

Sérologie de l'Haemonchose chez la chèvre : préparation des antigènes parasitaires et dosage des anticorps IgA par la technique ELISA.

Dalila Feuillet¹, Yoann Félicité¹, Jean-Christophe Bambou¹

Résumé. Un des problèmes majeurs de l'élevage au pâturage des petits ruminants est le parasitisme par les nématodes gastro-intestinaux (NGI). L'espèce prévalente, en zone tropicale, est *Haemonchus contortus*. Pour lutter contre cette parasitose plusieurs stratégies sont étudiées dont la sélection d'animaux génétiquement résistants. Il a été démontré que la résistance génétique était liée à la réponse immunitaire, mais les mécanismes sont mal connus. Afin d'étudier ces derniers, dans le cadre des travaux de recherche conduits à l'Unité de Recherches Zootechniques (URZ), nous réalisons des dosages d'anticorps sériques dirigés contre les antigènes de *H. contortus* par la technique ELISA indirecte (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Cette technique repose sur une réaction immuno-enzymatique, possible s'il y a formation du complexe antigène-anticorps. Pour la réaliser il est nécessaire de disposer des antigènes pour détecter les anticorps spécifiques étudiés.

Ce dosage, développé depuis 2008 au sein du laboratoire de l'URZ, est désormais utilisé en routine dans les travaux de caractérisation du déterminisme génétique de la résistance aux NGI.

Mots clés : *Haemonchus contortus*, sérologie, antigène, anticorps, ELISA.

Abstract. Gastro-intestinal nematodes (GIN) are responsible for major losses in grazing ruminants. Under tropical area, *Haemonchus contortus* is the major threat. To control this parasite, several strategies have been proposed including the breeding of more resistant animals. Host genetic resistance has been linked to the immune response but mechanisms remain poorly characterized. In the scope of research works supervised in the URZ laboratory (Unité de Recherches Zootechniques), we implement indirect ELISA technique (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) to titer circulating anti-*H. contortus* antibodies. This technique involves an immuno-enzymatic reaction when possible if a complex antigen-antibody is created. To make it, it is necessary to have antigens to detect studied antibodies.

This dosing, developed in 2008 at the URZ laboratory, is now commonly used in the characterization work of genetic determinism of the resistance to GINs.

Keywords : *Haemonchus contortus*, serology, antigen, antibody, ELISA

Introduction

Dans de nombreuses régions du monde, un des problèmes majeurs de l'élevage à l'herbe des petits ruminants est le parasitisme lié aux nématodes gastro-intestinaux (NGI) dont une dizaine d'espèces est fréquemment rencontrée. En zone tropicale humide et chez les caprins, en particulier, trois espèces sont présentes *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum columbianum* et une majoritaire *H. contortus*. Pour l'éleveur, l'infestation des animaux est source de pertes économiques importantes en termes de productivité et de coût médicamenteux (Waller and Chandrawathani, 2005). De surcroît, les traitements anthelminthiques utilisés comme seule méthode de contrôle durant des années ont conduit à des problèmes d'écotoxicité (Lumaret *et al.*, 2012, Prchal *et al.*, 2016) et à la sélection de souches parasitaires résistantes (Barré *et al.*, 1997, Mahieu *et al.*, 2014, Arece-Garcia *et al.*, 2017).

Parmi les perspectives de contrôle envisagées, les plus prometteuses s'orientent vers la vaccination et la sélection d'animaux résistants (Bishop and Morris, 2007). En effet de nombreux travaux montrent que la

¹ URZ, Domaine Duclos Prise d'Eau 97170 PETIT-BOURG ; dalila.feUILLET@inrae.fr, yoann.felicite@inrae.fr, jean-christophe.bambou@inrae.fr

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

résistance aux infestations par les NGI est un caractère héritable étroitement lié à la réponse immunitaire (Moreno-Romieux *et al.*, 2017).

A l'Unité de Recherches Zootechniques (URZ), l'approche développée pour lutter contre cette parasitose repose sur la gestion intégrée du parasitisme selon trois axes : réduire les traitements anthelminthiques en utilisant des traitements sélectifs, améliorer les défenses de l'animal et limiter la rencontre avec le parasite. Nos travaux en génétique de l'adaptation aux NGI chez les petits ruminants, s'orientent, depuis 2008, vers la compréhension des mécanismes physiologiques sous-jacents. Parmi ces mécanismes, ceux d'ordre immunologique sont notamment étudiés par le biais des numérations de la formule sanguine et des sérologies des immunoglobulines (Ig) G, A et E anti-*H. contortus* (Bambou *et al.*, 2008). Ces dernières sont réalisées par la technique ELISA indirecte pour laquelle il est nécessaire de disposer des antigènes parasitaires.

Dans notre étude, nous nous intéressons aux antigènes de larves L3 qui correspondent aux premiers antigènes rencontrés par le système immunitaire de l'animal et aux produits d'excrétion-sécrétion de vers adultes (PES), qui sont les différentes protéines produites par le ver adulte pour assurer sa nutrition et sa reproduction. Nous avons choisi de mesurer les anticorps IgA car ces molécules sont impliquées dans la fonction immunitaire des muqueuses et, par ailleurs il a été montré chez les ovins qu'une meilleure résistance des animaux était associée à des hauts niveaux d'IgA anti-parasites (Aboshady *et al.* 2020).

Il était nécessaire de développer ce dosage au sein du laboratoire parce qu'il n'existe pas de kit dans le commerce pour mesurer la réponse en IgA sériques anti-L3 et anti-PES de *H. contortus* chez les petits ruminants. Cet article présente la détermination sérologique des IgA par la technique ELISA avec la description de la préparation des antigènes (Ag) somatiques de larves L3 et les produits d'excrétion sécrétion (PES) des vers adultes de *H. contortus*.

