét. Pays Trop.* 50 (4): 297-301.
40. **SRIRAM, V., G. YOGESWARAN (1999).** Improved recovery of immunoglobulin fraction from egg yolk of chicken immunized with Asialo GM1. *Russian. J. Immunol.* 4, 132-140.
41. **SUNWOO, H.H., NAKANO. T., DIXON, W.T., and SIM, J. S. (1996).** Immune responses in chickens against lipopolysaccharide of *Escherichia coli* and *Saimorreiln typhimirizrm*. *PoicZtiy Sci.* 75343-345.
42. **TINI M., JEWELL U.R., CAMANISH G., CHILOV D., GASSMANN M. (2002).** Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. A* 131: 569-574.
43. **VOHRINGER C., SANDER E. (2001).** Comparison of antibodies in chicken egg yolk (IgY) and rabbit (IgG) for quantitative strain detection of *Colletotrichum falcatum* and *Fusarium subglutinans* with Elisa. *Zeitsch. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz,* 108: 39-48.
44. **VOLLER A., BARTLETT A. et BIDWELL D.E. (1976).** Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 98-106.
45. **WALLMANN, J., STAAK, C. & LUGE, E. (1990).** Einfache methode zur isolierung von immunoglobulin y (IgY) aus eiern immunisierter hu` hner. *Journal of Veterinary Medicine,* 37, 317-320.
46. **WAMWIRI F. N., NKWENGULILA G. and CLAUSEN P.H. (2007).** Hosts of *Glossina fuscipes fuscipes* and *G. pallidipes* in areas of western Kenya with endemic sleeping sickness, as determined using an egg-yolk (IgY) ELISA. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology,* Vol. 101, No. 3, 225-232.
47. **WEIR, D. M., HERZENBERG, L. A., BLACKWELL, C. C. & HERZENBERG, L. A. (1978).** Handbook of Experimental Immunology, 4th Edn. Oxford, U.K.: Blackwell Scientific.
48. **WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2004).** Trypanosomosis (tsetse-transmitted). *In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Section 2.3, Chapter 2.3.15.*

### *Sites web visités*

<http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/fr/paat/disease.html>  
<http://www.ird.fr/sais/cgi/Ar?unite=R177>

# ANNEXES

*Annexe 1 : Fiche de suivi des poules expérimentales depuis le centre d'élevage*

# MDA La Maison De l'Aviculture

06 B.P 9349 OUAGADOUGOU 06- Burkina Faso  
 Cellule technique de Ouagadougou: Tél. (226) 50 37 25 76 E-Mail : aviculture@fasonet.bf  
 Cellule technique de Bobo-Dioulasso: Tél. (226) 20 97 41 93 E-Mail : mda@fasonet.bf

## PROGRAMME DE PROPHYLAXIE ET DE CONDUITE DES PONDEUSES

AGE	MALADIE	MEDICAMENTS OU VACCINS	ADMINISTRATION
1 <sup>er</sup> jr 20-12	Anti stress	Eau sucrée/ antib stress	10- 15 l d'eau
7 à 10 jrs avant l'arrivée des poussins	Nettoyage , désinfection , vide sanitaire	Détergent, virkon	Lavage, thermonébulisation
3 jours 21/12 3/16	Vaccin new castle Bronchite infectieuse	Hitchner B1 IN/BI	eau de boisson dans 5-10 l d'eau de boisson
14 jours	vaccin Gumboro	Hipra gumboro GM/97 ou équivalent	Eau de boisson dans 15 l
21 jours	vaccin Newcastle et gumboro	souche La Sota et gumboro GM/97 ✓	eau de boisson dans 15 l d'eau
28 jours	Bronchite infectieuse	H120	cau de boisson
42 jours	New castle	Lasota	Eau de boisson 15 l d'eau
56 jours	vaccin variole	TAD variole	transfixion à l'aile
70 jours	New castle	Ita new	Sous forme injectable , 1 dose en IM
80 jours	Bronchite infectieuse	H120 ou équivalent	eau de boisson dans 15 l d'eau
105-108 jours	New castle	Lasota	Eau de boisson
130- 135 jours	vaccin Newcastle bronchite infectieuse	Ita-new /bronchite infectieuse	Injection 1 dose IM

**Recommandations : ZONE A FORTE PRESSION DU GUMBORO**

- tout acte vaccinal doit être précédé et suivi de deux jours d'anti- stress
- un époutage peut se faire à une semaine s'il y a picage suivi d'un débécquage à 30-35 Jr
- Déparasiter tous les 45 jours vos sujets en ponte, accompagner de 03 jrs de vitamines
- Peser régulièrement les poulettes, le poids en entrée en ponte est un gage de productivité
- **Toutes les 12 semaines le vaccin bivalent new castle /bronchite infectieuse.**

Ce programme est donné A TITRE INDICATIF aux élevages encadrés par la Maison de l'Aviculture. Il pourra être modifié en fonction de chaque ferme. Ce programme ne doit pas être utilisé sans l'avis et l'accord des techniciens de la Maison de l'Aviculture.

## Annexe 2: Protocole BCA

### A. Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Use Table 1 as a guide to prepare a set of protein standards. Dilute the contents of one Albumin Standard (BSA) ampule into several clean vials, preferably using the same diluent as the sample(s). Each 1 ml ampule of 2.0 mg/ml Albumin Standard is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range suggested in Table 1. There will be sufficient volume for three replications of each diluted standard.

