

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Ecole Doctorale Ingénierie et Environnement

Option : Biotechnologie de l'Environnement

LABORATOIRE BIOGEP

MEMOIRE

Présenté par M^{elle} HADJ RABIA Samia

En vue de l'obtention du diplôme de Magister

Thème

**PURIFICATION ET CARACTERISATION PARTIELLE DE LA FRACTION 5
EXTRAITE D'UN DECHET BIOLOGIQUE « LIQUIDE HYDATIQUE »
ETUDE DE SON MARQUAGE A L'IODE-125**

Soutenu le 24 /05/2010 devant le jury :

Président :
Examineur
Examinatrice
Rapporteur
Co-rapporteur
Invité

P^r. MAMERI N.
P^r. LOUNICI H.
D^r. ABDI N.
D^r BENZAID A.
D^r GRIB H.
RAACHE R.

Professeur (ENP)
Professeur (UMMTO/BIOGEP)
Maître de conférences(ENP)
Maître de recherche (CRND)
Maître de conférences (ENP)
Chargé de cours (USTHB)

Année 2009-2010

الملخص

الكيس المائي هو مرض طفيلي ناتج عن وجود عند البشر والحيوانات العاشبة، يرقة مليئة بسائل " سائل مائي". هذا الأخير، الذي يعتبر نفاية بيولوجية هو مصدر جيد لمضادات الطفيليات المستعملة للتشخيص. في هذا العمل الحالي، تم تنقية المولد ضد 5، أحد المكونات الرئيسية والأكثر مناعة لهذا السائل البيولوجي، من خلال تقنية الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة 70 % وتمييزه بالطرق الفيزيوكيميائية والمناعية. الفصل الكروماتوغرافي للسائل المائي للإنسان عن طريق هلام الترشيح سمح برؤية أربع قمم أين تميز الثالث بوجود المولد ضد 5. هذا الأخير، أظهر تنقلا كهربائي نموذجيا لمولد ضد 5 باستعمال تقنية الهجرة الكهرومناعية والتي أعطت حلقة ترسبية واحدة مقابل مصلى المرضى المصابين بالكيس المائي وذلك الناتج من تحصين الأرنب بالمولد ضد. وقد تم كشف شريط من نحو KDa66 عن طريق تقنية الالكترافوراز على هلام متعدد الأكريلاميد في شروط مشوهة للطبيعة الأصلية (SDS-PAGE) واللا ارجاعية. وقد حقق التثبيت الإشعاعي باليود 125 لمولد ضد نسبة مرضية بحوالي 63 %. بعد تقييم المولد ضد المشع المتحصل عليه، فقد أظهر هذا الأخير نقاوة إشعاعية كيميائية بنسبة 92.6 % وتفاعل خاص بمقدار 11.7 Ci / ملغ. أعطت دراسة السلامة المولدة للضد باستخدام تقنية التجريب الإشعاعي المناعي (RIA) ارتباط غير خاص مقدر بنسبة 16 % ونسبة مئوية بحوالي 63 % من ارتباط خاص مقابل مصلى الأرنب المحصن بالمولد ضد 5. ولقد تبين بعد اختبار التفاعل مناعي لمولد ضد المشع مقابل مصلى المرضى الذين يعانون من هذا المرض أن نسبة الارتباط الخاص كانت منخفضة مقارنة مع مصلى الأرنب الذي تم تحصينه بالمولد ضد 5. إن هذه النتائج الأولية لعملية التنقية والتثبيت الإشعاعي تعتبر مشجعة و من المرجح أن تكون من دون شك أحسن بكثير في المستقبل.

المصطلحات: الكيس المائي، المولد ضد 5، التنقية، التثبيت الإشعاعي، اليود 125

RESUME

L'hydatidose est une maladie parasitaire due au développement chez l'homme et les herbivores d'une larve remplie d'un liquide « liquide hydatique ». Ce dernier qui est un déchet biologique constitue une bonne source d'antigènes parasitaires à usage diagnostique. Dans le présent travail, l'antigène 5, reconnu comme étant la fraction majeure et la plus immunogène de ce liquide hydatique a été purifié partiellement par précipitation au sulfate d'ammonium à 70% puis caractérisé par les méthodes physicochimiques et immunologiques. La séparation chromatographique du liquide hydatique humain par gel filtration a permis de visualiser quatre pics dont le troisième est caractéristique de l'antigène 5. Ce dernier a montré une mobilité électrophorétique typique de l'antigène 5 par immunoelectrophorèse en donnant un seul arc de précipitation vis-à-vis d'un pool de sérum de malades et celui du lapin immunisé par cet antigène. Une bande approximative de 66KDa a été révélée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS-PAGE) et dans des conditions non réductrices. Le radiomarquage de cet antigène à l'iode 125 a donné un rendement satisfaisant de l'ordre de 63%. L'évaluation de l'antigène marqué a permis de déterminer une pureté radiochimique de 92.6% et une activité spécifique de 11.7 µCi/µg. L'étude de l'intégrité antigénique utilisant la technique de radioimmunosage (RIA) a donné une liaison non spécifique de 16% et un pourcentage de fixation vis-à-vis du sérum de lapin anti fraction 5 de l'ordre de 63%. L'immunoréactivité testé avec les sérums de malades atteints par cette maladie a révélé une faible liaison spécifique comparée à celle obtenu avec l'antisérum de lapin. Ces résultats préliminaires relatifs à la purification et au marquage à l'iode 125 sont promoteurs et susceptibles d'être sans doute largement améliorés dans le futur.

Mots-clés : Hydatidose, Antigène 5, Purification, Radiomarquage, Iode 125

ABSTRACT

Hydatidosis is a parasitic disease due to development in humans and herbivorous a larva filled with a fluid " hydatid fluid". In the present work, antigen 5, recognized as the major fraction and more immunogenic of this hydatid fluid was partially purified by precipitation with ammonium sulfate at 70% and characterized by physicochemical and immunological methods. Chromatographic separation of human hydatid fluid by gel filtration showed four peaks which the third is characteristic of antigen 5. The latter displayed an electrophoretic mobility typical of antigen 5 by immunoelectrophoresis giving a single precipitin against a pool of patients' serum and that of rabbits immunized by this antigen. A band of approximately 66KDa was revealed by electrophoresis on polyacrylamide gel in denaturant (SDS-PAGE) and non-reducing conditions. The antigen radiolabelling with iodine 125 has achieved a satisfactory yield of 63%. Evaluation of labelled antigen allowed to determine a radiochemical purity of 92.6% and specific activity of 11.7 Ci / mg. The study of the antigenic integrity using radioimmunoassay (RIA) has given nonspecific binding of 16% and percentage of binding against the rabbit anti antigen 5 serum the order of 63%. The immunoreactivity tested with sera from patients with hydatid disease showed a lower specific binding compared to that obtained with rabbit antiserum. These preliminary findings for the purification and iodine 125- labelling are encouraging and are likely to be without doubt greatly improved in the future.

Keywords: Hydatidosis, Antigen 5, Purification, Radiolabelling, Iodine 125

PROVERBE

« Le plus sérieux des efforts fournis, c'est d'aimer et d'accepter de travailler dans une ambiance de collaboration, d'amitié et de fraternité »

DEDICACES

Je dédie ce mémoire :

A mes chers parents avec affection et reconnaissance

A mes frères et sœurs

A mes neveux et mon beau frère

A tous mes amis(es)

REMERCIEMENTS

Dieu soit loué,

Ce travail a été réalisé au niveau du département des Applications Nucléaires du Centre de Recherche Nucléaire de Draria en collaboration avec l'Ecole Nationale Polytechniques et l'Institut Pasteur d'Alger.

Mes vifs remerciements s'adressent :

A M^r MAGNOUCHE AEH., Directeur Général du Centre de Recherche Nucléaire de Draria pour la faveur qu'il m'a accordée en me facilitant la tâche pour continuer mes études de post graduation en toute sérénité et en autorisant d'effectuer quelques expériences exposées dans ce mémoire au niveau de l'Institut Pasteur d'Alger. Veuillez trouver ici Monsieur le Directeur, le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A M^r BENZAID A., directeur de mémoire d'avoir dirigé ce mémoire, pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant de réaliser quelques techniques à l'Institut Pasteur d'Alger et ainsi pour ses précieux conseils. Qu'il trouve ici mon sincère respect.

A M^r GRIB H., co-directeur de ce mémoire, d'avoir accepté de diriger ce travail et pour l'effort qu'il a fourni pour corriger ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

Au professeur MAMERI N. d'avoir voulu me faire l'honneur de présider le jury.

M^{ne} ABDI N. maître de conférences à l'ENP, pour avoir voulu examiner ce travail.

Au professeur LOUNICI H. de l'ENP d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Au professeur ABBADI, de m'avoir accueillie et accepté à ce que je réalise une partie de ce travail au sein de son service d'immunologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). Qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

A M^{elle} RAACHE R. chargé de cours à l'USTHB et chercheur associé à l'IPA pour ses qualités humaines, son aide précieuse et de m'avoir permis d'effectuer le travail en toute paix au sein de l'unité de biochimie du service d'immunologie.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Professeur Hamrioui B. chef de service de parasitologie de l'hôpital Mustapha Bacha, pour sa modestie et de m'avoir fourni les sérums de malades positifs.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel du service d'immunologie d'IPA en particulier M^{me} ATTAL d'avoir autorisé mon accès à l'unité d'immunochimie pour réaliser quelques techniques, Mme KACI N. pour l'appareil d'électrophorèse, HAYET, AMEL et SOFIA pour leur aide précieuse.

Je tiens également à remercier M^{me} TOUABTI chef de service du contrôle de qualité de l'IPA, d'avoir accepté d'effectuer les immunisations à son niveau sans oublier bien sur l'aide précieuse du personnel d'animalerie.

Un grand merci du fond du cœur à l'ensemble du personnel du service de parasitologie de l'IPA, en particulier au chef de service, professeur BACHI, à M^{me} ZENAIDI, chef d'unité de l'hydatidose, à OMAR, à SAID, à ami MABROUK et à MAHDIA pour leur aide précieuse et leur extrême gentillesse.

J'exprime ma profonde gratitude à M^{me} BOUDJAMAI S. attachée de recherche au département des Applications Nucléaires de CRND, de m'avoir fait bénéficier de ses conseils et de son savoir scientifique. Qu'elle trouve ici l'expression de ma très sincère reconnaissance.

Je voudrais également remercier SOUHILA, M^r BENHIDOUR A., CHAREF A, ALDJIA, NEJLA, FERIEL et BENAZZOUZ S. pour leur extrême serviabilité.

Merci encore à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à la réalisation et l'aboutissement de ce travail.

GLOSSAIRE

Adjuvant : Produit (additif) ajouté à une préparation antigénique pour stimuler son action et amplifier la réponse immunitaire, une fois administré en même temps et au même point qu'un antigène.

Affinité : constante d'association intrinsèque d'un anticorps et d'un antigène. Elle mesure la force et la stabilité de la liaison entre le paratope et l'épitope.

Agglutination : Réaction au cours de laquelle des antigènes particuliers (bactéries, virus, hématies) ou rendus particuliers par fixation (à des hématies, à des particules de latex) sont réunis par des anticorps spécifiques, et forment des amas.

Agglutination passive : réaction d'agglutination dans laquelle l'antigène qui est mis en évidence a été fixé sur un support inerte.

Antigène: Toute substance qui déclenche la formation d'anticorps et ne réagit qu'avec l'anticorps spécifique correspondant; aussi appelée immunogène. C'est donc une substance ou cellule qui provoque une réaction immunitaire.

Anticorps : une protéine produite par l'organisme en réaction à un antigène, et capable de se combiner spécifiquement avec cet antigène. Aussi appelé gammaglobuline ou immunoglobuline.

Anticorps monoclonal : Anticorps produit par un clone de plasmocytes et dirigé contre un seul déterminant antigénique.

Antisérum (immun-sérum): Sérum d'un sujet préparé par l'injection d'antigènes et contenant des anticorps dirigés contre de tels antigènes.

Asexué : C'est une multiplication sans fécondation (bourgeoisement, fragmentation, bouturage, scissiparité, gemmation), autrement dit c'est un mode de reproduction qui ne fait intervenir ni les organes sexuels, ni les cellules du type gamète, c'est à dire reproductrices (ovules, spermatozoïdes). La multiplication se fait par bourgeoisement, fragmentation, bouturage, scissiparité, gemmation.

Anthropozoonose : Maladie transmissible commune à l'homme et aux animaux.

Cestode : Ver segmenté

Choc anaphylactique : Réaction d'hypersensibilité systémique qui provoque la vasodilatation périphérique puis un état de choc. Aussi appelé anaphylaxie systémique.

Cire : Filament ou appendice

Curie (Ci) : Ancienne unité servant à définir l'intensité de la radioactivité dans un échantillon de matière. La curie correspond à 37 milliards ($3,7 \times 10^{10}$) désintégrations par seconde, ce qui représente l'activité d'un gramme de radium.

Cytokine : Petite protéine libérée par des cellules humaines en réaction à une infection bactérienne; peut provoquer directement ou indirectement de la fièvre, des douleurs ou la multiplication des lymphocytes T.

Désintégration : Diminution dans le temps de la quantité de matière radioactive, par suite de l'émission spontanée par les noyaux atomiques de particules alpha ou bêta; cette émission s'accompagne souvent d'un rayonnement gamma.

Echinococcose secondaire : Apparition d'autres sites d'hydatidose secondaire suite à une rupture ou fissuration du kyste hydatique provoquant ainsi la dissémination des protoscolex.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) : Désigne les méthodes immunologiques d'analyse faisant appel à des antigènes ou à des anticorps, marqués par une enzyme dont l'activité permet d'obtenir une réaction colorée, mesurable quantitativement.

Epidémiologie : Science qui étudie les facteurs responsables de l'apparition, de l'évolution et de la transmission des maladies dans les populations. Elle s'intéresse aux vecteurs, aux hôtes intermédiaires et aux réservoirs animaux.

Epitope (déterminant antigénique) : la plus petite unité structurale d'un antigène reconnue par un anticorps.

Faux positif : est le cas d'une personne où le test retrouve un certain degré de fibrose non confirmé à la biopsie.

Faux négatif : est celui d'une personne où le test est négatif alors que la biopsie retrouve une fibrose confirmée.

Hemagglutination passive (HAP) : C'est une technique de diagnostic indirecte permettant une réaction séroimmunologique entre les hématies formolées et sensibilisées à l'Ag hydatique et des dilutions croissantes des sérums à tester.

Hermaphrodite: Une espèce dans lequel un organisme contient deux séries d'organes sexuels (mâle et femelle).

Hermaphroditisme: Présence d'organes de reproduction des deux sexes (mâle et femelle) chez un même individu

Hôte définitif : Hôte chez lequel se produit la reproduction sexuée; hôte qui héberge la forme adulte d'un parasite.

Hôte intermédiaire : Hôte chez lequel il n'y a pas de reproduction sexuée; hôte qui héberge la forme larvaire d'un parasite.

Humorale : relative aux substances liquides ou à moitié liquides de l'organisme

Hydatide: Forme larvaire (kystique) du ténia échinocoque qui se développe dans les tissus

Hydatidose : Affection par la forme larvaire ou vésiculaire du ténia échinocoque qui se développe dans les tissus sous la forme de kystes.

Hypereosinophilie : Parmi les différents globules blancs du sang existe normalement le polynucléaire éosinophile ; lors d'une analyse de sang, lorsque cet élément est en nombre anormalement important (plus de 500/mm³), on parle d'hyperéosinophilie. Ceci signifie souvent que le patient est porteur d'un ver.

Immunsation : Il s'agit de l'induction d'une protection par immunité contre une maladie, par exposition délibérée aux antigènes ou aux immunogènes d'un agent pathogène afin que le système de défense apprenne à le reconnaître et que ses réactions futures soient augmentées en cas d'exposition aux mêmes antigènes/immunogènes.

Immunité : Etat de résistance de l'organisme à une infection. Cet état est soit inné (certaines personnes naissent avec les gènes de résistance contre une maladie), soit acquis naturellement (après avoir fait certaines maladies, on est protégé contre une récurrence), soit acquis médicalement (vaccination, injection d'immunoglobulines).

Immunoessai : Toute technique qui utilise la réaction antigène-anticorps pour la détection et la quantification d'antigènes, d'anticorps ou de substances voisines.