Cycle de développement biologique de *H. contortus*

H. contortus est un parasite monoxène (le cycle évolutif s'accomplit chez un seul hôte) dont le cycle de vie se déroule en une succession de deux phases : une phase au pâturage (phase libre) et une phase interne ou endogène à l'animal (la phase parasitaire).

Il comprend quatre stades larvaires de L1 à L4 et un stade ver adulte (immature puis mature). C'est au pâturage que les animaux s'infestent en ingérant des larves L3. Ces dernières progressent dans le tractus digestif, passent le rumen et arrivent dans la caillette où elles pénètrent la muqueuse digestive et muent en larves L4. À partir de ce stade, elles sont hématophages. Elles évoluent en préadultes qui, après maturation sexuelle, deviennent des vers adultes mâles et femelles qui s'accouplent et se reproduisent en émettant des œufs (1295.9 ± 280.4 /femelle/jour, Saccareau *et al.* 2017). Ces derniers sont excrétés via les fèces environ trois semaines après l'ingestion des larves L3. À l'extérieur, les œufs éclosent en 24 h en larves rhabditiformes L1 qui muent en larves L2 se nourrissant de matières organiques et de microorganismes fécaux. Après 4 à 5 jours, elles muent en larves strongyloformes L3 engainées. À ce stade, elles ne se nourrissent plus mais quittent les fèces pour se disperser dans la strate herbacée du pâturage où elles pourront être ingérées avec l'herbe par un hôte potentiel (Mahieu, 2014).

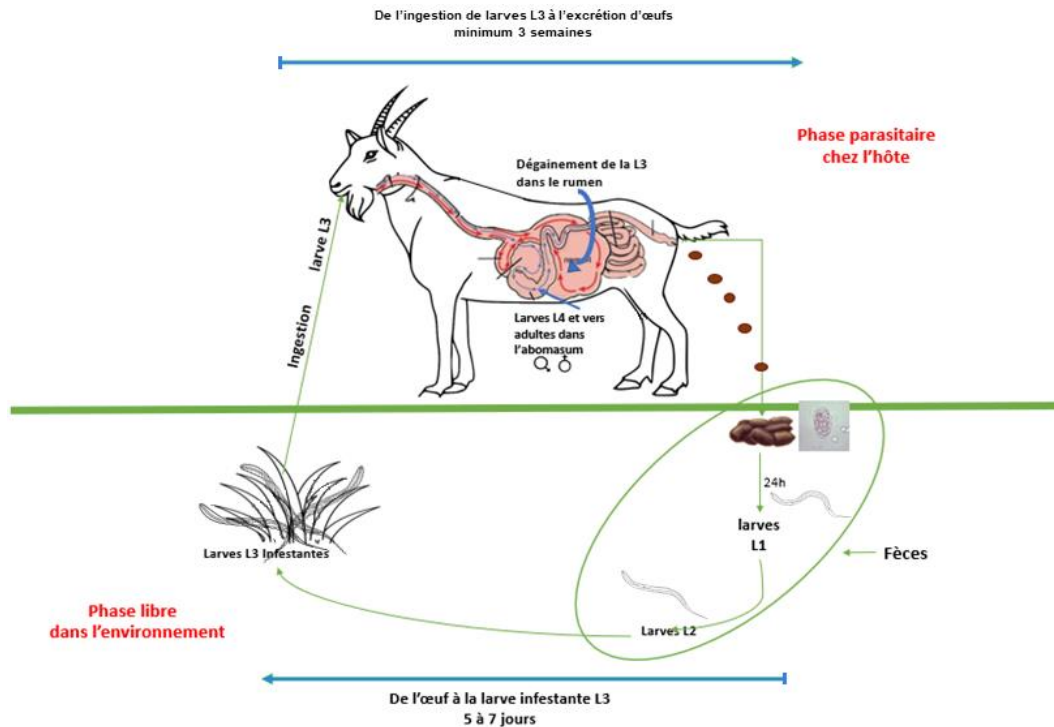


Figure 1. Cycle biologique de *Haemonchus contortus*

Préparation des antigènes (Ag) des différents stades de *H. contortus*

Qu'est-ce qu'un antigène ?

Sur un plan fonctionnel, un antigène est une molécule capable d'induire une réponse immunitaire dont les effecteurs peuvent être des anticorps qui ont une forte affinité pour l'antigène. Sur un plan structural, ce sont généralement des molécules de grandes tailles (>100 000 Da), de nature très diverses. Il peut s'agir de protéines, d'acides nucléiques, de polysaccharides ou de dérivés lipidiques. Chez les parasites, chaque stade larvaire peut induire une réaction immunitaire dans l'organisme hôte. On distingue les antigènes somatiques, constitués par un élément du corps parasite, et les exoantigènes sécrétés ou excrétés par le parasite.

Obtention de larves L3 de *H. contortus*

La préparation des Ag débute lorsque suffisamment de larves L3 sont disponibles (≈ 500000 L3) pour parvenir à une production permettant de traiter l'ensemble des échantillons d'un même protocole. La première étape de cette procédure consiste à réaliser des coprocultures de fèces d'animaux infestés pour obtenir ces larves.