**Table 1.** Preparation of Diluted Albumin (BSA) Standards

Dilution Scheme for Standard Test Tube Protocol and Microplate Procedure (Working Range = 20–2,000 µg/ml)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	0	300 µl of Stock	2,000 µg/ml
B	125 µl	375 µl of Stock	1,500 µg/ml
C	325 µl	325 µl of Stock	1,000 µg/ml
D	175 µl	175 µl of vial B dilution	750 µg/ml
E	325 µl	325 µl of vial C dilution	500 µg/ml
F	325 µl	325 µl of vial E dilution	250 µg/ml
G	325 µl	325 µl of vial F dilution	125 µg/ml
H	400 µl	100 µl of vial G dilution	25 µg/ml
I	400 µl	0	0 µg/ml = Blank
Dilution Scheme for Enhanced Test Tube Protocol (Working Range = 5–250 µg/ml)			
<u>Vial</u>	<u>Volume of Diluent</u>	<u>Volume and Source of BSA</u>	<u>Final BSA Concentration</u>
A	700 µl	100 µl of Stock	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl of vial A dilution	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl of vial B dilution	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl of vial C dilution	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl of vial D dilution	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml = Blank

### B. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

1. Use the following formula to determine the total volume of WR required:

$(\# \text{ standards} + \# \text{ unknowns}) \times (\# \text{ replicates}) \times (\text{volume of WR per sample}) = \text{total volume WR required}$   
 Example: for the standard test-tube procedure with 3 unknowns and 2 replicates of each sample:  $(9 \text{ standards} + 3 \text{ unknowns}) \times (2 \text{ replicates}) \times (2 \text{ ml}) = 48 \text{ ml WR required}$

**Note:** 2.0 ml of the WR is required for each sample in the test-tube procedure, while only 200 µl of WR reagent is required for each sample in the microplate procedure.

2. Prepare WR by mixing 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B (50:1, Reagent A:B). For the above example, combine 50 ml of Reagent A with 1 ml of Reagent B.

**Note:** When Reagent B is first added to Reagent A, turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear, green WR. Prepare sufficient volume of WR based on the number of samples to be assayed. The WR is stable for several days when stored in a closed container at room temperature (RT).

### **Microplate Procedure (Sample to WR ratio = 1:8)**

1. Pipette 25  $\mu$ l of each standard or unknown sample replicate into a microplate well (working range = 20-2,000  $\mu$ g/ml).

**Note:** If sample size is limited, 10  $\mu$ l of each unknown sample and standard can be used (sample to WR ratio = 1:20). However, the working range of the assay in this case will be limited to 125-2,000  $\mu$ g/ml.

2. Add 200  $\mu$ l of the WR to each well and mix plate thoroughly on a plate shaker for 30 seconds.

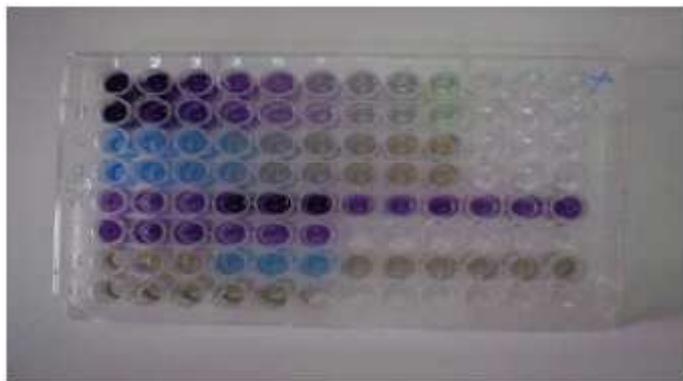
3. Cover plate and incubate at 37°C for 30 minutes.

4. Cool plate to RT.

5. Measure the absorbance at or near 562 nm on a plate reader.

#### **Notes:**

- Wavelengths from 540-590 nm have been used successfully with this method.
- Because plate readers use a shorter light path length than cuvette spectrophotometers, the Microplate Procedure requires a greater sample to WR ratio to obtain the same sensitivity as the standard Test Tube Procedure. If higher 562 nm measurements are desired, increase the incubation time to 2 hours.



**Figure 8 :** Kit BCA de dosage des immunoglobulines

### ***Annexe 3 : Protocole électrophorèse***

#### **a) gel de séparation**

##### ***pourcentage gel (12,5%)***

Melange acry-bis30% 4,375ml  
Tris HCl 1,5M (pH8,8) 2,625ml  
H2O 3,325ml  
SDS10% 105µl  
APS 10% (100mg/ml) 200µl  
Temed 20µl

#### **b) gel de concentration (4%)**

Melange acry-bis30% 336 µl  
Tris HCl 1,5M(pH6,8) 250 µl  
H2O 1,38ml  
SDS10% 20µl  
APS 10% 60µl  
Temed 8µl

#### **c) tampon échantillon**

**-tampon de charge 2X:** dissoudre 0,65g de Tris dans 40ml d'eau distillée et ajuster à pH 6,8. Ajouter 2g de SDS, 9,34 ml de glycérol et quelques gouttes de bleu de bromophénol. Compléter à 50ml. Sortir du frigo à l'avance. Au moment de l'emploi, ajouter du mercaptoéthanol : 500 µl de tampon 2X + 44 µl de mercaptoéthanol. Ensuite mélanger 1 volume de tampon échantillon (tampon charge 2X + mercaptoéthanol.) + 2 volume d'antigène. Puis chauffage à 100°C pendant 5 mns.

**- préparation des marqueurs :** 1 flacon de marqueur + 100 µl d'eau distillée (non chauffé et conservé à 4°C)

**- dépôts :** 20 µl/puits pour les échantillons et 10 µl pour les marqueur de poids.

#### **d) tampon d'électrophorèse**

La cuve et le gel sont montés, la cuve est remplie avec le tampon d'électrophorèse

#### **Composition**

glycine 14,41g  
tris-base 3,03g  
SDS à 10% 10ml  
H2O 1l

**Migration :** 100V à 1h 15mns