Immunodiffusion : Techniques basées sur la précipitation d'antigène et d'anticorps après diffusion dans un milieu semi-solide.

Immunoélectrophorèse : Technique combinant une électrophorèse suivie d'une immunodiffusion.

Immunofluorescence : Technique utilisant un anticorps couplé à un fluorochrome (habituellement l'isothiocyanate de fluorescéine). L'émission de fluorescence permet de détecter l'anticorps fixé sur l'antigène.

Immunogène : Se dit d'une substance capable de provoquer une réaction immunitaire.

Immunogénicité : Capacité d'une substance de susciter une réponse immunitaire.

Immunoglobuline : (Ig) protéine présente dans le sérum ou dans les liquides biologiques, et qui joue le rôle d'anticorps; synthétisée en réaction à un antigène et capable de réagir avec celui-ci; aussi appelée gammaglobuline.

Immunologie : Science qui étudie les différents aspects permettant à un organisme de reconnaître et de réagir contre une substance immunogène ou à un autre organisme, micro-organisme le plus souvent, vivant.

Interféron : Protéines antivirales produites par les cellules infectées et bloquant le cycle de multiplication du virus dans les cellules saines.

Interleukines (IL) : Cytokines sécrétées par de nombreuses cellules (macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales, cellules endothéliales...) qui stimulent d'autres cellules intervenant dans la réponse immunitaire.

Isotopes : atomes d'un même élément chimique dont les noyaux ne contiennent pas le même nombre de neutrons.

Lymphocyte : leucocyte qui joue un rôle clé dans l'immunité spécifique.

Marqueur : Composé fluorescent, radio-actif ou doté de propriétés enzymatiques fixé à un antigène ou un anticorps permettant de révéler la présence d'une substance immunologique.

Monoclonal : C'est un anticorps spécifique produit in vitro par un clone de lymphocytes B normaux hybridés à l'aide de lymphocytes B cancéreux.

Parasite : Organisme contraint pour survivre ou se reproduire de se nourrir aux dépens d'un autre organisme dit "hôte". Parfois le parasite vit sans trop perturber son hôte (exemples : toxoplasme, ver solitaire) ; parfois, le parasite menace la vie de son hôte (exemples : paludisme, maladie du sommeil).

Paratopes : Désigne la partie variable de l'anticorps capable de reconnaître le déterminant antigénique.

Périkystique : Membrane qui enveloppe le kyste

Période radioactive (T) : La période physique ou radioactive est le temps nécessaire à une réduction de moitié de l'activité d'un radio-isotope donné par rapport à sa valeur initiale.

Plathelminthe : Ver plat

Proglottis : Segment d'un ver annélide qui contient les organes de reproduction mâles et femelles....

Proligère : Portant un germe.

Prophylaxie (prévention) : Processus actif ou passif ayant pour but de contrecarrer l'apparition ou la propagation d'une maladie.

Radioactivité : Nombre de désintégrations (transformations) ou dégradations d'une matière radioactive par unité de temps. Les unités d'activité sont le Becquerel (Bq) et la Curie (Ci).

Radioisotope : Élément, naturel ou artificiel, possédant une radioactivité; c'est-à-dire la propriété de se transformer en un autre élément en émettant par modification du noyau de son atome des rayonnements corpusculaires (particules α ou β , ou électrons) ou électromagnétiques.

Rayonnement bêta (β) : Il s'agit d'électrons se déplaçant à haute vitesse. Ce rayonnement est arrêté par une plaque de plexiglas de 1 cm d'épaisseur. Dans les fabriques de papier, on mesure souvent l'épaisseur des feuilles à l'aide de sources de rayonnement β .

Rayonnement gamma (γ) : Il s'agit d'ondes électromagnétiques, comme la lumière, mais possédant une très grande énergie. Les rayons γ sont émis par le noyau de l'atome. Le rayonnement γ est en général très pénétrant. A titre d'exemple d'utilisation du rayonnement γ , citons la radiographie de soudures et la radiothérapie médicale.

Rayonnement ionisant : caractérise les particules alpha, bêta, les rayons gamma, les rayons x, les neutrons, les électrons à haute vitesse, les protons à haute énergie et autres particules susceptibles de générer des paires d'ions.

Réaction croisée : Réaction d'un anticorps avec un antigène différent de celui qui en a induit la formation et due à des parentés antigéniques entre les molécules.

Reproduction sexuée : Indique que la propagation d'une espèce fait intervenir les gamètes mâles et femelles.

Scolex : Tête du ténia et autres vers cestodes.

Sérodiagnostic : Diagnostic de certaines maladies infectieuses effectué par la mise en évidence d'anticorps spécifiques ou par la constatation d'une élévation du titre des anticorps au cours de l'évolution de la maladie.

Sérologie : Branche de l'immunologie qui étudie la réaction antigène-anticorps in vitro.

Sérum (immun-sérum): Partie liquide (non solide) du sang.

Spécificité : Adaptation exacte et exclusive d'un anticorps à un antigène.

Strobilation : Chez les ténias, division en chaînes de proglottis.

Taxonomie : Est la science qui a pour objet la Description des organismes vivants, classification et attribution d'un nom à des groupes d'organismes ayant en commun ancêtres et caractéristiques phénotypiques.

Ténia (taenia) : ver parasite des intestins des mammifères au corps formé d'un grand nombre d'anneaux.

Titre d'hémagglutination : Valeur définissant l'inverse de la dilution la plus élevée d'un sérum encore capable de provoquer l'hémagglutination d'antigènes particuliers.

Tumor Necrosis Factors (TNF alpha et beta) : molécules sécrétées par les macrophages (TNF alpha) et les lymphocytes T (TNF beta), qui partagent de nombreuses propriétés avec IL-1.

Vaccin : Est une préparation contenant des micro-organismes qui sont soit des germes inactivés, soit des germes tués. Cette préparation est administrée dans le but d'immuniser l'organisme contre des maladies infectieuses.

Variabilité antigénique : Capacité, pour un agent infectieux, de modifier ses protéines de surface ce qui rend inopérantes les défenses immunitaires de l'hôte aux dépens duquel il se développe.

Zoonose : Maladie infectieuse naturellement transmissible des animaux vertébrés à l'homme et inversement.

LISTE DES BREVIATIONS

Ac : Anticorps
Ag : Antigène
B S A : Bovine sérum albumin
Ci : Curie
CPM : Coups par minute
DO : Densité optique
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
E g : Echinococcus granulosus
H D : Hôte définitif
H I : Hôte intermédiaire
H P A : Hémagglutination passive
I D D : Immunodiffusion double
I E P : Immunoélectrophorèse
IFI : Immunofluorescence indirecte
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
Il : Interleukine
KDa : Kilodalton
Kev : Kiloélectronvolt
K H : Kyste hydatique
K H P H : Kyste hydatique poumon humain
LA : Latex agglutination
L H : Liquide hydatique
MBq : Méga Becquerel
mCi : milli curie
PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide
P E G : Polyéthylène glycol
P M : Poids moléculaire
P S A : Persulfate d'ammonium
RIA : Radioimmunoassay
S D S : Sodium dodecyl sulfate
T : Période radioactive
t/min : Tour par minute
T E M E D : Tétraméthyl éthylène diamine
TNF : Tumor Necrosis Factors

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
A- L'HYDATIDOSE	2
I- Epidémiologie	2
I- 1-Définition.....	2
I- 2- Morphologie.....	2
I- 2-1- <i>Forme adulte</i>	2
I- 2-2- <i>Forme ovulaire</i>	3
I- 2-3- <i>Forme larvaire (kyste hydatique)</i>	3
I- 3-Structure du kyste hydatique.....	3
I- 4- Reproduction.....	6
I-4-1- <i>Reproduction sexuée</i>	6
I- 4-2- <i>Reproduction asexuée</i>	7
I- 5- Répartition géographique	7
I- 5-1- <i>L'hydatidose dans le monde</i>	7
I- 5-2- <i>L'hydatidose en Algérie</i>	7
I- 6- Cycle évolutif	7
II- Immunité	8
III-Symptomatologie clinique	10
III- 1- Hydatidose hépatique	10
III- 2- Hydatidose pulmonaire	10
III- 3- Autres localisations (rares)	11
IV- Diagnostic biologique	11
IV- 1- Diagnostic indirect.....	11
IV-1-1- <i>Non spécifique</i>	11
IV-1-2- <i>Spécifique</i>	11
IV- 2- Diagnostic direct	13
IV-2-1- <i>Analyse de vomique ou de ponction d'un kyste hydatique</i>	13
IV-2-2- <i>Analyse d'une pièce d'exérèse</i>	13
V- Traitement	13
V- 1- Chirurgical	13
V- 2- Médical	13
VI- Prophylaxie	14
B- MARQUAGES RADIOACTIF DES PROTEINES	14
I- Définition d'une molécule marquée	14
II - Marqueur radioactif	15
III- Marquage des protéines à l'iode radioactif	16
III- 1- Condition de marquage	16

III- 2- Méthodes de marquage à l'iode radioactif	16
III-2-1- <i>Marquage par voie directe</i>	16
III- 2-1-1- <i>Méthode chimique</i>	17
a) <i>Oxydation par la chloramine T</i>	17
b) <i>L'iodobeads</i>	18
c) <i>L'iodogen</i>	18
d) <i>N-chlorosuccinimide</i>	19
III- 2-1-2- <i>Méthode enzymatique</i>	19
a) <i>Oxydation à la lactopéroxydase</i>	19
III- 2-1-3- <i>Oxydation électrochimique</i>	19
III-2-2- <i>Marquage par voie indirecte</i>	20
IV- Caractérisation du traceur radioactif	20
IV- 1- <i>Pureté radiochimique</i>	20
IV-2- <i>Immunoréactivité</i>	21
IV-3- <i>Activité spécifique (AS)</i>	21
IV-4- <i>Stabilité des molécules marquées</i>	21
C- METHODES UTILISEES POUR LA PURIFICATION ET LA CARACTERISATION DE	
L'ANTIGENE 5 ET DU TRACEUR RADIOACTIF	22
I- Dialyse	22
II - Précipitation au sulfate d'ammonium	22
III - Chromatographie d'exclusion moléculaire	23
I- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS- PAGE)	23
II- Immunisation des lapins	23
III- Immunodiffusion double (IDD)	23
IV- Immunoélectrophorèse (IEP)	24
V- Hemagglutination	24
VI- Radioimmunos dosage (RIA)	24
VII- Dosage des protéines	24
MATERIELS ET METHODES	27
I- Extraction de l'antigène 5 du liquide hydatique	25
I- 1- Ponction et traitement du liquide hydatique	26
I-1- 1- <i>Dialyse</i>	27
I- 2- Purification et caractérisation de l'antigène 5.....	27
I- 2- 1- Précipitation au sulfate d'ammonium	27
I-2- 2- Dosage des protéines	27
I- 2-3- Chromatographie d'exclusion moléculaire.....	30

I- 2-4- Etude immunochimique de l'antigène 5	30
I- 2- 4-1- <i>Immunisation des lapins</i>	30
I- 2- 4-2- <i>Immunodiffusion double (Ouchterlony)</i>	31
I- 2- 4-3- <i>Immunoélectrophorèse</i>	31
I- 6- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	32
II- Préparation et évaluation de l'antigène marqué à l'iode-125	33
II- 1- Radioprotection	33
II - 2- Contrôle de la pureté radiochimique de l'iodure de sodium(NaI125)	33
II- 3- Marquage de l'antigène 5 à l'iode-125.....	34
II- 3-1- <i>Marquage à la chloramine-T</i>	34
II-4-Purification et contrôle de l'antigène marqué à l'iode-125	35
III-4- 1- <i>Purification de l'antigène marqué</i>	35
III- 4-1-1- <i>Préparation de la colonne</i>	35
III- 4-1-2- <i>Purification proprement dite de l'antigène marqué</i>	35
III- 4-2- <i>Evaluation de l'antigène marqué</i>	37
III- 4-2-1- <i>Activité spécifique</i>	37
III- 4-2-2- <i>Activité volumique</i>	37
III- 4-2-3- <i>Détermination de la pureté radiochimique du traceur</i>	37
III- 4-2-4- <i>Contrôle de l'immunoréactivité</i>	37
III - Matériel utilisé	39
RESULTATS ET DISCUSSIONS	41
CONCLUSION	73
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	74
ANNEXE	80

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'hydatidose est une maladie parasitaire cosmopolite due au développement chez les herbivores et l'homme d'une forme kystique (kyste hydatique) remplie de liquide : « liquide hydatique ». Cette maladie s'observe avec une plus grande fréquence dans les pays d'élevage de bétails où elle constitue un véritable problème de santé publique, économique et épidémiologique.

En effet, le diagnostic biologique de cette maladie trouve de nombreuses contraintes lors de la détection des anticorps hydatiques. Ceci est dû à plusieurs facteurs tels que le manque de stimulation lié à la localisation et à l'état physiologique du kyste hydatique et ainsi à la nature de l'antigène utilisé lors des tests sérologiques.

Le choix d'une technique utilisant un antigène reconnu spécifiquement par une grande proportion de sérums humains hydatiques et qui soit aussi sensible par l'emploi d'un traceur radioactif permet d'établir un diagnostic précoce de cette maladie afin de prescrire son traitement.

Le liquide hydatique qui est un déchet biologique d'origine humaine et animale, constitue une bonne source d'antigène parasitaire à usage diagnostique [1, 2]. Parmi cette mosaïque antigénique, on retrouve l'antigène 5, reconnu comme étant la fraction majeure et la plus immunogène de ce liquide, qui a toujours prouvé son importance dans le diagnostic de la maladie hydatique.

Le présent travail a pour objectif la valorisation de ce déchet biologique en vue d'extraire cet antigène 5 qui va servir à la préparation d'un traceur radioactif à savoir l'antigène 5 marqué à l'iode 125. Ce traceur pourrait être utilisé ensuite lors d'un dosage radioimmunologique (RIA) qui sera développé pour l'obtention d'une meilleure sensibilité par rapport aux techniques déjà employées.

Pour se faire, nous avons été menés :

- Dans un premier temps, à la récolte des kystes hydatiques humains et animaux du service thoracique de l'hôpital Mustapha et du service vétérinaire de l'abattoir de ruisseau.
- A la purification et à la caractérisation partielle de l'antigène 5 extrait du liquide hydatique ;
- A la réalisation des essais préliminaires de marquage de cet antigène 5 à l'iode 125;
- Et enfin à l'évaluation du traceur radioactif obtenu.

GENERALITES

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

A- L'HYDATIDOSE

I- Epidémiologie

I- 1- Définition

L'hydatidose est une maladie parasitaire potentiellement mortelle provoquée par l'ingestion d'œufs du parasite provenant du chien « Echinococcus granulosus ». L'homme est un hôte accidentel dans ce cycle biologique et constitue ainsi une impasse parasitaire.

I- 2- Morphologie du parasite [3, 4, 5, 6,7]

Le taenia Echinococcus granulosus est un cestode de la famille des plathelminthes, il existe 3 formes:

I-2-1- Forme adulte

Echinococcus granulosus est un petit ténia composé d'un scolex, cou et un strobile (corps). Il mesure entre 3 à 8mm de long (Figure 1). La tête ou le scolex est périforme subglobuleux de 300µm de diamètre portant 4 ventouses et une couronne de crochets. Le strobile est formé d'une chaîne d'anneaux au nombre de 3 à 4 avec un pore génital à l'extrémité postérieure de l'anneau, des testicules (45 à 65), un ovaire réniforme à concavité postérieure et un utérus, mais seul le dernier segment de la chaîne est gravide (comporte les œufs).



Figure 1 : forme adulte

I-2-2- Forme ovulaire

E. granulosus étant hermaphrodite, la ponte ovulaire s'effectuera après autofécondation ou fécondation croisée. Les embryophores d'E.granulosus sont légèrement ovoïdes, mesurant 38 µm de long sur 35 µm de large (32µm de long sur 36µm de large pour Brumpt). Ils contiennent un embryon hexacanthé et présentent une membrane interne épaisse et striée transversalement et une membrane externe mince (Figure 2) [8].

Les œufs d'E.granulosus peuvent survivre dans l'eau ou sur le sol humide pendant 30 semaines à 30°C, 25 jours à 60°C et 32 jours à des températures comprises entre 10 et 21°C [9].