Photo 1. Larve L3 *H. contortus* (©INRAE / M.Mahieu)

Coproculture

Depuis 1999, au sein du laboratoire de l'URZ, des souches de larves de *H. contortus* ont été isolées à partir de prélèvements de fèces provenant d'animaux élevés en différents lieux de la Guadeloupe. Ces souches sont renouvelées et conservées de façon à toujours disposer de larves pour les expérimentations. Le renouvellement est réalisé par des infestations artificielles d'animaux indemnes de tout parasite. En pratique, cela consiste à administrer oralement une dose de 10000 L3 à un chevreau de race Créole, âgé de 7 à 10 mois. Puis, à partir 21 jours post infestation, correspondant à la période pré-patente du parasite *H. contortus*, des fèces sont récoltées et des coproscopies (Aumont *et al.*, 1997) sont réalisées pour s'assurer que l'excrétion des œufs dans les fèces de l'animal a commencé. Dès lors que les œufs sont présents en quantité importante (≥ 1000 œufs par gramme de fèces), un sac est posé sur l'animal pour récolter la totalité des fèces (Giorgi *et al.*, 2019) qui sont mises en coproculture pour permettre le développement des œufs en larves L3. Ces dernières sont ensuite récupérées selon le procédé de Baermann (Baermann, 1917 ; Figure 2), puis elles sont examinées au microscope pour confirmer l'espèce *H. contortus* et pour être dénombrées. En fonction de la quantité de larves souhaitées, le dispositif de chaque étape est dupliqué.

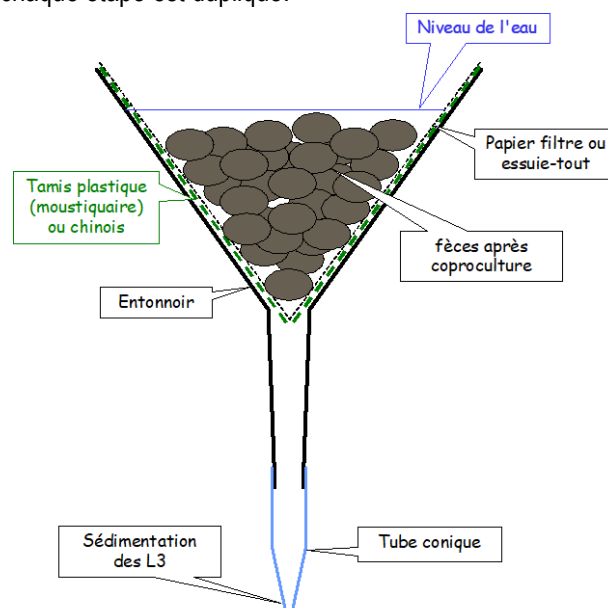


Figure 2. Schéma de l'appareil de Baermann pour l'extraction des larves L3 de *H. contortus*

Préparation des antigènes de larves L3

Les larves obtenues précédemment sont introduites, dans un tube Falcon® stérile de 50 mL et sont centrifugées à 2 500 g, pendant 10 min, à 20°C. Après centrifugation, le surnageant est aspiré délicatement jusqu'à ne plus laisser que 1 cm de liquide au-dessus du culot. Puis les larves sont lavées avec 5 mL de tampon PBS pH7.4 stérile et centrifugées de nouveau. L'opération est renouvelée deux fois.

À l'aide d'une pipette automatique et d'un cône stérile à orifice large de 1 mL les larves sont transférées dans un porte-échantillon et le tout est placé au congélateur à -80°C pendant 1 h. Le porte-échantillon est un tube adapté au broyeur cryogénique SPEX Freezer Mill 6775. Cet équipement permet de broyer les larves tout en préservant les antigènes de toute dégradation, car l'opération est effectuée dans l'azote liquide. À la sortie du congélateur à -80°C, un impacteur en inox est introduit dans le porte-échantillon, puis ce dernier est installé dans la loge du broyeur. Le programme de broyage appliqué est le suivant : démarrage du broyage aussitôt le couvercle du Freezer Mill refermé, temps de broyage de 1min30, temps de refroidissement entre deux cycles 2 minutes, deux cycles et taux d'impact 15 coups par seconde. Ainsi, l'impacteur dans le porte-échantillon, sous l'impulsion d'un champ magnétique, subit des allers retours rapides. Les chocs répétés provoquent la pulvérisation de l'échantillon. Lorsque le programme est terminé, l'échantillon obtenu est sous forme de poudre blanchâtre. Celle-

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

ci est récupérée dans un tube Falcon® stérile de 50 mL placé dans la glace pilée, puis l'impacteur ainsi que le porte-échantillon sont rincés avec 4 mL de tampon PBS pH7.4 stérile. Le tout est homogénéisé et redistribué dans des cupules de 2 mL qui sont centrifugées à 21460 g pendant 45 min à 4°C. Les surnageants sont récupérés, filtrés à l'aide d'un filtre 0.2 µm à faible adsorption protéique (Millipore Millex Durapore PVDF) puis placés à +4°C en attendant de déterminer la teneur en protéines, réalisée le jour même.

Préparation des antigènes des produits d'excrétion sécrétion (PES) des vers adultes de *H. contortus*

Récupération des *H. contortus* adultes

La récupération des *H. contortus* adultes est effectuée sur un animal infesté artificiellement comme décrit précédemment. Un mois post-infestation, lorsque l'examen coproscopique confirme la présence d'œufs du parasite, l'animal est euthanasié. Rapidement après l'abattage, la caillette est prélevée et le contenu récupéré. Puis, elle est ouverte dans sa longueur et les villosités sont raclées délicatement à l'aide d'une spatule pour récupérer les vers libres et en amas aisément distinguables à l'œil nu. Les vers sont de couleur brun-rosé du fait qu'ils sont hématophages, et mesurent entre 15 à 20 mm de longueur et entre 0,4 à 0,6 mm de largeur en moyenne (photo 2).

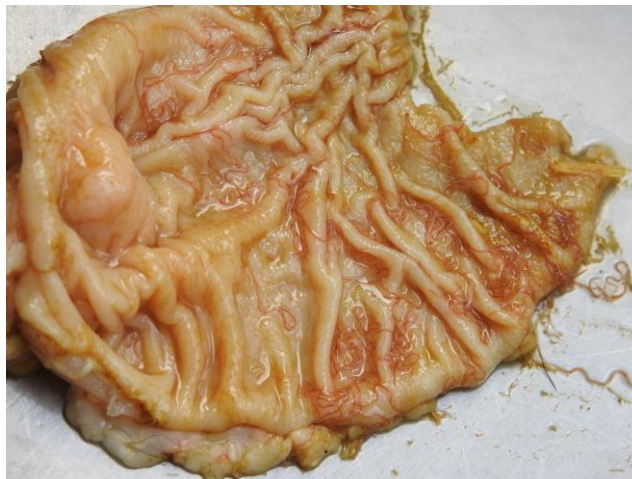


Photo 2. Caillette infestée par *H. contortus* (©INRAE / M.Moutoussamy)

Puis les vers sont lavés, dans trois bains successifs de tampon PBS pH 7.4 stérile et préchauffé à 38°C. Ils sont ensuite répartis dans plusieurs tubes Falcon® de 50 mL contenant 30 mL de tampon stérile PBS pH 7.4, et sont placés à l'étuve à 38°C avec 5 % de CO₂, en attendant d'être dénombrés et sexés. Chaque tube est traité et sorti de l'étuve, au fur et à mesure, pour maintenir les vers vivants. Le contenu du tube est versé dans une boîte de Pétri et sous la loupe binoculaire à l'aide d'un crochet, seuls les vers vivants sont retenus et triés en fonction du sexe.

La distinction entre vers mâle et femelle est aisée. La femelle est plus longue que le mâle, et possède deux cordons génitaux blancs, spiralés, s'enroulant autour du tube digestif rougeâtre (rempli de sang) ; la vulve se situe au quart de la longueur du corps en avant de l'extrémité caudale et est en général surmontée d'une languette supra-vulvaire. Le mâle est plus petit que la femelle ; sa bourse copulatrice est formée de deux grands lobes latéraux et d'un petit lobe dorsal asymétrique bardé de deux spicules (0,5 mm) et il est soutenu par une côte en Y (photo 3).

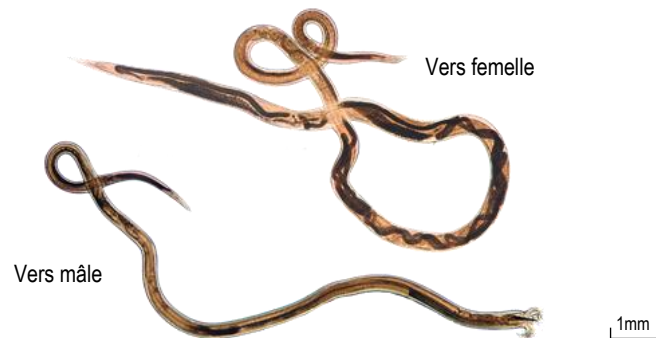


Photo 3. *H. contortus* adultes (©INRAE / M.Mahieu)

Dans une plaque de culture cellulaire de 24 puits, le tri consiste à déposer 25 vers mâles et 25 vers femelles par puits dans 0,5 mL de tampon PBS pH 7.4 stérile et 1 % de solution antibiotique (pénicilline 10000UI/mL, streptomycine 10000 µg/mL # CABPES Eurobio). Une fois l'ensemble des vers triés, la plaque est recouverte d'un couvercle et placée à l'étuve à 38°C, en présence de CO₂ à 5 % et en atmosphère saturée en humidité (eau stérile déposée dans un récipient dans le bas de l'étuve) pour la nuit, entre 12 et 16 h.

Le lendemain matin, à la sortie de l'étuve, les vers sont retrouvés disposés en forme d'étoile. La mobilité est vérifiée pour s'assurer qu'ils sont vivants. Si tel n'est pas le cas, la préparation n'est pas exploitable et tout est stoppé. Autrement, les phases liquides de chaque puits sont prélevées puis filtrées à l'aide d'un filtre 0.2 µm à faible adsorption protéique (Millipore Millex Durapore PVDF) et sont rassemblées dans un tube stérile. Ce tube est aussitôt placé à +4°C en attendant de déterminer la teneur en protéines, réalisée le jour même.

Dosages des protéines et conservation des antigènes de larves L3 et de PES de *H. contortus*

La teneur en protéines des antigènes préparés est déterminée à l'aide du Kit Bicinchoninic acid protein assay micro Applied, référencé A7845 chez Applichem. Une fois la teneur en protéines connue, les antigènes sont conditionnés prêts à l'emploi pour les futurs dosages ELISA. Ils sont distribués dans des microtubes de 0.5 mL stériles en quantité suffisante pour traiter deux plaques ELISA de 96 puits. Pour une conservation optimale, ils sont stockés à -80°C. La règle d'usage, au laboratoire de l'URZ, est de limiter à deux fois le cycle de décongélation/congélation de chaque aliquote.

Dosage des immunoglobulines A sériques de chèvre spécifiques des antigènes de larves L3 et des PES de *H. contortus* par la technique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indirecte.

Le principe

La technique ELISA, utilisée ici pour le dosage des IgA sériques de chèvre, est basée sur un principe de détection immuno-enzymatique indirecte. Dans cette application, la méthode est quantitative relative, car elle permet de comparer les niveaux des IgA sériques entre les échantillons.

La technique consiste à fixer un antigène d'intérêt (ici ceux préparés précédemment : les antigènes de L3 ou les PES de vers adultes) sur un support solide, puis à incuber les sérums avec ces antigènes. À la fin de l'incubation, des lavages sont effectués pour éliminer toutes les protéines non fixées. Un anti-corps anti-isotype IgA de chèvre, marqué avec une enzyme conjuguée, est ensuite ajouté. Un nouveau lavage est effectué à la fin de l'incubation. La fixation de l'anticorps est révélée par ajout d'un substrat qui donne une réaction colorée. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration d'anticorps contenus dans le sérum et déterminée par lecture au spectrophotomètre.