Ils sont détruits par dessiccation en quelques heures et en quelques instants à une température supérieures à 60°C mais peuvent résister à des agents chimiques usuels comme l'engrais et les désinfectants. De plus, ces œufs peuvent aussi être dispersé facilement sur de plus grandes distances par les pattes des animaux, la pluie, les arthropodes, les oiseaux charognards, ce qui constitue un temps essentiel de l'épidémiologie de la parasitose.



Figure 2 : forme ovulaire

I-2-3- Forme larvaire (kyste hydatique)

Cette forme est encore appelée **kyste Hydatique** ou hydatide, elle est typiquement uniloculaire, sub sphérique. Cette forme est délimitée par deux membranes, remplies d'un liquide hydatique où baignent les vésicules et entourées d'une réaction fibreuse du tissu hôte [53].

I- 3- Structure du kyste hydatique

La structure du kyste hydatique est identique chez l'homme et chez l'animal. Il est formé de l'extérieur vers l'intérieur par (Figure 3) :

a) Membrane périkystique

C'est une membrane formée lors de la réaction cellulaire inflammatoire de l'hôte, qui débute dès les 1^{ers} stades du développement parasitaire. Son épaisseur varie selon les hôtes et chez l'homme selon les localisations.

Cette membrane n'est pas une barrière totalement infranchissable, et c'est à travers elle que s'effectue notamment les échanges nutritifs entre l'hôte et le parasite. En vieillissant cette adventice peut même s'imprégner de calcium sans que, pour cela, le kyste soit mort.

b) Membrane anhiste ou cuticule

C'est une paroi externe de 1 à 2 mm d'épaisseur, de nature mucopolysaccharidique complexe, lipidique et protéique. Elle est la paroi propre du kyste, de structure lamellaire et est dépourvue de toute cellule. Le rôle mécanique de cette membrane est : [10].

- D'assurer l'échange avec l'hôte
- De donner la résistance au kyste hydatique
- De supporter parfois des pressions intra-kystiques considérables

c) Membrane prolifère ou germinative

Elle peut être assimilée au tégument du parasite. Elle est blanche, souple de 10 à 25 µm d'épaisseur, riche en acides aminés, constituée principalement de cellules arrondies, riche en lipides et qui génèrent des vésicules prolifères et protoscolex et également de cellule étoilées contenant du glycogène.

Les vésicules filles exogènes se forment aussi à partir de fragments de ces membranes, dans l'épaisseur de la cuticule et gagnant progressivement l'adventice.

Malgré son extrême finesse, cette membrane permet de :

- Réguler la totalité des échanges du kyste
- Limiter aussi un liquide sous tension riche en antigènes.

d) Liquide hydatique [11]

Qui remplit le kyste, il est normalement limpide, « eau de roche ». Il est composé de plusieurs constituants ; électrolyte, acides nucléiques, sucres, lipides, protéine notamment les enzymes et les déchets azotés. Parmi plus de 20 protéines séparées électrophorétiquement, 2 ont été définies chimiquement [12] car elles comportent des antigènes majeurs, d'importance diagnostique [13]:

- Une lipoglycoprotéine thermolabile [14] appelée l'antigène 5

- Une lipoprotéine thermostable appelée l'antigène B [15, 16, 17, 18]

Le liquide hydatique se caractérise par :

- Une densité entre 1.007 et 1.015
- Une concentration de 6 à 8 g/l en NaCl
- Divers sels de sodium et de calcium
- Glucose
- Acides aminés
- Phospholipides
- Environ 7.5 mg de protéines (albumine, alpha, bêta et gamma globuline) provenant soit de l'hôte et constituent alors une partie d'anticorps, soit du parasite.

Vue la composition chimique importante de ce liquide hydatique, ce dernier peut présenter les rôles suivants [10]:

- Transport des déchets du métabolisme
- Mobilisation des réserves et sans doute d'autres fonctions mettant en jeu des substances dissoutes dans le liquide
- Assurer la nutrition des tissus parasites à partir des substances filtrées par la membrane proligère

e) Sable hydatique

Les éléments figurés contenus dans les kystes sont regroupés sous le nom « sable hydatique » car ils se déposent rapidement au fond d'un récipient lors de la décantation du liquide hydatique. Ils sont constitués de deux types d'éléments :

Capsules proligères : Bourgeonnement à partir de la membrane germinative donnant des vésicules de 300 à 500µm fixés à la membrane proligère par une mince membrane hyaline et qui à leur tour se creusent secondairement pour renfermer des protoscolex.

Ces capsules peuvent se détacher et flotter dans le liquide hydatique ou alors leur membrane externe se rompt et libère les protoscolex.

Protoscolex : Ces protoscolex se développent chez l'hôte définitif à un ténia adulte par strobilation [19]. C'est une tête invaginée avec 4 ventouses et une double couronne de crochets mesurant environ 100 à 200 µm de diamètre.

Un protoscolex peut subir une vésiculisation donnant naissance à des vésicules filles endogènes entourées d'une cuticule externe et formant de nouveaux protoscolex. Ces vésicules peuvent, par rupture du kyste, se libérer et se fixer dans d'autres localisations « Echinococcose secondaire ».

L'hydatide survie et résiste différemment en fonction des conditions climatiques qui sont imposées. Ainsi à +4°C la survie est de 80 jours, entre -2°C et +2°C, la survie est de 10 jours, 5 jours entre -5°C et 12°C, 4 jours entre +10°C et 15°C. Elle est enfin de 2 jours entre +2°C et 22°C.

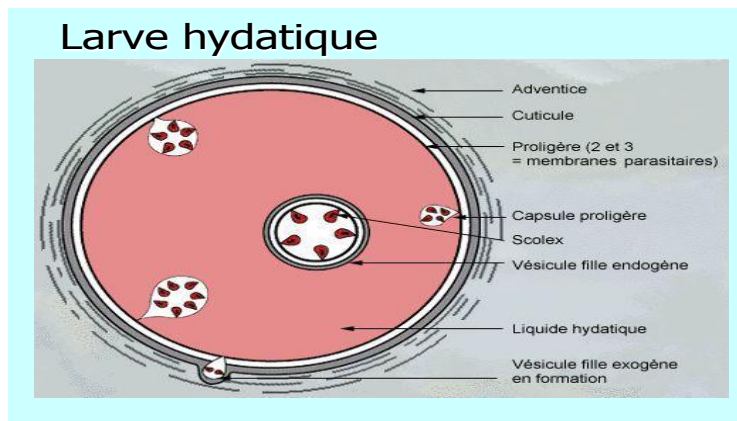


Figure 3 : forme larvaire

I-4- Reproduction

I-4-1- Reproduction sexuée

Cette reproduction sexuée s'effectue chez le tænia adulte hébergé par l'hôte définitif. Le genre *E.granulosus* existe sous forme d'un complexe de variants avec les différentes caractéristiques biologiques et génétiques [20]. En plus de l'hermaphrodisme, deux modèles d'insémination sont utilisés pour expliquer l'origine de ce phénomène ; le premier implique la fécondation croisée [21] et l'autre une autofécondation [20, 22].

Cette dernière peut se faire soit dans le même proglottis (type 1) ou entre 2(type 2) [23]. Pour ce deuxième type, l'autofécondation est rarement réalisée vu que le stade de maturation n'est pas toujours le même pour deux proglottis [23].

Leucart a rapporté qu'*E.granulosus* est toujours en mouvement de copulation. Ce dernier se fait par introduction du cirre activé par la sécrétion intestinale dans le vagin adjacent du même proglottis [23].

Lymbery et al. [24] ont remarqué aussi qu'au niveau de l'intestin de l'hôte définitif, les vers adultes pourraient se rassembler entre eux après une attraction et par conséquent, cela peut activer la fécondation croisée [5].

I-4-2- Reproduction asexuée

Contrairement à la précédente, celle-ci s'effectue chez l'hôte intermédiaire hébergeant la forme larvaire. En effet, l'hydatide a une capacité génératrice potentiellement illimitée.

Ce sont les cellules germinales qui initient la production de nouvelles capsules prolifères [5] et qu'à l'intérieur de ces dernières, une répétition de processus de bourgeonnement asexué s'effectue, menant ainsi à la production de nombreux protoscolex.

I-5- Répartition géographique

I-5-1- Hydatidose dans le monde

L'hydatidose est largement répandue dans le monde, incluant l'Europe, Asie, Afrique, Nouvelle-Zélande, Australie et Amérique (Nord, Sud et centre) et surtout dans les régions d'élevage particulièrement celles où les grands troupeaux de moutons sont gardés par des chiens.

En générale, la distribution d'*E. granulosus* est influencée par beaucoup de facteurs (agricoles, économiques, niveaux d'éducation, habitudes sociales ou culturelles etc.....), mais elle est habituellement liée au degré d'association des individus avec leur bétail, leur chien et la mauvaise hygiène (spécialement dans les régions rurales).

I-5-2- Hydatidose en Algérie [25, 26]

E. granulosus a été découvert pour la première fois en Algérie en 1951 par Senevet, en faisant des examens d'autopsie sur des chiens dont la moitié d'entre eux était positif en zones rurales. Depuis, des études épidémiologiques se sont succédés et ont montré que l'Algérie, pays d'élevage, pastoral est un pays de haute endémie hydatique.

I-6- Cycle évolutif [27]

Le *tænia Echinococcus granulosus* est un cestode de la famille des plathelminthes. Il se présente sous trois formes : l'adulte qui vit fixé entre les villosités de l'intestin grêle de l'hôte définitif, l'œuf qui contient un embryon hexacanthé à six crochets et la larve ou kyste hydatique.

Le cycle parasitaire Figure 4(a) comprend deux hôtes [28, 29]: un hôte définitif (HD) et un hôte intermédiaire (HI). Le cycle classique est le cycle domestique : chien (HD) - mouton (HI).

L'homme s'insère accidentellement dans le cycle du parasite : c'est une impasse parasitaire.

Les œufs embryonnés, éliminés dans le milieu extérieur avec les selles du chien, sont ingérés, pénètrent la paroi digestive, gagnent par le système porte le foie, parfois dépassent le foie par les veines sus-hépatiques et parviennent aux poumons. Plus rarement, la localisation peut se faire en n'importe quel point de l'organisme par la circulation générale [30]. Une fois dans le viscère, l'embryon se transforme en larve hydatide. Le cycle est fermé lorsque le chien dévore les viscères (foie, poumons) des moutons parasités. L'homme se contamine en ingérant les œufs par voie directe (chien : léchage, caresses), plus rarement par voie indirecte (eau, fruits, légumes souillés par les œufs) Figure 4(b).

II-Immunité [31]

Chez l'homme, la protection après l'infection primaire est à médiation humorale et cellulaire. La réponse initiale se déroule contre les œufs embryonnés. La membrane et la capsule contribuent à la protection de l'hydatide.

Plusieurs protéines sécrétées et membranaires du parasite constituent des cibles potentielles pour le diagnostic, le traitement et la vaccination. L'obstacle actuel réside quant à leur grande variabilité. Il existe une grande diversité génétique de l'échinococcus granulosus démontrée par l'analyse de l'ADN mitochondrial et des gènes codant pour les protéines en particulier la famille de l'antigène B [32, 33, 34].

La réponse immunitaire est essentiellement associée à la localisation des kystes, leur nombre, leur taille et ainsi que leur état physiologique. Elle dépend aussi largement du contact du parasite avec les tissus, et la nature même de ces derniers.

En effet l'échinococcose hépatique et pulmonaire induit des réponses beaucoup plus importantes par rapport à d'autres organes (rate, rein, péricarde, cerveau et os) [35].

Les anticorps spécifiques impliqués dans ces réactions appartiennent à la classe des IgM, IgA, IgE et les IgG notamment les IgG1 et les IgG4 (IgG4 reconnu par les sous unités 20, 16, et 12 KDa de l'antigène B et IgG1 par la sous unité 38 KDa de l'antigène 5) [36, 37].

Les IgA et IgM se présente ainsi à des niveaux très élevés dans le cas de l'hydatidose pulmonaire [38, 39, 40] .

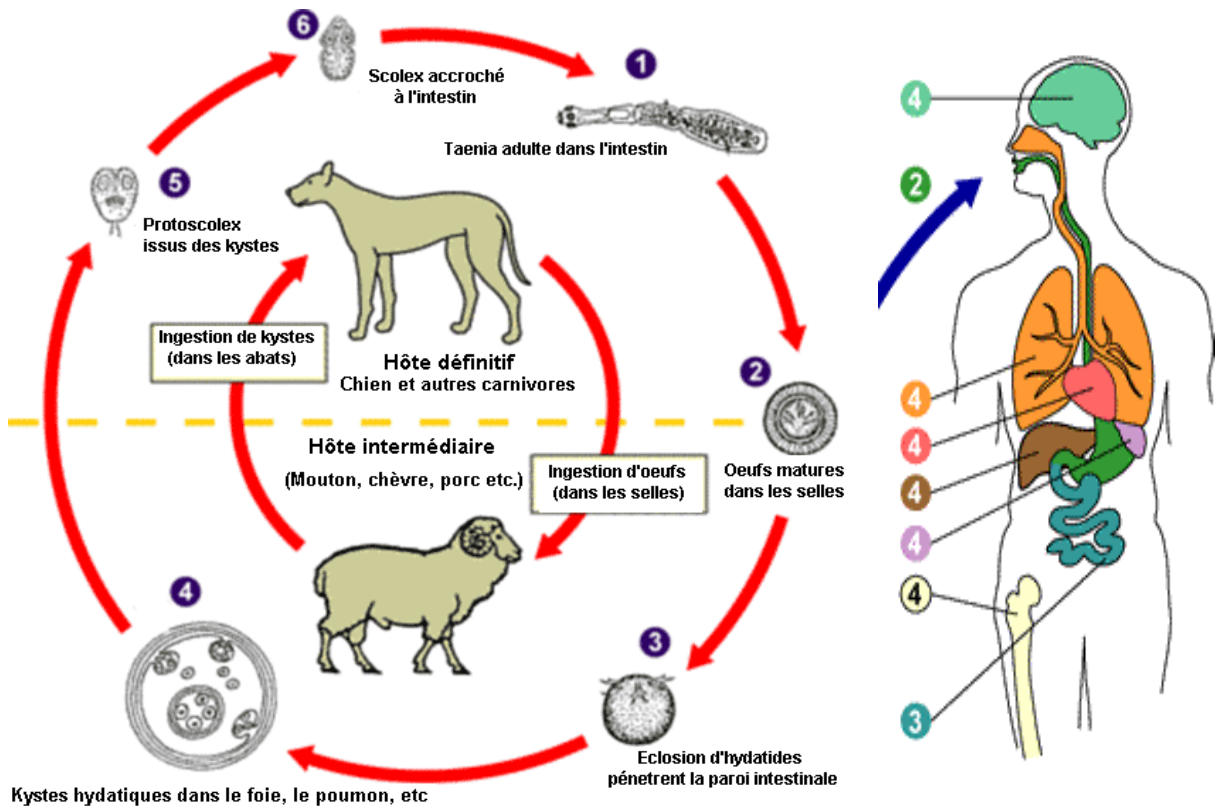


Figure 4(a) : Cycle de vie d'Echinococcus granulosus

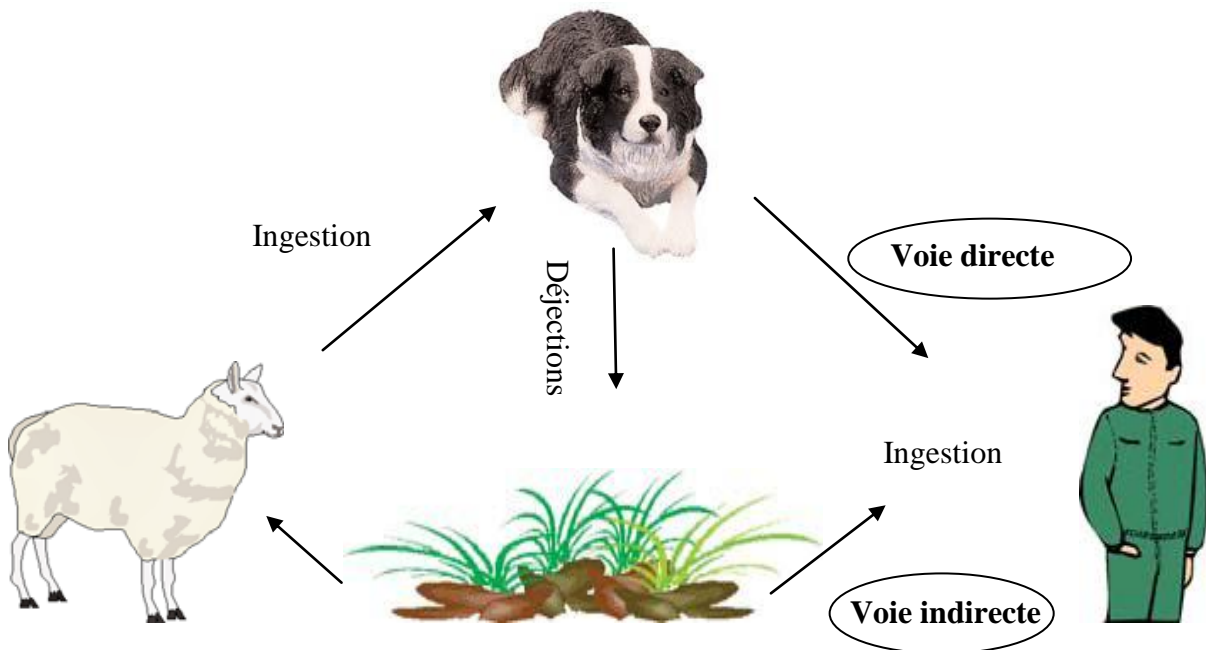


Figure 4(b) : contamination de l'homme

Des travaux de Touil.C. [41, 42] ont montré que ce processus de défense immunitaire anti *E. granulosus* faisant intervenir des cellules immunocompétentes (lymphocytes T, Macrophages, monocytes et lymphocytes B). Ces dernières sont régulées par des cytokines notamment l'interféron type α/β , TNF_α et IL_6 [42].