Principe pour la détection des IgG et des IgA de chèvre

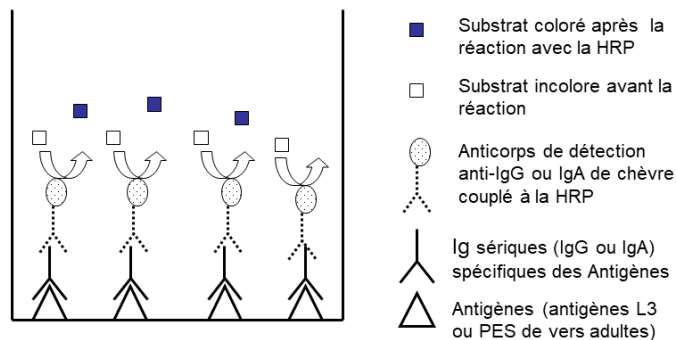


Figure 3. Principe de la détection par ELISA des IgG et des IgA de chèvre

Le déroulement

La liste du matériel nécessaire et la procédure de préparation des réactifs sont détaillées en annexe.

Le dosage s'effectue sur deux jours. Pour un même échantillon de sérum, les dosages des IgA de larves de L3 et des produits d'excrétion sécrétion (PES) de *H. contortus* sont réalisés conjointement sur des plaques distinctes.

La veille du premier jour débute l'étape de fixation des antigènes dans des plaques ELISA 96 puits à fond plat ayant une surface à forte affinité pour les protéines. La plaque est organisée de façon à disposer de trois puits par échantillon, pour un sérum de référence et pour un blanc réactifs. Les antigènes de larves L3 ou des produits d'excrétion sécrétion (PES) de *H. contortus* sont préparés à la concentration de 2 µg/mL dans du tampon sodium carbonate dans un tube stérile (200 µL par échantillon sont nécessaires). Pour les échantillons et le sérum de référence, 100 µL d'antigènes de L3 ou de PES sont déposés dans les deux premiers puits et 100 µL de tampon sodium carbonate dans le 3^e puits. Ce 3^e puits est un contrôle de fixation non spécifique propre à chaque échantillon. Pour le blanc réactif, 100 µL de tampon sodium carbonate sont distribués dans les trois puits. On recouvre la plaque de parafilm® et on la place une nuit à +4°C. Il est important de noter qu'une fois le dosage débuté, la plaque ne doit jamais être laissée à l'air libre, mais toujours recouverte d'un liquide, d'un film ou d'un couvercle.

Le lendemain matin, la plaque est vidée énergiquement et tapée plusieurs fois sur du papier absorbant, afin de vider correctement les puits. Puis, 300 µL de tampon de blocage sont introduits dans tous les puits, la plaque est recouverte d'un couvercle et incubée 3 h à température ambiante. Le tampon de blocage sert à bloquer les capacités de liaison restées libres dans les puits des plaques et permet ainsi d'éviter des fixations non spécifiques. Pendant le temps d'incubation, les échantillons de sérum sont décongelés et dilués si nécessaire. Si c'est le cas, 350 µL de sérum + 350 µL de tampon de dilution sont introduits, dans des cupules de 1.5 mL, et sont homogénéisés délicatement au vortex. À la fin du temps d'incubation, la plaque est vidée énergiquement et tapée plusieurs fois sur du papier absorbant. Puis 100 µL de sérum (dilué ou non dilué) sont déposés par puits (dans les deux puits avec antigène et dans le puits sans antigène), et pour le blanc réactif, 100 µL de tampon de dilution sont introduits dans les trois puits. La plaque est recouverte d'un couvercle et incubée 2 h à température ambiante. Cette étape correspond à la fixation de l'anticorps à doser.

Après incubation, la plaque est vidée énergiquement et lavée cinq fois avec du tampon de lavage, à l'aide du laveur de plaque, puis elle est tapée plusieurs fois sur du papier absorbant. Ensuite, 100 µL d'anticorps anti-IgA conjugué (Rabbit anti-goat IgA-HRP conjugate Alpha Diagnostic Intl, Cat#30120) sont déposés dans tous les puits, et la plaque est recouverte d'un couvercle et incubée 1 h à température ambiante. Cette étape correspond

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

à la fixation de l'anti-anticorps marqué, qui permet de mettre en évidence le complexe antigène-anticorps. De nouveau, la plaque est vidée énergiquement et lavée cinq fois avec du tampon de lavage, à l'aide du laveur de plaque puis elle est tapée plusieurs fois sur du papier absorbant. Puis, 100 μ L de substrat, constitué de tetraméthylbenzidine (TMB) dans le DMSO et eau oxygénée, sont déposés dans tous les puits. Au moment du dépôt, le substrat doit être incolore. La plaque est maintenue à l'abri de la lumière le temps nécessaire au développement de la coloration bleue, et l'évolution de l'intensité est surveillée. Dès que les blancs commencent à présenter une coloration marquée et que le sérum de référence présente une intensité soutenue, la réaction est stoppée par l'ajout de 50 μ L de H_2SO_4 2N/puits. La coloration bleue vire au jaune (photo 4). Bien essuyer le fond de la plaque avec du papier absorbant pour ôter d'éventuelles traces. Homogénéiser la plaque et vérifier l'absence de bulle avant de lire au lecteur de plaque à 450 nm.

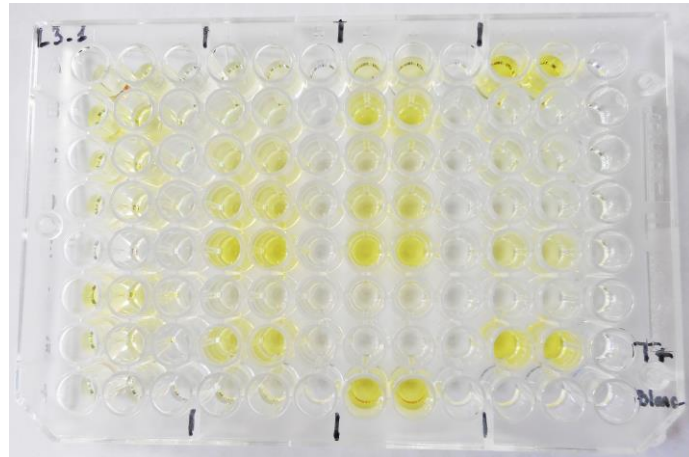


Photo 4. Plaque 96 puits avant lecture des densités optiques (©INRAE / D.Feuillet)

Validation des résultats du dosage

La validation des résultats des dosages est effectuée par plaque. Elle débute par le blanc réactif. Les valeurs de DO de ce dernier doivent être inférieures à 0.05 et sont, en règle générale, inférieures aux DO non spécifiques des échantillons. En cas de valeurs élevées pour le blanc réactif, les dosages réalisés sur la même plaque ne sont pas validés. S'ensuit la validation de la DO non spécifique des échantillons. La règle retenue est de valider le dosage pour les échantillons dont la DO non spécifique est inférieure à 0.100. Il arrive que la DO non spécifique soit supérieure à la DO spécifique. Ceci peut être lié à un incident de dosage auquel cas l'analyse de l'échantillon doit être reprise ; mais il arrive que certains échantillons présentent dans tous les cas une DO non spécifique élevée et ne peuvent pas être dosés par ELISA. Ensuite, le résultat du sérum de référence est examiné, car il permet de valider les dosages de la plaque ELISA considérée. La valeur de ce résultat doit correspondre à la valeur moyenne établie pour le sérum de référence $\pm 20\%$ (dans des conditions identiques notamment pour le lot des anti-IgA). Si le résultat du sérum de référence ne se trouve pas dans cette plage, les échantillons traités sur la même plaque doivent être repris. Une fois ces éléments considérés, ce sont les résultats de dosage des échantillons qui sont validés si l'écart de DO spécifique entre les deux réplicas est inférieur ou égal à 0.20.

Calculs et expression des résultats

Pour chaque échantillon (y compris pour le sérum de référence) la moyenne des deux DO spécifiques obtenues est calculée à laquelle est retranchée la valeur de la DO du contrôle de fixation non spécifique :

DO échantillon = moyenne des DO **spécifiques** de l'échantillon – DO **non spécifique** de l'échantillon

Le résultat est exprimé en D.O. À ce résultat, un facteur de correction est appliqué pour corriger un éventuel effet plaque et/ou jour d'analyse. Il est déterminé pour chaque plaque ELISA à partir du résultat du sérum de référence propre à la plaque et du résultat du sérum de référence d'une autre plaque choisie comme plaque de référence (Plaque_Réf).

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

$$\text{Facteur de correction} = \frac{\text{DO s\u00e9rum de r\u00e9f\u00e9rence (Plaque_R\u00e9f)}}{\text{DO s\u00e9rum de r\u00e9f\u00e9rence propre \u00e0 la plaque ELISA}}$$

Les valeurs accept\u00e9es pour ce facteur de correction sont comprises entre 0.8 et 1.2. Une fois ce facteur de correction \u00e9tabli pour chaque plaque, les r\u00e9sultats des \u00e9chantillons de la plaque ELISA consid\u00e9r\u00e9e sont corrig\u00e9s selon la formule suivante :

$$\text{DO \u00e9chantillon corrig\u00e9e} = \text{DO \u00e9chantillon} \times \text{Facteur de correction}$$

Conclusion

L'objectif de cette \u00e9tude \u00e9tait de r\u00e9aliser des dosages des IgA s\u00e9riques dirig\u00e9es contre les L3 et les PES de *H. contortus* par la technique ELISA. En l'absence de kit disponible dans le commerce, nous avons d\u00e9velopp\u00e9 ce dosage au sein de notre laboratoire.

Nos r\u00e9sultats montrent la sp\u00e9cificit\u00e9 du dosage. En effet seuls les animaux infest\u00e9s par *H. contortus* pr\u00e9sentent des IgA anti-L3 et anti-PES s\u00e9riques. De plus le taux en IgA est corr\u00e9l\u00e9 positivement \u00e0 la taille de la population de vers pr\u00e9sente dans l'abomasum de l'animal ce qui pourrait en faire un marqueur du niveau d'infestation.

Ce dosage est d\u00e9sormais utilis\u00e9 en routine dans nos travaux de recherche de caract\u00e9risation du d\u00e9terminisme g\u00e9n\u00e9tique de la r\u00e9sistance aux NGI. Toutefois, il est semi-quantitatif et reste relatif. Les taux d'anticorps sont comparables entre les \u00e9chantillons si les r\u00e9sultats des dosages ont \u00e9t\u00e9 normalis\u00e9s \u00e0 partir du m\u00eame s\u00e9rum de r\u00e9f\u00e9rence. Cet \u00e9l\u00e9ment limite la possibilit\u00e9 d'inter-comparaison entre les \u00e9tudes. Actuellement notre objectif est de mettre au point un dosage quantitatif pour d\u00e9terminer pr\u00e9cis\u00e9ment les concentrations en anticorps dirig\u00e9s contre le parasite.

Cet article est publi\u00e9 sous la licence Creative Commons (CC BY-SA).



<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Le Cahier des Techniques de l'Inra », la date de sa publication et son URL).