Rigano et coll, 1995_b, [43] ont détecté au niveau des sérums de malades qui n'ont pas répondu au traitement par l'albendazole et mebendazole, une forte production d' IL_4 et IL_{10} suivi d'une synthèse des IgG_4 et IgE régulée par l' IL_4 [43, 44, 45].

D'autres études ont révélé aussi l'existence d'une corrélation entre la production des cytokines (IFN et IL_6) et le mono-oxyde d'azote (NO), molécule impliquée dans le mécanisme de défense de l'hôte contre le parasite, après l'intervention de l'antigène majeur de l'hydatidose dans l'induction des cytokines et d'une enzyme qui est la NO synthase.

III- Symptomatologie clinique [46, 47]

L'hydatidose est caractérisée par la lenteur de son évolution et par son allure insidieuse. Elle reste asymptomatique pendant de nombreuses années. Elle est bien souvent découverte à l'occasion d'une radiographie systématique ou d'une complication. La symptomatologie, lorsqu'elle existe, dépend de la localisation.

III -1- Hydatidose hépatique

La plus fréquente : 60-70 % des cas, souvent multiple (30 %), parfois associée à d'autres localisations, en particulier pulmonaires : 10 %

Le kyste hydatique évolue souvent pendant plusieurs années (3 à 10 ans) avant que les manifestations cliniques apparaissent (fièvre, des douleurs et des poussées urticaire). Il est découvert lors d'un examen systématique ou à l'occasion de manifestations allergiques (urticaires).

La rupture dans le péritoine ainsi que la ponction hépatique qui est formellement contre-indiquée présentent des risques de dissémination des protoscolex, d'échinococcose secondaire et des risques de choc anaphylactique.

III -2- Hydatidose pulmonaire [48]

Elle se rencontre dans 15 à 20% des cas. Elle est souvent latente, découverte lors d'un examen radiographique systématique

Les manifestations cliniques (dyspnée, gêne respiratoire, toux d'irritation, douleurs intrathoraciques parfois) apparaissent en général plus précocement que dans le cas de l'hydatidose hépatique. La rupture du kyste provoque une vomique de liquide clair et salé, avec débris parasitaires.

III -3- Autres localisations (rares) [49, 50]

Le syndrome tumoral se révèle précocement dans la localisation cérébrale ou oculaire par contre l'absence réactionnelle de l'os laisse le plus souvent évoluer l'hydatide de façon envahissante provoquant des fractures pathologiques spontanées. Dans ces cas là, le kyste ne prend pas la forme classique d'un kyste sphérique liquidien et son aspect est pseudo-tumoral et rameux

IV- Diagnostic biologique [51]

Toute suspicion (épidémiologique, clinique, radiologique) de nature hydatique d'une tumeur demande à être confirmé par une investigation biologique.

IV- 1- Diagnostic indirect : de présomption (avant l'intervention chirurgicale)

IV-1-1- Non spécifique :

La phase d'invasion et d'installation de cette maladie larvaire provoque très certainement une hyperéosinophilie sanguine élevée. Cependant l'absence habituelle de manifestation pathologique d'appel enlève toute sa valeur diagnostique.

A la phase de kyste hydatique constitué, ce signe biologique passe à la normale comportant à la rigueur une fluctuation liée au degré de fissuration de la paroi kystique.

IV-1-2- Spécifique

La sérologie, associée aux signes cliniques et aux techniques d'imagerie [52, 53], a beaucoup de valeur pour le diagnostic de l'hydatidose avant l'intervention chirurgicale [54].

Les méthodes utilisées sont nombreuses (Tableau 1):

- certaines sont sensibles, utilisées comme test de dépistage : immunofluorescence indirecte, hémagglutination indirecte, ELISA.
- d'autres sont plus spécifiques : électrosynérèse, immunoélectrophorèse avec identification d'un arc spécifique (l'arc 5) et maintenant western blot, ces dernières étant utilisées comme techniques de confirmation.

Généralités

- Ces tests (en général au moins deux de dépistage) permettent le diagnostic de la majorité des cas d'hydatidose hépatique (90%) (Sauf les kystes morts ou avec une paroi très épaisse et calcifiée).
- Ils sont au moins constamment positifs dans les autres localisations, en particulier pulmonaires (65%) et osseux (30%).

La surveillance sérologique post-opératoire montre, après une ascension du titre des anticorps dans les 4 à 6 semaines après l'intervention chirurgicale, leur disparition en plusieurs mois (jusqu'à 5 ans) si la cure a été complète. Leur augmentation secondaire doit faire suspecter une récurrence du kyste.

Tableau 1 : Les différentes réactions immunologiques mettant en jeu des antigènes figurés ou solubles

Techniques	Sensibilité et spécificité	Seuil de positivité	Avantages	Inconvénient
LA	- Sensible à 80% - Non spécifique	$\frac{1}{4}$	Méthode simple	Manque de spécificité
HAP	- Sensible à 83% - Spécifique	$\frac{1}{160}$	- Simple - Rapide	Etapes de sensibilisation des hématies très délicate
IDD	- Spécificité à 96% - Sensible à 65%	-	Simple	- Individualisation insuffisante des arcs
IEP	- Très spécifique - Sensible	-	Facile à exécuter	- Consomme trop d'Ag et Ac - Délai de réponse long
Électrosynérèse	- Très sensible - Spécifique	-	- Rapide (3 à 5 h) - Consomme peu d'Ag et d'Ac	-
ELISA	- Sensible : 88-98% - Spécificité dépend de la qualité de l'antigène	-	Nécessite de faibles quantités d'Ag et de sérum	Faux réactions en cas d'excès d'antigène
Western-blot	- Spécifique - Sensible	-	Élimine les faux positifs et les faux négatifs	Technique longue
IFI	- Sensible - Spécifique	$\frac{1}{10}$ au $\frac{1}{40}$	- Rapide - Facile	Lecture difficile

IV- 2- Diagnostic direct : diagnostic de certitude

IV- 2-1- Analyse de vomique ou de ponction d'un kyste hydatique

L'examen microscopique direct sur le liquide contenu dans le kyste permet d'affirmer le diagnostic, en mettant en évidence des débris de membrane lamellaire, des crochets ou des protoscolex entiers. Cet examen direct permet de déterminer la vitalité éventuelle des protoscolex.

IV- 2-2- Analyse d'une pièce d'exérèse

L'examen macroscopique du kyste permet d'apprécier sa taille, l'épaisseur de la paroi kystique et l'état des membranes parasitaires : blanchâtres ou d'aspect pseudo-gélatineux.

V- Traitement

V-1-Chirurgical (essentiellement)

Il faut enlever le kyste le plus complètement possible et éviter tout essaimage parasite au cours de l'intervention. L'idéal est d'enlever le kyste sans l'ouvrir.

Si le volume du kyste ou l'importance de ses rapports anatomiques l'interdit, il faut le stériliser au préalable en injectant de l'alcool à 95° (ou une solution salée hypertonique, ou de l'eau oxygénée) avant de l'ouvrir pour évacuer les éléments parasitaires (technique PAIR : ponction, aspiration, injection, ré-aspiration).

Une échographie de contrôle et une sérologie de contrôle sont à faire tous les trois mois pendant la première année suivant l'opération avec un contrôle à deux ans.

V-2-Médical (parfois) [55]

Le traitement médical seul est indiqué quand :

- L'état général ou cardiaque obligeant à différer l'intervention chirurgicale
- Les kystes sont inopérables (osseux, kystes multiples...)
- Il y a rupture préopératoire du kyste, en prévention d'une échinococcose secondaire.
- Il y a récurrence après cure chirurgicale.

Actuellement, on utilise surtout un dérivé imidazolé, l'albendazole (Eskazole®) à la dose de 10 à 12 mg/kg en 2 prises, par cure de 30 jours séparées de 15 jours. Le praziquantel a aussi été utilisé en monothérapie. Il semble que la combinaison avec l'albendazole donne de meilleurs résultats [48, 56, 57]. L'oxfendazole testé sur des modèles animaux est en cours d'évaluation [48]. L'efficacité du traitement est souvent difficile à juger nécessitant un suivi

régulier [48]. Le drainage percutané réalisable pour les KH hépatiques n'est pas indiqué vu les risques potentiels [58].

L'efficacité de cette thérapeutique dépend de la taille et de la localisation des kystes, les meilleurs résultats étant observés pour des kystes de petite taille à localisation hépatique.

VI- Prophylaxie [50]

L'hydatidose ne peut disparaître que grâce à des mesures prophylactiques strictes visant essentiellement à provoquer une rupture du cycle de vie du parasite afin d'empêcher tout risque de dissémination de l'infection dans l'environnement. Parmi les stratégies de prévention :

- Formation et information : Risques liés à l'hydatidose, hygiène, mesures collectives et individuelles de prévention.
- surveillance de l'abattage des animaux de boucherie,
- Abattage des chiens errants
- traitement des chiens domestiques par praziquantel (DRONCIT®), avec récupération et élimination des déjections (enfouissement).
- prudence dans les contacts homme chien (léchage, caresses, ...)
- Ne pas nourrir les chiens avec des viscères portant des kystes(contrôle des décharges).
- Destruction des kystes hydatiques par incinération ou enfouissement profond.
- Valorisation du kyste hydatique qui semble être un déchet intéressant sur le plan nutritionnel et industriel car il constitue une bonne source d'acides aminés, d'enzymes et de minéraux [59]. Il présente aussi un intérêt sur le plan diagnostique vue sa composition en antigènes parasitaires qui peuvent être largement utilisés dans le diagnostic de la maladie hydatique.

B- MARQUAGES RADIOACTIF DES PROTEINES

I- Définition d'une molécule marquée

Il a été désigné toujours sous le nom de « molécules marquées » des composés organiques ou inorganiques de synthèse ou d'origine biologique dans lesquels on a introduit un ou plusieurs atomes radioactifs.

Les molécules marquées utilisées en médecine nucléaire sont très souvent composées de deux parties, le radionucléide marqueur, émetteur gamma, étant généralement accroché en tant qu'hétéro atome à une substance vectrice dite « vecteur ».

La Médecine Nucléaire utilise une large gamme de molécules de structures chimiques très différentes : des ions, des complexes métalliques, des traceurs biologiques, des protéines ou des colloïdes.

II-Marqueur radioactif

Le choix du radioisotope dépend de nombreux paramètres : nature de l'isotope (émission gamma, demi-vie, encombrement stérique), nature du substrat, mise en œuvre de la réaction de marquage.

Les émetteurs gamma utilisés en clinique se rattachent à deux classes chimiques [60]:

- Les halogènes inclus au substrat organique par une liaison covalente : iode, fluor.
- Les métaux de transition et de post-transition polycoordonnés liés aux vecteurs sous forme de complexe et qui forment plusieurs liaisons métal-ligand : technétium, indium, rhénium et samarium.

Les principaux radioisotopes disponibles pour le marquage de substances destinées à la mise au point des techniques de radiodosages sont le tritium (^3H), le carbone (^{14}C), l'iode-125 (^{125}I) et l'iode-131 (^{131}I).

Les isotopes radioactifs de l'iode sont utilisés pour marquer de nombreuses molécules ayant un grand intérêt en médecine nucléaire [61]: peptides, protéines, acides nucléiques et même de membranes cellulaires (Tableau2).

Tableau 2 : Principaux radioisotopes de l'iode [61]

Radioéléments	Période radioactiveT	Emission gamma(Kev)	Applications
Iode 131	8,02 jours	364	Diagnostic et Thérapie
Iode 125	60 jours	35	Mise au point des marquages Test in vitro, Thérapie
Iode 123	13,3 heures	159	Diagnostic

L'iode 125 est actuellement le radioisotope le plus utilisé en diagnostic in vitro, grâce aux critères suivants :

- Peut être facilement introduit dans les molécules peptidiques.
- La fixation de l'iode au substrat organique modifiant peu la structure de la molécule du fait du faible encombrement stérique.

- période ou demi vie relativement longue, ce qui permet d'obtenir des traceurs ayant une durée de vie assez longue, évitant ainsi des marquages trop fréquents.
- Activité spécifique élevée (17mCi/ μ g), pouvant être utilisé à l'état de traces.
- Peut être obtenu avec une abondance isotopique supérieure à 99%, ce qui rend efficace le comptage de la radioactivité
- Emission de rayonnement gamma (γ), facilement détectable, permet l'utilisation d'un équipement simple et de moindre coût.
- Les traceurs marqués à l'iode 125 sont plus stables que ceux marqués à l'iode 131, ceci est dû à l'absence de rayonnement bêta (β).
- Contraintes de radioprotection minimisées (irradiation faible, stockage des déchets en décroissance) [62].

III- Marquage des protéines à l'iode radioactif

III -1- Conditions de marquage

La méthode de marquage doit répondre à plusieurs conditions :

- conservation de l'activité immunologique et biologique de la protéine,
- obtention d'un composé marqué à forte activité spécifique,
- opération dans des conditions aussi douces que possible.

III -2 - Méthodes de marquage à l'iode radioactif

La chimie de marquage à l'iode des protéines s'est considérablement développée ces dernières années. Le choix de la réaction de marquage des peptides va dépendre de leur taille, de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques et de la présence de groupements réactifs. On distingue les réactions par voie directe où l'iode radioactif est fixé directement sur la molécule biologiquement active par liaison covalente, et la méthode dite "indirecte" : le radiomarquage est réalisé par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique [61].

III -2- 1- Marquage par voie directe

L'iodation directe d'une protéine ou d'un peptide peut être réalisée par substitution électrophile de l'iode I(0) ou I(+I) sur un noyau tyrosyle ou histidyle [64, 65, 66, 67]. L'iode étant essentiellement fourni sous forme d'iodure de sodium NaI^{125} [^{125}I , ^{131}I , ^{123}I], l'oxydation des ions iodures est nécessaire [61, 68].

Trois méthodes d'oxydations peuvent être utilisées : méthode chimique, méthode enzymatique et méthode électrochimique. Le choix de l'oxydation devra être adapté aux conditions de la réaction et aux substrats [68].

III -2- 1-1- Méthode chimique

a) Oxydation par la chloramine T

En milieu acide des iodures sont oxydés en mono-chlorure d'iode. L'iodation par la chloramine-T (N-chloro-p-toluène sulfonamide) est la méthode de choix pour de nombreux composés contenant des résidus tyrosyles dont les peptides, protéines et anticorps [69]. Simple, facile, peu coûteuse, elle est réalisée par simple addition de la chloramine T et de l'iodure de sodium radioactif (NaI^{125}) en présence du substrat puis incubation à température ambiante.

La réaction est rapide et complète, avec une bonne activité spécifique du produit marqué [69].