Bibliographie

Aboshady, H.M., Stear, M.J., Johansson, A., Jonas, E., Bambou, J.C., 2020, Immunoglobulins as Biomarkers for Gastrointestinal Nematodes Resistance in Small Ruminants: A systematic review. *Sci Rep* **10**, 7765.

Arece-Garc\u00eda J., L\u00f3pez-Leyva Y., Olmedo-Ju\u00e1rez A., Ram\u00edrez-Vargas G., Reyes-Guerrero D., L\u00f3pez- Arellano MA.E., Mendoza De Gives P., V\u00e1rady M., Rojo-Rubio R., Gonz\u00e1lez-Gardu\u00f1or R. (2017) First report of multiple anthelmintic resistance in goat farm in Cuba. *Helminthologia*.**54** (4):358–62.

Aumont G., Pouillot R., Mandonnet N., Nzobadila G. (1997) *M\u00e9thodologie de la coproscopie quantitative chez les petits ruminants infest\u00e9s par les strongles gastro-intestinaux*. R\u00e9sultats 1995 et 1996. Rapport Annuel 1996. Action Th\u00e9matique programm\u00e9e 72-94

Baermann G. (1917) *A simple method for the detection of Ankylostomum (nematode) larvae in soil tests*, Javasche Boekhandel & Drukkerij, Batavia.

Bambou JC., de la Chevrotiere C., Varo H., Arquet R., Kooyman F.N J., Mandonnet N. (2008) Serum antibody responses in Creole kids experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *J.Vet Par* **158** (4):311-318.

Barr\u00e9 N., Amouroux I., Aprelon R., Samut T. (1997) R\u00e9sistance des strongles gastro-intestinaux aux anthelminthiques dans les \u00e9levages caprins en Guadeloupe (Antilles fran\u00e7aises). *Revue d'Eleavage et de M\u00e9decine V\u00e9t\u00e9rinaire des Pays Tropicaux* **50** (2): 105-110.

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

Bishop S. C. et Morris C. A. (2007) Genetics of disease resistance in sheep and goats: *Small Ruminant Research*. **70**, 48-59.

Giorgi, M., Godard, X., Mounoussamy, F., Moutoussamy, M., Mulciba, P., Népos, A., Marie-Magdeleine, C., Boval, M. (2019). Procédure de collecte totale de fèces de petits ruminants. *Cahier des Techniques de l'INRA*, **96** (Numéro Spécial : Centre de Recherche Antilles-Guyane), 1-11.

Lumaret JP., Errouissi F., Floate K., Römbke J., Wardhaugh K. (2012) A Review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **13**(6), 1004-1060.

Mahieu M., Ferre B., Madassamy M., Mandonnet N. (2014) Fifteen years later, anthelmintic resistances have dramatically spread over goat farms in Guadeloupe. *Veterinary Parasitology* **205**(1-2): 379-384.

Moreno-Romieux C., Salle G., Jacquiet P., Blanchard A., Chylinsk C., Cabaret J., Francois D., Saccareau M., Astruc J.M., Bambou J.C., Mandonnet N. (2017) Genetic resistance to infections by gastrointestinal nematodes in small ruminants: a sustainability issue for grass-based production systems. *Inra Productions Animales* **30**, 47-56.

Prchal L, Podlipna R., Lamka L., Dedkova T., Skalova L., Vokral I., Lecova L., Vanek T., Szotakova B. (2016). Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environ Science and Pollution Res Int* **23** (13), 13015-13022.

Raynaud J. P. (1970) Étude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **45**(3): 321-342.

Saccareau, M., Sallé, G., Robert-Granié, C., Duchemin, T., Jacquiet, P., Blanchard, A., Moreno, C. R. (2017). Meta-analysis of the parasitic phase traits of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasites & Vectors*, **10**, 201.

Waller P.J., Chandrawathani P. (2005) *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from Tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine* **22**, 131-137.

ANNEXES

Liste du matériel

- Tubes à hémolyse de 5 mL avec bouchon
- Cupules de 0.5 mL, 1.5 mL et 2 mL stérilisées
- Bain marie
- Microcuvettes jetables pour spectrophotomètre
- Spectrophotomètre $\lambda 562$ nm Lambda 25 Perkin Elmer
- Pipettes automatiques à volume variable de 100, 200 et 1000 μ L
- Pipette multicanaux x8 de 100 et 300 μ L
- Cônes de 200, 300 et 1000 μ L stériles
- Pipettes plastiques stériles de 2, 5, 10 et 25 mL
- Plaques de microtitration 96 puits (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp F96 Ref ThermoScientific 442404)
- Tubes Falcon® de 15 et 50 mL
- Réservoirs pour réactif
- Papier absorbant
- Parafilm®M

Le Cahier des Techniques de l'Inra 2020

- Papier aluminium
- Lecteur de plaque λ 450 nm
- Laveur de plaque

Préparation des réactifs chimiques et biologiques

Solution mère de Bovine Serum Albumine (BSA) pour le dosage des protéines :

- Solution à 0.1 mg/ml dans le tampon PBS 1X.

Dans un bécher de 20 mL, peser 10 mg de BSA (référence Sigma A7906) et ajouter 10 mL de tampon PBS 1X. Homogénéiser doucement (limiter la formation de mousse).

Transvaser dans une fiole jaugée de 100 mL. Ajuster avec du tampon PBS 1X.