La réaction peut être réalisée en milieu acide, neutre ou basique, bien que la méthode utilisée généralement se déroule dans un tampon basique à température ambiante.

La réaction peut s'effectuer par oxydation contrôlée sans ajout de réducteur, c'est à dire jusqu'à épuisement de la chloramine-T. Elle peut être stoppée par adjonction d'un réducteur, généralement du pyrosulfite de sodium qui inactive l'agent oxydant et réduit I^+ non substitué en I^- [60, 70, 71, 72]. On utilisera de l'iode en absence de porteur (iode froid) pour minimiser le nombre d'iodes fixés sur la molécule et éviter d'altérer les propriétés de la molécule native.

Le rendement de marquage va être fonction de la nature du substrat (nombre de résidus tyrosines pour les protéines), de la quantité de chloramine-T et du temps de réaction :

- Les petites molécules ($\text{PM} < 50 \text{ kDa}$) incorporent 1 atome d'iode ; si le poids moléculaire est supérieur à 150 kD (plusieurs résidus tyrosine) elles incorporent plus de deux atomes.
- La radioiodination est d'autant plus efficace que le volume de la réaction est faible, en général on travaille dans un volume inférieur à 100 μL et au maximum de 2 mL.
- Le taux d'incorporation est proportionnel à la quantité de chloramine-T utilisée ; le rapport chloramine-T/ protéine doit être défini pour chaque molécule. Il doit être aussi élevé que possible pour augmenter le rendement de marquage sans dénaturer la molécule. Toutefois les conditions d'oxydation sont drastiques et provoquent de nombreuses réactions parasites parmi lesquelles :
 - Des réactions de chloration (formation de chloroamide) .
 - Oxydation des thiols et des thioéthers .

- Clivage des groupements tryptophaniques des peptides.
- Dissociation des sous unités, conduisant à l'apparition de nouveaux déterminants antigéniques [73] et donc perte de l'activité immunologique des protéines.

Par ailleurs, la réduction par le métabisulfite de sodium induit des groupements SH qui modifient la structure native de certaines protéines [74].

Néanmoins ces problèmes peuvent être résolus en utilisant la chloramine-T à faible concentration ou en diminuant le temps de contact et en ajoutant un réducteur qui stoppe la réaction [63, 69]; dans ces conditions la réaction est certes plus lente mais les produits radiomarqués sont de meilleure qualité.

b) L'Iodobeads

L'Iodobeads TM (PIERCE) correspond à de la chloramine-T liée sur un support solide (bille). La réaction est effectuée à température ambiante et le rendement de marquage est excellent (>95%). Cette technique est utilisée pour marquer de petites quantités de peptide ; l'agent oxydant greffé sur bille de polystyrène est éliminé à la fin de la réaction par simple filtration. Les billes peuvent être conservées au froid pendant 6 mois avant utilisation [66].

c) L'Iodogen

Cette méthode a été introduite pour réduire d'avantage les dommages causés aux protéines lors de leur marquage par des procédés classiques [75].

L'iodogen (1,3,4,6 tétrachloro-3 al-pha,6 alpha-diphénylglycolurile) est un agent oxydant insoluble dans l'eau inspiré de la chloramine-T mais comportant 4 sites actifs [76]. Il est déposé sous forme de film solide sur la paroi d'un flacon de verre. On introduit le peptide et l'iode radioactif en présence d'un tampon basique ou tampon borate à 0-2 °C ; la réaction se déroule sur une période de 5 à 10 minutes environ [77]. En fin de réaction, on recueille la phase aqueuse ou on sépare par filtration, ce qui limite le contact entre l'agent oxydant et le peptide.

Cette technique est plus douce que la chloramine-T mais les rendements sont plus faibles car la réaction a lieu en surface donc un côté de la chaîne protéique n'est pas accessible.

L'application la plus importante de cette méthode est le marquage des protéines, facilité par le fait que de nombreuses protéines sont solubles dans l'eau.

Les inconvénients sont les risques d'oxydation et la présence d'une impureté radioiodée provenant de l'iodogen lui même [77].

d) N-chlorosuccinimide

Agent oxydant comparable à la chloramine-T mais son action est insensible au pH, ce qui facilite certains protocoles. Il est moins dénaturant que la chloramine-T.

III -2- 1-2- Méthode enzymatique

Oxydation à la lactopéroxydase [78]

L'oxydation des ions iodures peut également impliquer des méthodes enzymatiques. C'est en 1971 que Thorell et Johansson [79] préconisèrent l'utilisation de la lactoperoxydase et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pour l'iodation des substances sensibles aux agents chimiques d'oxydoréduction.

Méthode enzymatique qui permet une iodation sans entraîneur [80] à faible activité spécifique. Cette méthode a été développée pour le marquage des protéines car elle est moins agressive et provoque moins de dégradation par oxydation des chaînes peptidiques que les autres méthodes. Le rendement de marquage approche celui de la chloramine-T et de l'iodogen [81].

III -2- 1-3- Oxydation électrochimique

La réaction d'oxydation de l'iode a lieu à l'anode. La protéine est dissoute dans la région de l'anode, l'iodure de sodium radioactif NaI^{125} et porteur NaI sont ensuite ajoutés à proximité de l'anode.

Cette méthode présente plusieurs avantages :

- Absence d'agent oxydant
- La proportion d' I_2 et donc l'incorporation d'iode peut être contrôlée par le courant dans la cellule électrochimique
- De grandes dilutions de solution NaI^{125} peuvent être utilisées
- La réaction a lieu dans une large gamme de pH (entre 6 et 8) et l'utilisation de solvants organiques est possible [68].

Différents facteurs vont influencer le rendement de marquage :

- Le temps de réaction, déterminé pour chaque protéine.
- La nature des solvants (qui par ailleurs vont jouer sur le temps de réaction).
- L'intensité du courant, déterminé pour chaque protéine. Si celui-ci est trop élevé, il provoque soit l'adsorption de protéines à la surface des électrodes soit une désiodation.

Conclusion

L'iodation directe compte tenu de sa simplicité constitue une méthode de choix. Elle possède cependant quelques inconvénients :

- Le contact avec des oxydants peut dégrader la molécule,
- L'attaque électrophile des groupes amides peut entrer en compétition avec la substitution des groupes aromatiques. Cette réaction conduit à un amide iodé sur l'azote, peu stable et qui se dégrade *in vivo* par hydrolyse,
- La réactivité de la protéine peut être insuffisante.

III -2- 2- Marquage par voie indirecte

Lorsque certaines molécules ne peuvent être iodées par voie directe du fait de leur faible réactivité vis-à-vis des halogènes, de l'absence de site d'halogénéation ou de sa proximité du site actif, de l'instabilité de l'iodation, il est alors nécessaire de fixer l'iode sur un groupement prosthétique bifonctionnel. Ce dernier doit posséder d'une part un site d'iodation permettant un marquage stable et d'autre part un site d'ancrage qui réagit avec les groupements NH₂ ou COOH de la molécule à marquer [60].

Les molécules à marquer sont généralement transformées pour contenir un groupe carboxyle qui se liera à la fonction amine libre de l'agent couplant. Le couplage est effectué s'il ne change pas trop la structure et les propriétés stéréospécifiques du groupe fonctionnel de la molécule originale; la position du couplage doit être aussi loin que possible du groupe fonctionnel. La lipophilie et l'encombrement de ces groupes doivent être faibles pour ne pas perturber les propriétés biologiques de la molécule.

IV- Caractérisation du traceur radioactif

Les réactions d'iodation peuvent entraîner des modifications structurales des molécules. Il est donc nécessaire d'évaluer l'intégrité biologique du traceur autrement dit sa qualité qui va conditionner les performances du dosage.

IV -1- Pureté radiochimique

C'est la proportion d'activité totale présente sous la forme désirée par rapport à l'activité totale. Cette pureté radiochimique conditionne la spécificité du dosage, influe sur la limite de détection (diminution de la liaison non spécifique) et l'exactitude des résultats (consommation d'anticorps par des molécules non marquées ou dégradées).

IV -2- Immunoréactivité

Le traceur radioactif doit conserver les mêmes propriétés biologiques et immunologique que le traceur froid pour qu'il puisse réagir spécifiquement avec son anticorps. Cette reconnaissance Ac-Ag- I¹²⁵ est vérifiée en estimant les pourcentages de fixation (B°/T, B/T).

B°/T : représente la liaison non spécifique (LNS).

B/T : représente la liaison spécifique.

IV -3- Activité spécifique (AS)

L'augmentation de l'activité spécifique du traceur conditionne directement la limite de détection du dosage.

L'addition de plusieurs atomes d'iode par molécule de substrat entraîne une augmentation des phénomènes de radiolyse et conduit souvent à une perte d'immunoréactivité. Un compromis qui diffère suivant chaque substrat, est à rechercher.

L'activité spécifique représente la proportion de molécules marquées par rapport à l'ensemble des molécules. Elle est exprimée en unité d'activité (Ci ou Bq) par unité de masse (g) ou mole. Cette activité spécifique dépend de la concentration en réactifs utilisés et du rendement de marquage.

$$AS(\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\text{Pourcentage d'incorporation d'I125} \times \text{Radioactivité totale } (\mu\text{Ci})}{\text{Masse de la protéine } (\mu\text{g})}$$

IV -4- Stabilité des molécules marquées

Durant le marquage et la conservation, différents facteurs sont responsable de la dégradation des traceurs radioiodés [82].

- La radiolyse : Les radiations et l'énergie déposée peuvent être la cause d'altérations structurelles qui conduisent à la formation de plusieurs formes chimiques.
- La perte d'iode peut être provoquée par l'oxygène, la chaleur, la lumière, les solvants et le pH.
- Les agents chimiques et les impuretés peuvent dégrader la molécule.

L'iode compte tenu de sa polarisabilité, est un groupe partant et peut être libéré par hydrolyse.

Au problème de stabilité des liaisons, s'ajoute la radiolyse primaire lorsque l'énergie émise par l'isotope rompt les liaisons intramoléculaires ou intermoléculaires C-X ou C-C

proches et induit ainsi la formation de radicaux libres, ou la radiolyse secondaire liés à la formation de radicaux libres à partir de la molécule mère ou de ses métabolites.

On peut diminuer cette radiolyse en :

- Diminuant l'activité spécifique (limitée à 74-185MBq/mg pour les anticorps).
- Diluant le traceur.
- Ajoutant les capteurs de radicaux : sérum albumine humain (SAH), éthanol, acide ascorbique.
- Conservant les produits à basse température (-80°C).
- Modifiant les conditions de pH.
- Purifiant la molécule.

C- METHODES UTILISEES POUR LA PURIFICATION ET LA CARACTERISATION DE L'ANTIGENE 5 ET DU TRACEUR RADIOACTIF

I- Dialyse

La dialyse est une méthode de purification basée sur la propriété qu'ont certaines molécules de traverser facilement une membrane semi-perméable. Cette dernière étant perméable à l'eau, aux électrolytes et aux micromolécules mais imperméable aux macromolécules dont la taille est supérieure à sa limite d'exclusion.

II- Précipitation au sulfate d'ammonium

Cette procédure est employée pour séparer une protéine d'intérêt des autres protéines contaminantes dans une solution contenant un mélange complexe de protéines. Elle consiste simplement à solubiliser une quantité de sulfate d'ammonium (SA) dans la solution dont on veut précipiter les protéines.

Les sels neutres agissent sur la solubilité des protéines globulaires. A fortes concentrations en sels et donc une force ionique élevée, la solubilité d'une protéine commence à diminuer et peut être complètement précipitée par capture de l'eau d'hydratation des protéines (salting-out).

L'avantage de cette technique, est qu'elle est réversible (permettant de resolubiliser les protéines) et permet de maximiser l'obtention de protéines qui conservent mieux leur conformation native et qui sont biologiquement actives.

III- Chromatographie d'exclusion moléculaire

La chromatographie d'exclusion moléculaire est une méthode de séparation des protéines selon leurs tailles et poids moléculaire. Le mélange de protéines est séparé par gravité dans une colonne contenant des billes de gel tassées et hydratées.

Les molécules dont la taille est supérieure à celles des plus gros pores de gel ne peuvent pénétrer, elles migrent dans la phase aqueuse du tampon d'élution et quittent les premières le lit du gel. Les petites molécules pénètrent dans les mailles du gel, leur élution sera donc retardée. L'élution des protéines se fait dans l'ordre décroissant de leur poids moléculaires [83] [84].

IV- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS- PAGE)

L'électrophorèse est une méthode d'analyse qui permet la migration différentielle des protéines dans un champ électrique en présence d'un agent dénaturant le Sodium- Dodecyl-Sulfate (SDS). La présence dans le gel de ce détergent provoque la dénaturation des protéines.

Ce détergent s'adsorbe sur les molécules protéiques les déroule formant avec ces dernières des complexes allongés avec une même densité de charge négative et les transforme uniformément en polyanions, ce qui favorise leur migration vers l'anode en fonction de leur poids moléculaire [85].

V- Immunisation des lapins

C'est le contact d'un antigène avec un système immuno-compétant chez l'animal, entraînant ultérieurement une production d'anticorps. Cette réponse immunitaire peut être stimulée par l'emploi d'adjuvants qui permettent d'activer les macrophages et de produire ainsi les facteurs non spécifiques intervenants dans cette réponse.

VI- Immunodiffusion double (IDD)

Consiste à mettre en vis à vis des antigènes, des immuns sérums dans des puits creusés dans une gélose déposée dans une boîte de pétri. Après diffusion des anticorps et des antigènes solubles, il y a apparition d'arcs de précipitation au point d'intersection, impliquant la formation d'un complexe antigène- anticorps (Ac-Ag) qui traduit une réponse immunitaire positive.

VII- Immunoélectrophorèse (IEP)

Cette technique met en jeu une séparation des protéines par électrophorèse dans un gel d'agarose suivie d'une double diffusion contre des Ac spécifiques selon une direction perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique. Le complexe immun (Ag-Ac) formé est visualisé par l'apparition des arcs de précipitation blanchâtres au point de rencontre des anticorps spécifiques avec les fractions antigéniques correspondantes.

VIII- Hemagglutination

C'est une technique de diagnostic indirecte permettant une réaction séroimmunologique entre les hématies formolées et sensibilisées à l'Ag hydatique et des dilutions croissantes des sérums à tester. La réaction positive se manifeste par l'apparition d'une nappe diffuse au fond des cupules de la plaque d'hémagglutination; par contre la réaction négative présente un sédiment compact des globules rouges qui se rassemblent en un point sombre au centre de la cupule.

IX- Radioimmunos dosage (RIA)

RIA est une technique de dosage des substances biologiques telles que les enzymes, les hormones, les stéroïdes..., dans le sang, l'urine, la salive, ou tout autre liquide corporel dont lequel la formation du complexe antigène- anticorps est détectée grâce à la présence d'un atome radioactif (iode 125). La réaction antigène-anticorps (Ag-Ac) est due à l'interaction entre les épitopes de l'antigène et les paratopes de l'anticorps. Elle fait intervenir quatre types de liaisons non covalentes (des liaisons : hydrogènes, électrostatiques, hydrophobe, et les forces de van der waals).

X- Dosage des protéines

La concentration des protéines des différents échantillons est déterminée par la méthode de Bradford [86]. C'est une technique colorimétrique sensible permettant la détection de microquantités de protéines en solution. Elle est aussi assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes. Seuls les détergents, comme le Triton et le dodécylsulfate de Na (SDS), et des bases fortes interfèrent avec cette méthode.

Le changement de couleur du réactif de Bradford, du rouge- brun au bleu se traduit par la formation d'un complexe réactif- protéine ayant un système de doubles liaisons conjuguées avec un maximum d'absorption. L'intensité de coloration dosée par spectrophotométrie, est proportionnelle à la quantité de protéines dans le milieu.

MATERIELS et METHODES

MATERIELS ET METHODES

Selon les chiffres enregistrés par les services du ministère de la santé, environ 2000 kystes hydatiques sont récupérés par an dans les services de chirurgie, en plus de ceux provenant de l'abattage du bétail.

Une mauvaise gestion de ce déchet biologique (destruction insuffisamment surveillée), porteur de l'agent pathogène peut engendrer un risque épidémiologique, lié à la transmission de la maladie.

Dans le cadre des mesures prophylactiques, plusieurs stratégies sont prises pour lutter contre cette transmission par stérilisation, incinération et enterrement du déchet. La valorisation de ce dernier constitue une autre issue permettant de gérer ce risque d'une autre manière.