Tampon sodium carbonate 0.1 M, pH 9.6 pour la dilution des antigènes :

Dans une fiole jaugée de 50 mL :

- Sodium carbonate (Na_2CO_3) à 0.2M (21.2 g/l) **8 mL**
- Sodium bicarbonate (NaHCO_3) à 0.2M (16.8 g/l) **17 mL**
- Eau distillée **25 mL**

Vérifiez le pH des 50 mL préparés qui doit être à 9.6. Filtrer à 0.2 μm

Tampon PBS 10 X : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.2-7.4

Pour 1 litre de solution, peser 80.06 g de NaCl, 2.015 g de KCl, 29 g de Na_2HPO_4 12 H_2O , 2.04 g de KH_2PO_4 , ajuster le pH à 7.2-7.4 et filtrer à 0.20 μm ou autoclaver la solution PBS 10X.

Tampon PBS 1 X : diluer au 1/10 la solution de PBS 10X avec de l'eau distillée pour obtenir une solution PBS 1X

Tampon de lavage PBS 1X à 0.1% Tween® 20 : mettre 1 mL de Tween® 20 dans une fiole jaugée de 1 L compléter qsp 1 L avec du PBS 1X.

Tampon de dilution FILTRÉ : à partir d'une solution de tampon PBS 1X à 0.1 % Tween® 20 filtrer à 0.20 μm .

Tampon de blocage : BSA 1%, Saccharose 5%, NaN_3 0,05% en PBS 1X :

Pour 1 L de solution peser 10 g de BSA, 50 g de Saccharose, 500 mg de NaN_3 (hautement toxique) qsp 1 L avec du PBS 1X

N.B. Tous les tampons doivent être conservés à 4°C. Ne pas autoclaver dès lors qu'il y a du Tween® 20 qui ne supporte pas les températures élevées.

Préparation de l'anti IgA conjugué : « Rabbit anti-goat IgA-HRP conjugué » de chez Alpha Diagnostic Intl. Inc ref Cat#30120 acheté chez Gentaur .Se conserve à 4°C

Cet anticorps peut être soit sous forme liquide soit en poudre. S'il est sous forme de poudre il se prépare de la façon suivante : avant d'ouvrir la cupule, commencer par la centrifuger rapidement 15 secondes à 2000 g pour que toute la poudre tombe dans le fond de la cupule puis mettre 500 μL de Tampon PBS 1X filtré à 0.2 μm (PAS DE TWEEN). Laisser 30 secondes puis homogénéiser par retournement une dizaine de fois. Pour finir refaire une centrifugation de 15 secondes à 2000 g pour récupérer ce qu'il y a dans le bouchon.

Chaque nouveau lot d'anti-IgA conjugué doit être titré et comparé au lot précédent à l'aide du sérum témoin utilisé dans les séries de dosages.

Titration de l'Anti IgA :

Pour ce faire, procéder de la même façon que pour le traitement des échantillons sauf pour l'étape d'ajout de l'anti-IgA. Pour cette étape, réaliser en tube les dilutions en cascade du 1/250 au 1/16000 de l'anti IgA selon le tableau ci-dessous.

Tableau 1. Tableau des dilutions en cascade de l'anti IgA

Fact de dilution	Vol. d'anti-IgA en μL	Vol. de tampon de dilution en μL	Distribution en cascade en μL
1/250	8	1992	
1/500	0	700	700
1/1000	0	700	700
1/2000	0	700	700
1/4000	0	700	700
1/8000	0	700	700
1/16000	0	700	700

Tester les dilutions d'anti-IgA avec le sérum de référence et déterminer la dilution appropriée pour les dosages pour conserver le même niveau de réponse.

Conservation et utilisation de l'Anti IgA : conserver à +4°C et concentrés les anticorps en aliquote dans des microcupules en quantité suffisante pour traiter deux plaques à la fois. Exemple : si la dilution appropriée est celle au 1/500^{ème} préparez 10 cupules de 50 μL .

Au moment de l'utilisation, diluer de nouveau au 1/500^{ème} dans du tampon de dilution.

Préparation du substrat pour la révélation des IgA :

- **Tampon Phosphate citrate:** mettre à dissoudre dans un bécher une tablette de Phosphate-citrate buffer de chez Sigma référence P-4809 dans 50 mL d'eau distillée. Ajouter un barreau aimanté et homogénéiser jusqu'à ce que la tablette soit totalement dissoute. Verser le tout dans une fiole jaugée de 100 mL, rincer le bécher reverser dans la fiole et ajuster avec de l'eau.
- **Préparation du tetramethylbenzidine(TMB) 2 mg/mL dans le dimethylsulfoxyde (DMSO) :** peser 50 mg de TMB de chez SIGMA référence T2885-1g (stocké à +4) dans un bécher de 20 mL. Préparer des aliquotes de 1.3 mL en cupules stériles de 1.5 mL et conserver à -20°C jusqu'à utilisation.
- Dans un tube protégé de la lumière préparer le **substrat** en fonction du nombre de plaques ELISA et selon les volumes indiqués dans le tableau 3.

Tableau 2. Tableau de préparation du substrat de révélation des IgA en fonction du nombre de plaques

Réactifs	Nombre de plaques			
	1	2	4	6
Solution de TMB à 2 mg/mL dans le DMSO	0,58 mL	1,16 mL	2,32 mL	3.48 mL
Tampon phosphate citrate en mL	10.4 mL	20.8 mL	41.6 mL	62.4 mL
H ₂ O ₂ à 30 volumes	9.35 μL	18.7 μL	37.4 μL	56.1 μL

Acide sulfurique 1M : sous la sorbonne à partir d'acide sulfurique concentré de qualité «pour analyse» d=1.84 MM 98.078 g/mol et pur à 95 % prélever 56.11 mL d'acide sulfurique concentré qsp 1 L dans une fiole jaugée. Mettre l'acide dans l'eau.

Sérum de référence : sérum «positif» taux en anticorps anti-L3 et anti-PES déterminés au préalable. Préparer suffisamment d'aliquotes pour traiter toutes les plaques ELISA d'un même protocole (prévoir une marge de 20 %). Conserver à -20°C.