C'est dans ce concept, se situe cette étude qui consiste à recycler les kystes hydatiques dans le but d'extraire un antigène d'importance diagnostique « l'antigène 5 ». Ce dernier, reconnu par sa spécificité antigénique lors du dépistage de cette maladie hydatique, va servir par la suite à la préparation d'un traceur radioactif qui sera utilisé dans un dosage radioimmunologique.

I – Extraction de l'antigène 5 du liquide hydatique

Les kystes hydatiques utilisés sont d'origine animale et humaine. Les kystes pulmonaires humains ont été récupérés du service de chirurgie thoracique et cardiovasculaire de l'hôpital Mustapha d'Alger (photo 1).

Pour les kystes animaux, ce sont les viscères parasités récoltés au niveau du service vétérinaire de l'abattoir de ruisseau (photo 2).

La richesse et la spécificité antigénique du liquide hydatique est étroitement lié à sa richesse en scolex. La mise en évidence de ces derniers est facilement réalisable par une simple observation du liquide hydatique au microscope optique.



Photo 1 : Kyste pulmonaire humain

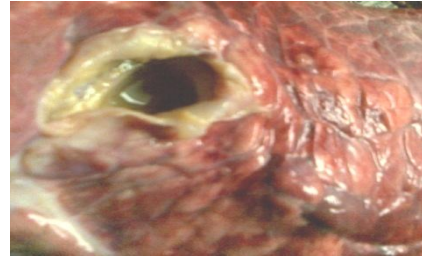
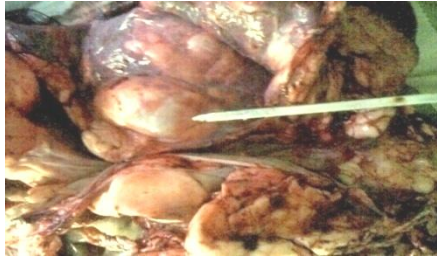


Photo 2 : Kyste pulmonaire animal avant et après ponction

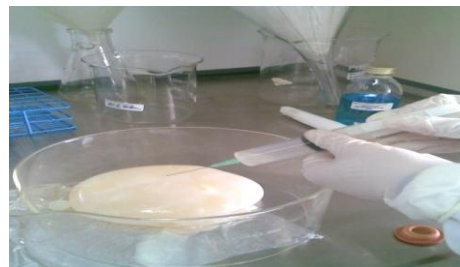
I- 1- Ponction et traitement du liquide hydatique (Figure 6(a))

Les kystes hydatiques sont lavés à l'eau, puis ponctionnés stérilement (photo 3) sous hotte à flux laminaire, à l'aide d'une seringue. Le liquide hydatique est alors filtré sur une gaze et centrifugé à 3000 tours/min pendant 30 min. à +4°C afin d'éliminer les éléments parasitaires (scolex et débris membrannaires). Avant d'effectuer une dialyse à +4°C pendant 48h contre de l'eau distillée, le surnageant obtenu est additionné d'Azide de sodium à 0.1%, Pénicilline 1000000 UI et Streptomycine à 0.05% [86].

1



2



3



4



Photo 3 : Ponction du liquide hydatique

I- 1- 1- Dialyse

Les boudins de dialyse sont plongés dans un bain d'eau bouillante permettant de les ramollir et les ouvrir, ils sont fermés à une extrémité, remplis avec du liquide hydatique débarrassé des scolex et débris membranaires puis refermés à l'autre extrémité et plongés dans un bêcher d'eau distillée.

La dialyse est effectuée pendant 48h à 4°C, sous agitation constante afin d'éviter la formation de gradient de concentration des substances diffusibles [85].

Le liquide hydatique dialysé est alors concentré au polyéthylène glycol (PEG) afin de réduire son volume puis lyophilisé et conservé pour la suite de notre étude.

I- 2- Purification et caractérisation de l'antigène 5(Figure 6(b))

I- 2-1- Précipitation au sulfate d'ammonium

Les fractions protéiques du liquide hydatique dialysées et concentrées sont soumises à différentes concentrations en sulfate d'ammonium correspondant à des pourcentages de précipitation à 60%, 65%, 70% et 75%, en se référant au tableau de saturation au sulfate d'ammonium (voir annexe) [87].

Avant de procéder à la précipitation, le pH du liquide hydatique est ajusté à 7,4. Une quantité de SAS nécessaire pour arriver au pourcentage de saturation désiré est ajoutée à cette solution protéique. Cette dernière est maintenue à une basse température et à pH=7,4.

Le mélange est mis sous agitation puis conservé 24h à 4°C. Le culot et le surnageant obtenus après centrifugation à 3000 tours/min pendant 30mn sont dessalés par dialyse pendant 2 jours à 4°C contre de l'eau distillée, concentrés puis conservés à 4 °C pour la caractérisation.

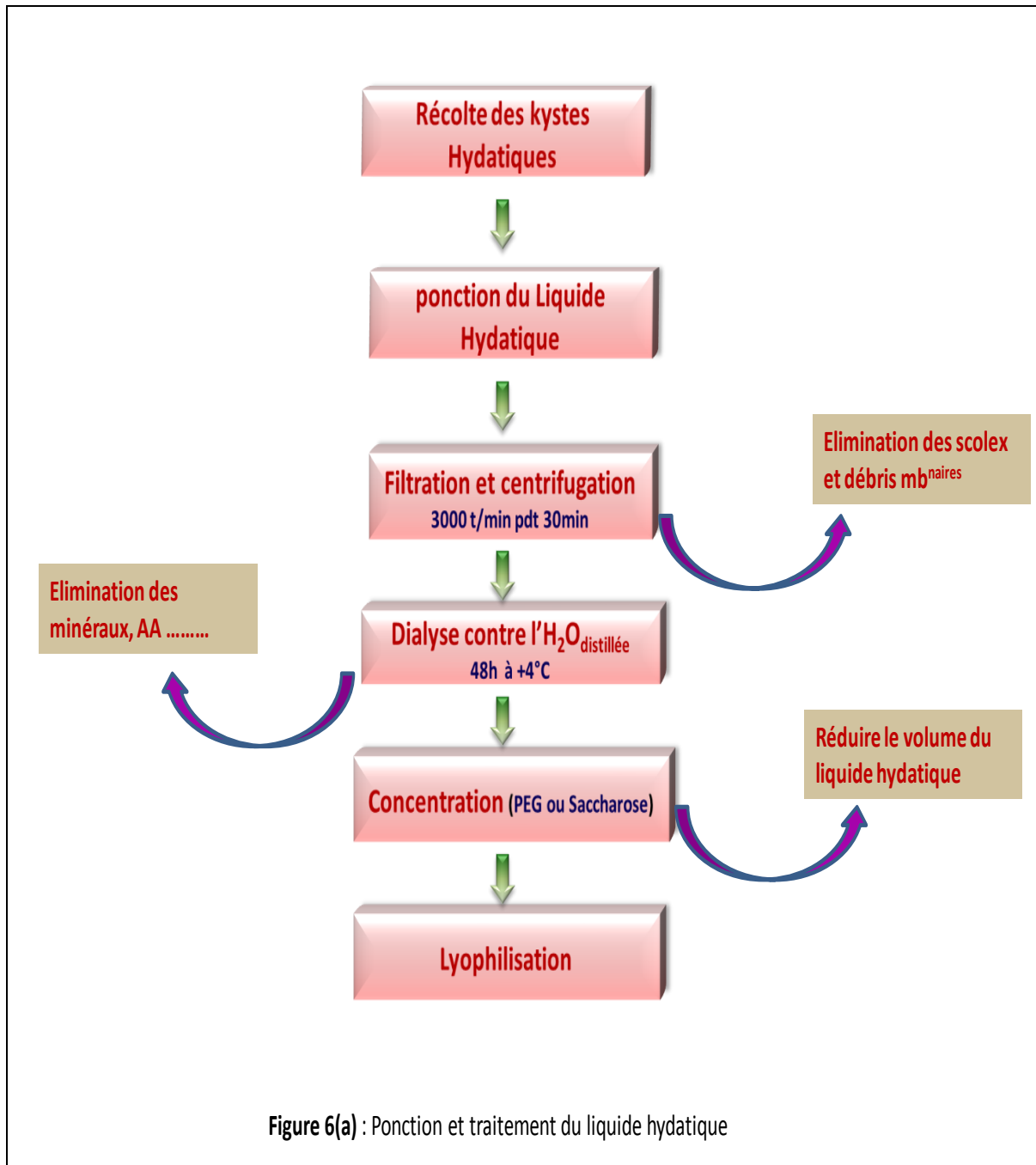
I-2-2- Dosage des protéines

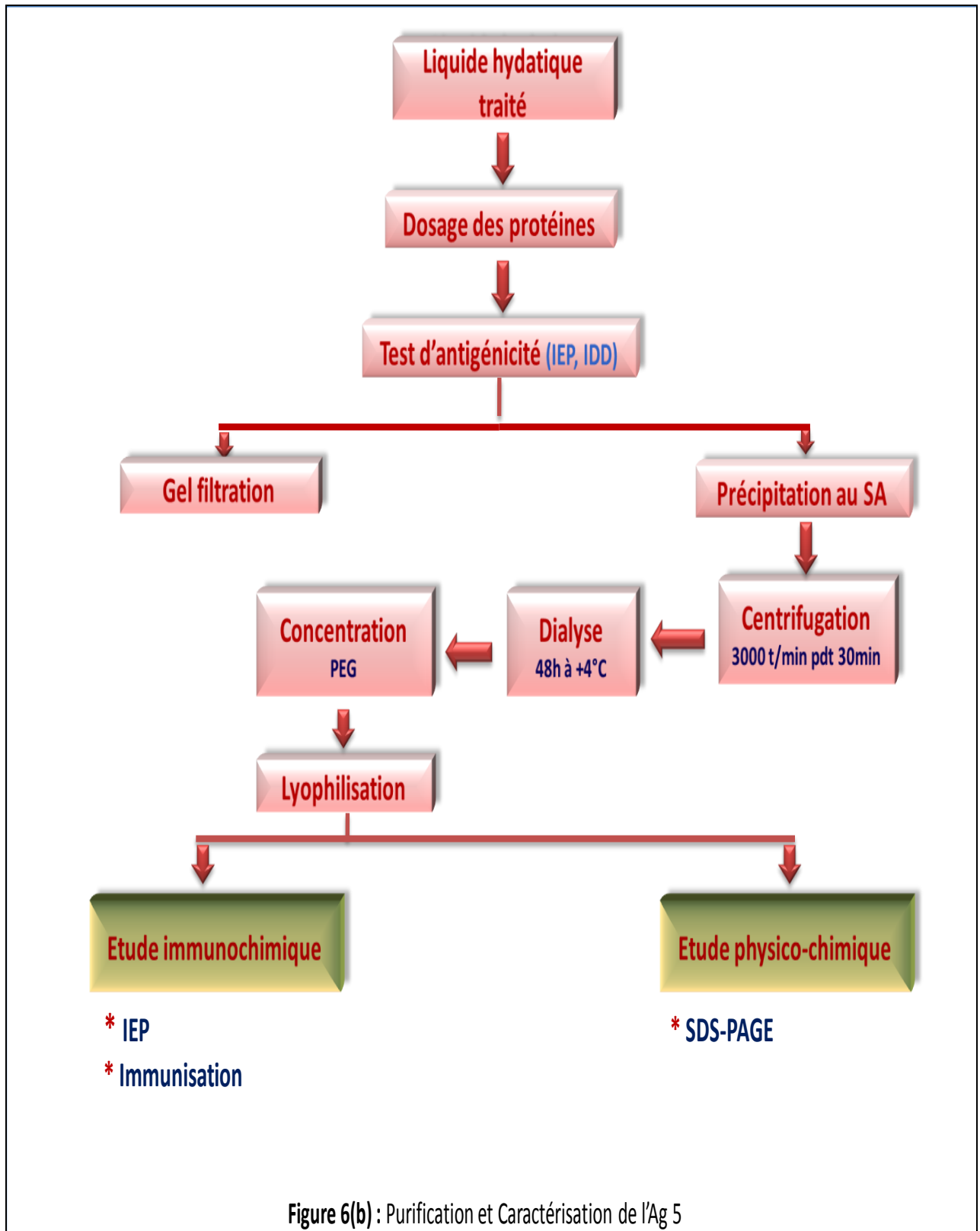
Une gamme étalon de 4 points de concentrations croissantes (0.25 à 1.5g/l) est préparée à partir d'une solution standard d'albumine bovine (BSA) à 30%.

Sur une microplaque de 96 puits, on dépose en duplicata 10µl de chaque concentration de BSA préparée ainsi que les échantillons à doser. 200µl de réactif de Bradford [86] sont ajoutés dans chaque puits et la microplaque est ensuite laissée à incuber pendant 5 mn à température ambiante.

La lecture de la gamme étalon et celle des échantillons est réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaque branché à un microordinateur. La mesure de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 620 nm contre un blanc sans protéines (réactif de Bradford).

La courbe standard sera automatiquement établie à partir des étalons mesurés et les valeurs des concentrations ainsi que les densités optiques seront données sur microordinateur.





I- 2-3- Chromatographie d'exclusion moléculaire

Le Séphadex G200 composé de polymère de glucose, avec un domaine de fractionnement compris entre $5 \cdot 10^3$ et $8 \cdot 10^5$ daltons a été utilisé [88]. Le gel dégazé est ensuite coulé dans une colonne (40 x 2,5 cm) puis laissé tasser pendant une nuit à température ambiante et enfin équilibré avec du tampon Tris-HCl 0,1M, NaCl 1M pH 8.

La colonne est calibrée avec des protéines de poids moléculaire connus dont le bleu de dextran (2000 KDa) permettant la détermination du volume d'exclusion ou volume mort (V_0), BSA (66 KDa) et pepsine (30 KDa).

1 ml du mélange protéique correspondant à une concentration de 51g/l est déposé délicatement à la surface du gel. L'élution est réalisée avec un débit constant de 9 ml/ h à raison de 3 ml par tube. La courbe étalon est déterminée par la relation linéaire existant entre le V_e/V_0 et le logarithme du PM des protéines (Tableau ci- dessous).

$$V_e/V_0 = f(\text{Ln PM})$$

Protéines marqueurs	PM (KDa)	Ln (PM)	Volume d'élution (ml)	V_e/V_0
Bleu de dextran	2000	14,509	75	1
Bovine sérum albumine	66	11,112	135	1,8
Pepsine	30	10,309	225	3

La colonne est d'abord lavée et équilibrée avec du tampon Tris HCl 0,1M NaCl 1M pH8. L'échantillon dont la concentration est de 13.46 g/l est ensuite déposé à la surface du gel puis élué avec le même tampon et dans les mêmes conditions que précédemment.

La lecture des différentes fractions a été réalisée à 280 nm contre un blanc sans protéine qui est le tampon d'élution.

I- 2-4- Etude immunochimique de l'antigène hydatique

I- 2-4-1- Immunisation des lapins [89]

L'immunisation des lapins a été réalisée avec l'antigène hydatique total et avec l'antigène purifié. De ce fait, un mélange de 5mg d'Ag lyophilisé est dissous dans 1ml d'eau physiologique à 9‰ additionné de 1 ml d'adjuvant complet de Freund. 0,1ml de ce mélange sont injectés aseptiquement en sous cutané à raison de 20 injections au niveau du ventre de

l'animal.

10 à 15 jours plus tard, des rappels ont été effectués à raison de 4 injections. Une semaine après le sang du lapin a été prélevé à partir de la veine marginale de son oreille afin de déterminer par la technique d'hémagglutination passive (HAP) la concentration des anticorps (Ac) spécifiques produits.

I-2-4-2- Immunodiffusion double (IDD) [89]

Le gel d'agarose à 1% est porté à l'ébullition dans du tampon véronal pH 8,2 additionné de 5% de citrate de sodium, jusqu'à ce que la solution devienne limpide. 5 ml de la gélose ainsi préparée sont coulés dans chaque boîte de pétri puis laissé refroidir 5min à température ambiante et 30min à 4°C en chambre humide.

A l'aide d'un emporte pièce, on forme des rigoles centrales et des puits, dans lesquels seront déposés respectivement les sérums et l'antigène à analyser. La diffusion des antigènes et des anticorps se fait en 24 h à température ambiante suivie de 24 h à 4°C.

Les boîtes sont ensuite colorées au rouge ponceau pendant 10 min puis décolorées par 2 à 3 bains successifs d'acide acétique jusqu'à apparition nette des arcs de précipitation du complexe Antigène-Anticorps.

I-2-4-3- Immunoélectrophorèse (IEP) [89]

Le gel d'agarose à 1% dans du tampon véronal pH 8,2 est liquéfié dans un bain marie bouillant puis coulée à raison de 3,5 ml par lame de verre. Elles sont ensuite laissées durcir un moment à température ambiante puis 30 min au réfrigérateur (+4°C). Après une bonne solidification de la gélose, les puits y sont creusés et remplis d'antigène additionnés de bleu de bromophénol à 0,2%.

Les lames sont ensuite placées dans une cuve d'électrophorèse horizontale contenant du tampon véronal pH 8,2 avec les puits déposés du côté de la cathode. Les ponts de papier Whatman N°1 sont alors placés et la migration est mise en marche pendant 2h 30 à 25 Volts pour chaque lame.

En fin de migration, les rigoles sont remplies avec du sérum concentré et la diffusion de l'antigène (Ag) et l'anticorps (Ac) est laissée pendant 24 h en chambre humide et à température ambiante, suivie de 24 h à 4°C jusqu'à apparition des arcs de précipitation

blanchâtre. Les lames sont alors immergées dans une solution de citrate de sodium à 5% pendant 3h puis lavées 2 à 3 fois à l'eau physiologique.

Le gel est ensuite déminéralisé, en recouvrant la surface de lames avec du papier Whatman N°1 imbibé d'eau distillée. Ces lames sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24h jusqu'à déshydratation complète. La coloration est alors faite au rougeponceau pendant 10 minutes suivie d'une décoloration avec 2 à 3 bains d'acide acétique et enfin un séchage.

I- 2-5- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (SDS- PAGE)

Le moule d'électrophorèse constitué de deux plaques de verre bien dégraissées séparées par un espaceur de 0,5 mm est préalablement préparé. Une solution stock de polyacrylamide (30% d'acrylamide et 0,8% de N-N'-bis-méthylène-acrylamide) est préparée en parallèle, elle est filtrée et dégazée sous vide. Cette solution peut être conservée à l'abri de la lumière pendant un mois à 4°C.

Lors de cette étude un gel de polyacrylamide biphasique a été utilisé. Il est composé: d'un gel de séparation (Running gel) de 13% surmonté d'un gel de concentration (le stacking- gel) de 5% (Tableau 4).

Le mélange ainsi préparé est coulé dans le moule d'électrophorèse, puis laissé polymériser sous l'action combinée du Persulfate d'ammonium et du TEMED. Le gel de concentration est ensuite coulé au dessus du premier. Le peigne permettant la formation de puits est introduit au niveau du stacking gel ; après polymérisation il est délicatement retiré, les puits sont alors rincés avec de l'eau distillée, puis avec du tampon de migration.

Les échantillons protéiques ainsi que les marqueurs de poids moléculaires sont dilués avec un tampon échantillon à pH 6,8. Ils sont alors déposés à raison de 5µl à l'aide d'une micropipette dans les puits formés par le gel de concentration.

Le dispositif d'électrophorèse est alors introduit dans une mini cuve d'électrophorèse verticale (16^Lx12^wx18^Hcm), remplie de tampon de migration. La séparation électrophorétique est réalisée à 300 V pendant 45 min. L'intensité du courant est égale à 60 mA par gel.

La révélation est effectuée par coloration du gel après son démoulage dans une solution de bleu brillant de coomassie R-250 pendant 1heure, sous agitation douce, suivit d'une décoloration dans un mélange d'acide acétique et de méthanol qui est régulièrement changée jusqu'à apparition de bandes nettes.

Tableau 3: Préparation des gels de concentration et de séparation.

Produits	Gel de concentration 5%	Gel de séparation 13%
Solution d'acrylamide à 30%	1,92ml	19,5ml
Tampon Tris-HCl	0,5M pH6,8 2,89ml	0,75M pH8,8 11,25ml
Eau distillée	6,62ml	11,25ml
Persulfate d'ammonium à 10%	0,058ml	0,3ml
TEMED	0,012ml	0,06ml

II- Préparation et évaluation de l'antigène 5 marqué à l'iode-125

II- 1- Radioprotection

La manipulation de la radioactivité nécessite de travailler en dépression et en zone surveillée afin de limiter l'irradiation du personnel. L'iode-125 étant très volatil et de demi-vie longue (60 jours), les manipulations (marquage, dilutions) s'effectuent dans une boîte à gants en dépression avec aspiration d'air dans un filtre à charbon.

II-2- Contrôle de la pureté radiochimique de l'iodure de sodium (NaI^{125}) [90]

La pureté radiochimique de NaI^{125} (Nordion-Belgique) est déterminée par une méthode simple et rapide qui est la chromatographie instantanée type ITLC-SG (Instant thin layer chromatography- silice gel) sur papier en fibre de verre imprégnée de gel de silice utilisé comme phase stationnaire et une phase mobile constituée d'un mélange de méthanol/eau (85/15).

Une goutte d'iodure de sodium NaI^{125} est déposée sur une ligne de dépôt de deux bandes de papier (2×12 cm). Après séchage, les bandes sont placées dans une cuve en verre contenant la phase mobile méthanol/eau (85/15). Une fois la migration est terminée, les bandes sont mises à sécher sous hotte ventilée.

Afin d'éviter la contamination des mains, ces bandes sont mises sur une feuille de papier et recouvertes d'un ruban adhésif. Elles sont découpées en bandelettes de 0.5 cm et déposées dans des tubes numérotés en polystyrène de dimension 12×75 mm. La radioactivité est ensuite mesurée au moyen d'un compteur gamma.

Le radiochromatogramme est établi en portant le nombre de coups par minute (CPM) de chaque tube en fonction du nombre de fraction (nombre de tube). La pureté radiochimique de l'iodure de sodium est calculée selon la formule suivante :

$$\text{PRC (\%)} = \frac{\text{Nombre de coups correspondant au pic de NaI}^{125}}{\text{N}^{\text{bre}} \text{ total de coups correspondant aux pics (NaI}^{125} \text{ +impureté)}} \times 100$$

II-3- Marquage de l'antigène 5 à l'iode-125

II- 3- 1- Marquage à la chloramine T [90]

Comme spécifié précédemment, toutes les manipulations sont réalisées sous hotte plombée et ventilée en raison du risque de production de molécules d'iode radioactives et volatiles au cours des réactions d'oxydation.

A une quantité définie de protéine, diluée à une concentration de 1.6 mg/ml en solution aqueuse, on ajoute 10µl de tampon phosphate 0.25M pH 7.4, 10µl d'iodure¹²⁵ de sodium (0.5µCi), puis 10µl de chloramine-T dont on déterminera la concentration optimale. Cette dernière doit être aussi faible que possible afin de limiter le risque de dénaturation. Le mélange est vortexé pendant 60 secondes à température ambiante.

Après ce temps, la réaction d'oxydation est stoppée par addition de 10µl de pyrosulfite de sodium et 100µl d'iodure de potassium KI.

Plusieurs marquages de l'antigène ont été réalisés en vue de l'optimisation du rendement de marquage (Tableau 5).

Tableau 4 : Différents marquages réalisés à des concentrations variables en chloramine T

	Marquage 1	Marquage 2	Marquage 3	Marquage 4	Marquage 5
Antigène (1.6mg/ml)	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
Tampon phosphate (0.25M pH7.4)	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl
NaI¹²⁵(0.5mCi)	5µl	5µl	5µl	5µl	5µl
Chloramine T	10µl (0.2mg/ml)	10µl (0.4mg/ml)	10µl(1mg/ml)	10µl(2mg/ml)	10µl (2.5mg/ml)
Métabisulfite de Na	10µl (0.2mg/ml)	10µl(0.4mg/ml)	10µl(1mg/ml)	10µl(2mg/ml)	10µl(2.5mg/ml)
IK (10mg/ml)	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl

II- 4- Purification et contrôle de l'antigène marqué à l'iode-125 (Figure7)

Différentes méthodes d'analyse ont été utilisées afin de purifier la molécule marquée et déterminer la pureté radiochimique des molécules : chromatographie par perméation sur gel et chromatographie sur papier.

II-4- 1- Purification de l'antigène marqué

II-4- 1- 1- Préparation de la colonne

Le gel de séphadex G25 est gonflé dans du tampon phosphate M 0.05 pH 7.4 additionné d'azide de sodium. Le tampon d'élution ainsi que le gel sont dégazés au moyen d'une pompe à vide afin d'éliminer le maximum de bulles d'air.

A l'extrémité inférieure d'une colonne (1×15cm) préalablement lavée et séchée, un bout de laine de verre est déposé soigneusement, le gel est ensuite coulé contre la paroi afin d'éviter la formation des bulles d'air. Après tassement du gel, la colonne est lavée plusieurs fois avec du tampon de lavage (phosphate 0.05M pH7.4 +10% d'azide de sodium) puis équilibrée avec du tampon d'élution (phosphate 0.05M pH7.4 + 0.3% de BSA)

II-4- 1- 2- Purification proprement dite de l'antigène marqué

A la fin de la réaction de marquage, la solution radiomarquée est déposée sur la colonne préalablement lavée et équilibrée. L'élution est effectuée avec du tampon phosphate 0.05M pH 7,4 dans des tubes en polystyrène (12×75mm) à raison de 0,7 ml avec un débit de 0.7ml/h.

Des aliquotes de 10µl sont prises de chaque fraction obtenue pour être comptées au compteur gamma (CPM) pendant 10 secondes. Des radiochromatogrammes sont établis et les fractions correspondantes au pic de la protéine marquée sont rassemblées dans un tube. Le rendement de marquage est ensuite estimé selon la formule suivante :

$$\text{Rdt (\%)} = \frac{\text{Radioactivité associée à la protéine}}{\text{Radioactivité totale associée à la protéine et à l'iode}} \times 100$$

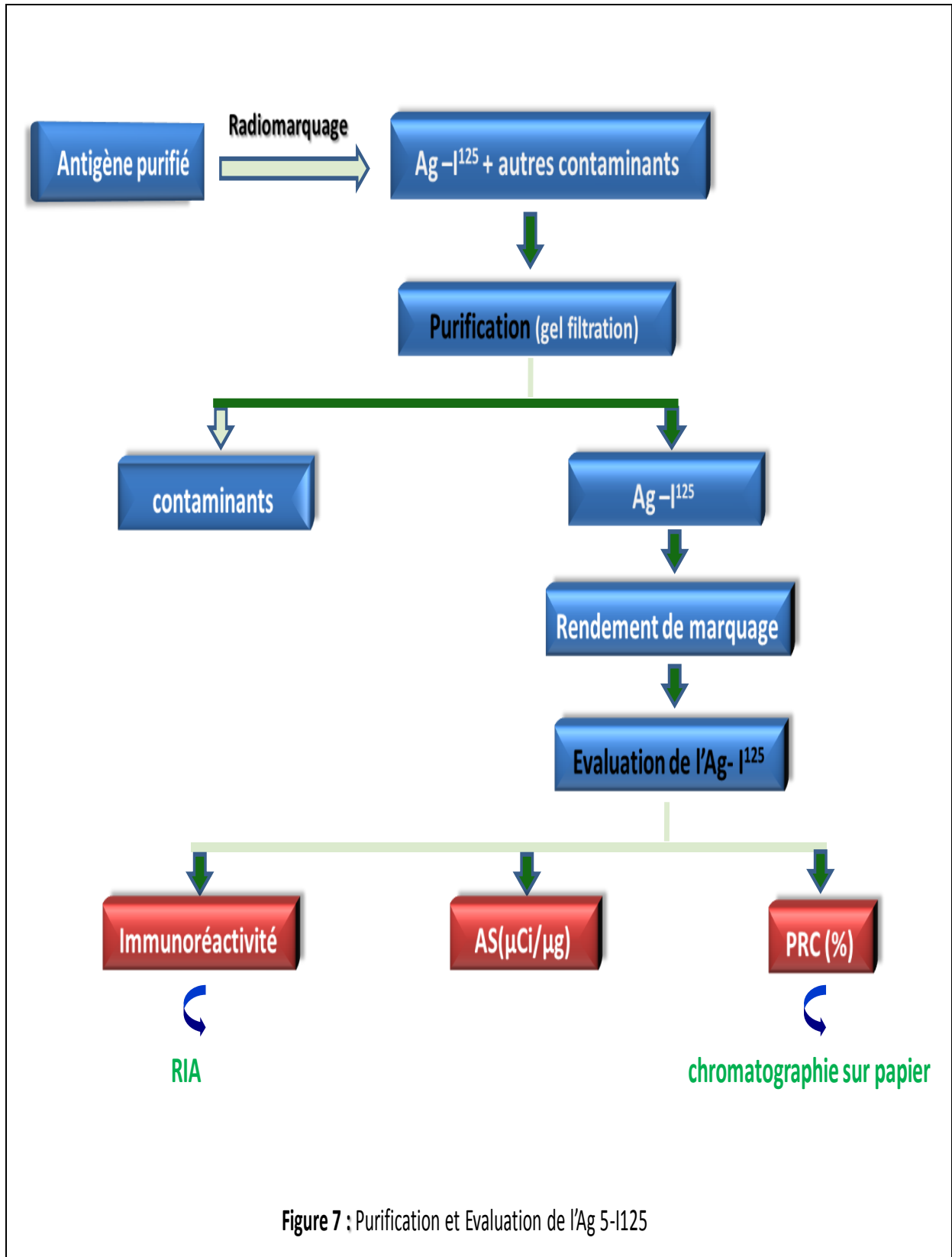


Figure 7 : Purification et Evaluation de l'Ag 5-125

II-4- 2- Evaluation de l'antigène marqué

II-4- 2- 1- Activité spécifique (As) [90]

L'activité spécifique est déterminée par la formule ci-dessous. Elle est exprimée en unité de radioactivité par unité de masse ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) et dépend de la concentration en réactifs utilisés et du rendement de marquage.

$$\text{AS } (\mu\text{Ci}/\mu\text{g}) = \frac{\text{Pourcentage d'incorporation de } I^{125} \times \text{Radioactivité totale } (\mu\text{Ci})}{\text{Masse de la protéine } (\mu\text{g})}$$

II-4- 2- 2- Activité volumique [90]

L'activité volumique du traceur exprimé en $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ a été déterminée par la mesure de l'activité de $10\mu\text{l}$ de traceur obtenu. Elle tient compte de l'efficacité du compteur gamma et se calcule selon la formule suivante :

$$\text{AV}(\mu\text{Ci}/\text{ml}) = \frac{\text{Nombre de cpm/ml}}{3.7 \cdot 10^4 \times 60 \times \text{Efficacité du compteur}}$$

II-4- 2- 3- Détermination de la pureté radiochimique du traceur [90]

La pureté radiochimique des fractions correspondantes aux pics de radioactivité de la molécule marquée est analysée par chromatographie sur papier ITLC-SG (voir pureté radiochimique de l'iodure de sodium).

Le pourcentage de la pureté radiochimique du traceur est calculé par la formule suivante :

$$\text{PRC } (\%) = \frac{\text{Radioactivité associée à la protéine}}{\text{Radioactivité totale associée à la protéine et à l'iodure}} \times 100$$

II-4- 2- 4- Contrôle de l'immunoréactivité [90]

L'immunoréactivité de la protéine marquée est évaluée par la détermination du pourcentage de fixation non spécifique (Bo/T ou LNS) et spécifique (B/T) à l'aide d'un dosage radioimmunologique (RIA liquide).

Le protocole du contrôle de l'immunoréactivité de l'antigène 5 marqué à l'iode-125 est le suivant :

1. Numérotter un nombre suffisant de tubes.

2. Distribuer au fond des tubes 100µl de tampon phosphate 0.05M, BSA 0.3% plus 100 µl de sérum à doser. Les sérums testés sont ceux obtenus après immunisation du lapin par l'antigène purifié (sérums positifs vérifiés par la technique d'hémagglutination passive) et quelques sérums de malades positifs mis à notre disposition par le service de parasitologie de l'Institut Pasteur d'Alger.
3. Vortexer et rajouter 100µl de traceur présentant une activité de l'ordre de 50000 CPM
4. Vortexer et laisser incuber toute la nuit à +4°C afin de permettre la formation des complexes immuns.
5. Rajouter à chaque tube 1ml de polyéthylène glycol (PEG8000) à 22% et 100 µl de gamma globuline à 30mg/ml, préparée le jour même.
6. Centrifuger à 3000 tours /min pendant 25minutes
7. Aspirer le surnageant et tapoter bien les tubes sur un papier absorbant en veillant à éliminer intégralement la fraction de traceur non liée.
8. Mesurer la radioactivité des tubes à l'aide d'un compteur gamma (Tableau 6).

Tableau 5 : Protocole du contrôle de l'immunoréactivité de l'antigène marqué

Tubes	Tampon	Sérum	Traceur	Incubation	PEG	Gamma globuline	Centrifugation	Comptage
2 tubes (total)			100 µl	24 heures			-	-
2 tubes (LNS)	100 µl		100 µl	24 heures	1 ml	100 µl	3000t/min (25min)	10 secondes
2 tubes (échantillon)	100 µl	100 µl	100 µl	24 heures	1 ml	100 µl	3000t/min (25min)	10 secondes

Après avoir mesuré la radioactivité exprimée en coups par minute, le pourcentage de liaison est calculé selon la formule suivante :

$$\% L = \frac{\overline{XCPM}_{\text{Essai}} - \overline{XCPM}_{\text{LNS}}}{\overline{XCPM}_{\text{Total}}} \times 100$$

Avec $\left\{ \begin{array}{l} \overline{XCPM}_{\text{Essai}} : \text{La moyenne du nombre de coups par minute de l'essai (présence d'immun-sérum).} \\ \overline{XCPM}_{\text{Total}} : \text{La moyenne du nombre de coups par minute du traceur brut.} \\ \overline{XCPM}_{\text{LNS}} : \text{La moyenne du nombre de coups par minute du LNS (absence d'immun-sérum).} \end{array} \right.$

III- Matériel utilisé

- Système chromatographique composé de :

- * Collecteur de fraction LKB
- * Détecteur LKB
- * Pompe péristaltique LKB

- Système d'électrophorèse constitué :

- * Cuve à électrophorèse verticaleBIO-RAD
- * Générateur BIO-RAD
- * Cuve à électrophorèse horizontaleBIO-RAD

- Lecteur de microplaqueTERMO ELECTRONCORPORATION (MULTISKAN EX)

- Spectrophotomètre UV-visibleAMERSHAM BIOSCIENCES

- LyophilisateurCHRIST

- CentrifugeuseJOUAN

- EtuveBLUE M

- Hotte à flux laminaireGELMAN SCIENCES

- Boîte à gants

- Pompe à videMILLIPORE

- PH-mètre..... SCHOTT INSTRUMENTS

- Balance de précisionSTUART

- Colonne pour gel filtrationPHARMACIA

- Boudins de dialyse

- Chambre humide

- Cuve en verre pour chromatographie sur papier

- Microplaques de 96 puits à fond plat

◆ Echantillons et animaux

- Lapins

- Liquide hydatique

- Sérum humain

- Sérum de lapin

◆ Réactifs et produits chimiques

- Solution d'iodure de sodium radioactif (NaI^{125})NORDION-BELGIQUE

- Laine de verre

- Polyéthylène glycol 8000 et 4000.....SIGMA

Matériels et Méthodes

- AgaroseSIGMA
- Sephadex G200 et G25.....SIGMA
- ChloramineT (N-Chloro-p-Toluène-Sulfonamide de sodium) ($C_7H_7ClNO_2SNa$)SIGMA
- AcrylamideFLUFA
- Bis-acrylamideSERVA
- Méthanol(CH_3OH)SIGMA-ALDRICH
- Acide acétiquePROLABO
- Azide de sodium (NaN_3)SIGMA
- Marqueurs de poids moléculaire (gel filtration)
- Marqueurs de poids moléculaire (SDS-PAGE)
- Adjuvant complet de FREUND
- Sulfate d'ammonium, hydrogène phosphate de sodium dihydraté ($Na_2 HPO_4 \cdot 2H_2O$), dihydrogène phosphate de potassium (KH_2PO_4), Tris méthyle aminométhane, persulfate d'ammonium (PSA), Tétraméthyl éthylène diamine (TEMED), HCl, NaOH, NaCl, Iodure de potassium (KI), Gamma globuline, Métabisulfite ou pyrosulfate de sodium ($Na_2S_2O_5$)

RESULTATS et DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Purification et caractérisation partielle de la fraction 5

Résultats

La première partie de notre travail a consisté en une étude biochimique et immunologique de la fraction 5, reconnu comme étant la fraction majeure et la plus antigénique du liquide hydatique.

Nous avons d'abord procédé à la collecte des liquides hydatiques humains et animaux, considérés comme une bonne source d'antigènes parasites à usage diagnostique [1]. C'est une étape qui nous a pris beaucoup de temps puisqu'il était indispensable de travailler sur des liquides hydatiques qui soient fertiles [91, 92, 93] et non purulents. Ces liquides hydatiques permettent de conditionner la sensibilité et la spécificité des tests sérologiques qui sont largement dépendants de la nature antigénique des molécules qui les composent.

En effet, l'antigénicité de tous les liquides hydatiques recueillis a été testée par deux techniques, immunoélectrophorèse [2, 61, 94] et immunodiffusion double [61, 95]. Seuls, ceux qui ont donné au moins trois arcs de précipitation ont été retenus pour la suite des tests (les kystes des bovins se sont avérés non fertiles).

Dans un seconde temps, le liquide hydatique a été soumis à différents traitements avant de procéder à son fractionnement. La purification de la fraction 5 et la détermination de ses caractères physico-chimiques a été réalisée par des techniques biochimiques : précipitation au sulfate d'ammonium et l'électrophorèse en milieu dénaturant.

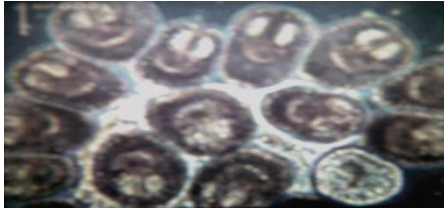
Après sa purification, l'antigénicité de la fraction 5 a été testée par IEP avant de procéder aux essais de son marquage à l'iode -125.

Détermination de l'antigénicité du liquide hydatique

Avant de procéder au fractionnement du liquide hydatique, un test immunologique par la technique d'immunoélectrophorèse et double diffusion a été effectué pour tous les liquides hydatiques recueillis au niveau de l'abattoir de ruisseau et le service thoracique de l'hôpital Mustapha afin de sélectionner ceux présentant plusieurs arcs de précipitation vis-à-vis d'un pool de sérum de malades atteints par l'hydatidose (confirmés chirurgicalement).

Tous les liquides hydatiques issus des bovins, ayant été testés par ces techniques se sont avérés négatifs. Parmi ceux des patients hospitalisés, certains étaient non antigéniques d'autres présentaient des arcs de précipitation dont le nombre variait selon la fertilité du kyste.

Les liquides hydatiques humains ont été ponctionnés, les plus fertiles (photo 4) qui ont permis de donner plus de trois arcs de précipitation visibles à l'œil nu ont été sélectionnés (photo 5 d'IEP prise avant et après coloration).



GX40



GX20

Photo 4 : Observation au microscope optique des scolex d'un liquide hydatique fertile

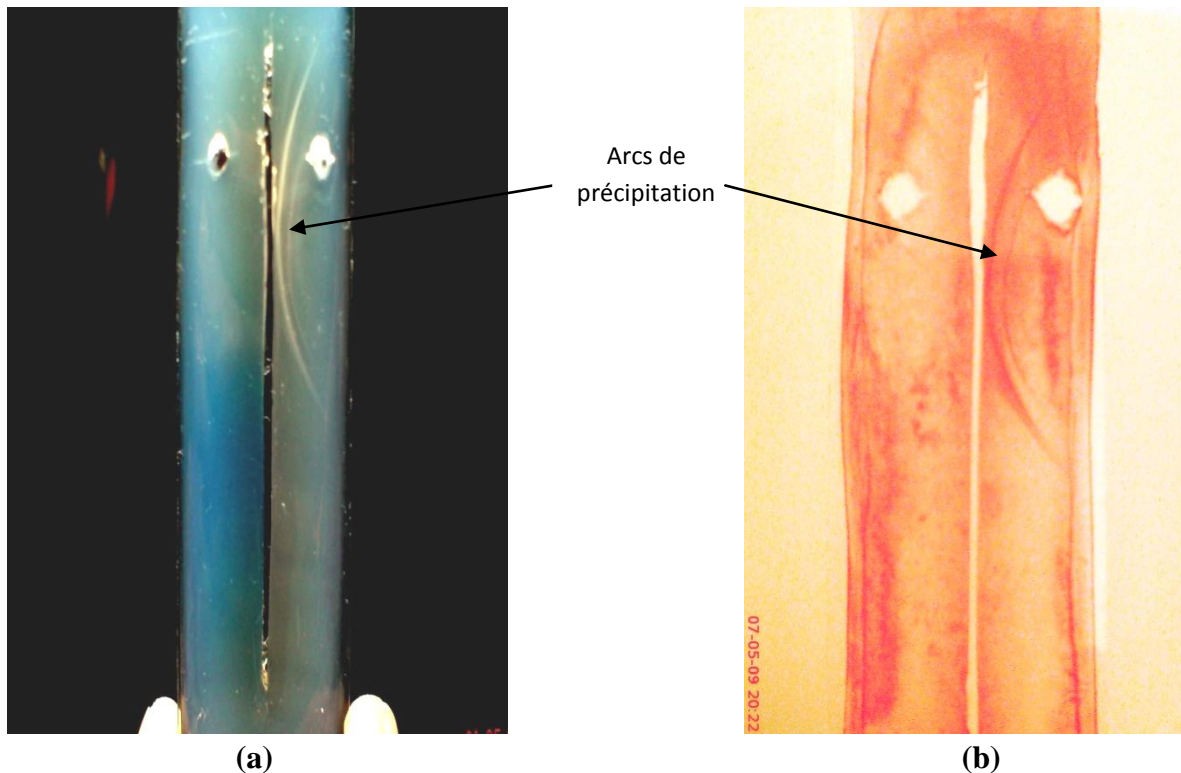


Photo 5 : IEP avant(a) et après(b) coloration

Chromatographie sur gel de filtration (CGF)

La filtration moléculaire sur Séphadex G200 du liquide hydatique ayant préalablement subi un traitement révèle 4 pics plus ou moins distincts les uns des autres (Figure 6). Cette procédure a servi seulement à la visualisation des différentes fractions protéiques du liquide hydatique et à situer approximativement le pic correspondant à l'antigène qu'on veut purifier.

D'après ce profil d'élution (Figure 8), Le pic N°3 semble contenir la fraction recherchée du liquide hydatique. Cette fraction est de concentration assez importante, elle est éluee entre les tubes 39 et 51 à proximité de la BSA et son poids moléculaire a été estimé à 63422 Dalton (Da) par extrapolation sur une courbe étalon des protéines de poids moléculaire connus, préalablement illustrée par le profil chromatographique (Figure 9) puis linéarisée sur la figure 10.

Précipitation au sulfate d'ammonium

Une précipitation du liquide hydatique par relargage salin a été réalisée dans cette étude dans le but d'améliorer le rendement de purification par gel filtration. Ce procédé s'est avéré suffisant pour réaliser la purification partielle de l'antigène 5 sans passer par la filtration sur chromatographie, ce qui est avantageux pour des raisons suivantes :

- Vu la non disponibilité du liquide hydatique fertile en quantité importante, qu'on risque de perdre lors des essais de purifications par gel filtration.
- Cela permet aussi d'éviter les risques de contaminations engendrées lors des différentes manipulations (précipitation, dialyse, purification...)
- C'est un procédé simple, qui permet de conserver mieux la conformité native de la molécule

Le résultat du relargage salin du liquide hydatique soumis à des précipitations à différentes concentrations en sulfate d'ammonium ayant des pourcentages de saturation de 60% et 65% a révélé selon le profil électrophorétique, la présence dans le surnageant de deux bandes d'intensité différente dont la plus intense situé au voisinage de la BSA semble correspondre à la fraction 5. Il a été observé que le surnageant a été débarrassé de la majorité des protéines ce qui nous a incité à augmenter encore le pourcentage de saturation à 70% afin de mieux séparer l'antigène des autres composants.

La migration électrophorétique du surnageant de cette dernière précipitation (70%) a montré effectivement la présence d'une bande nette et unique migrant à proximité de la BSA (Figure 11).

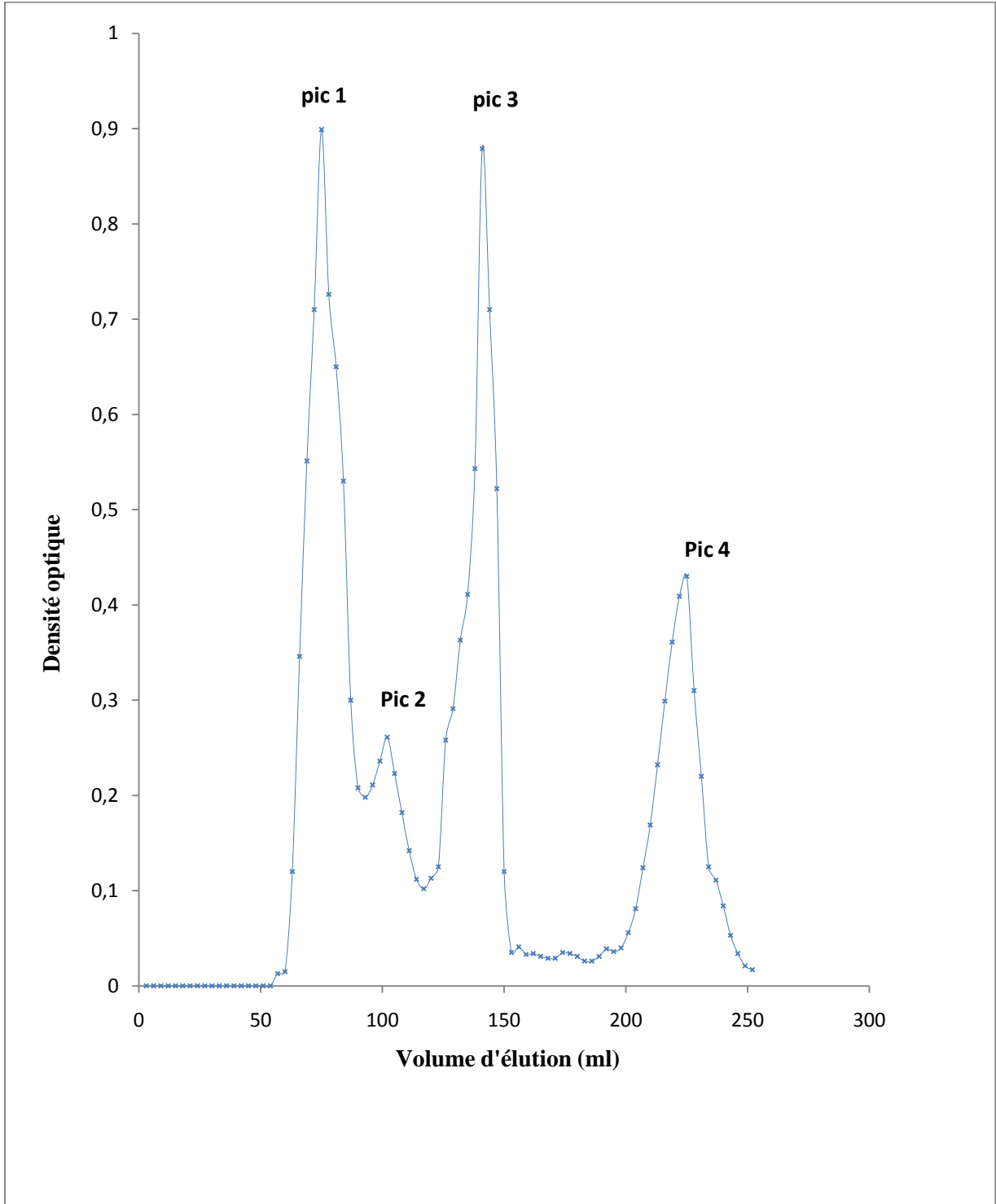


Figure 8 : Chromatographie par gel filtration sur Séphadex G200 du liquide hydatique

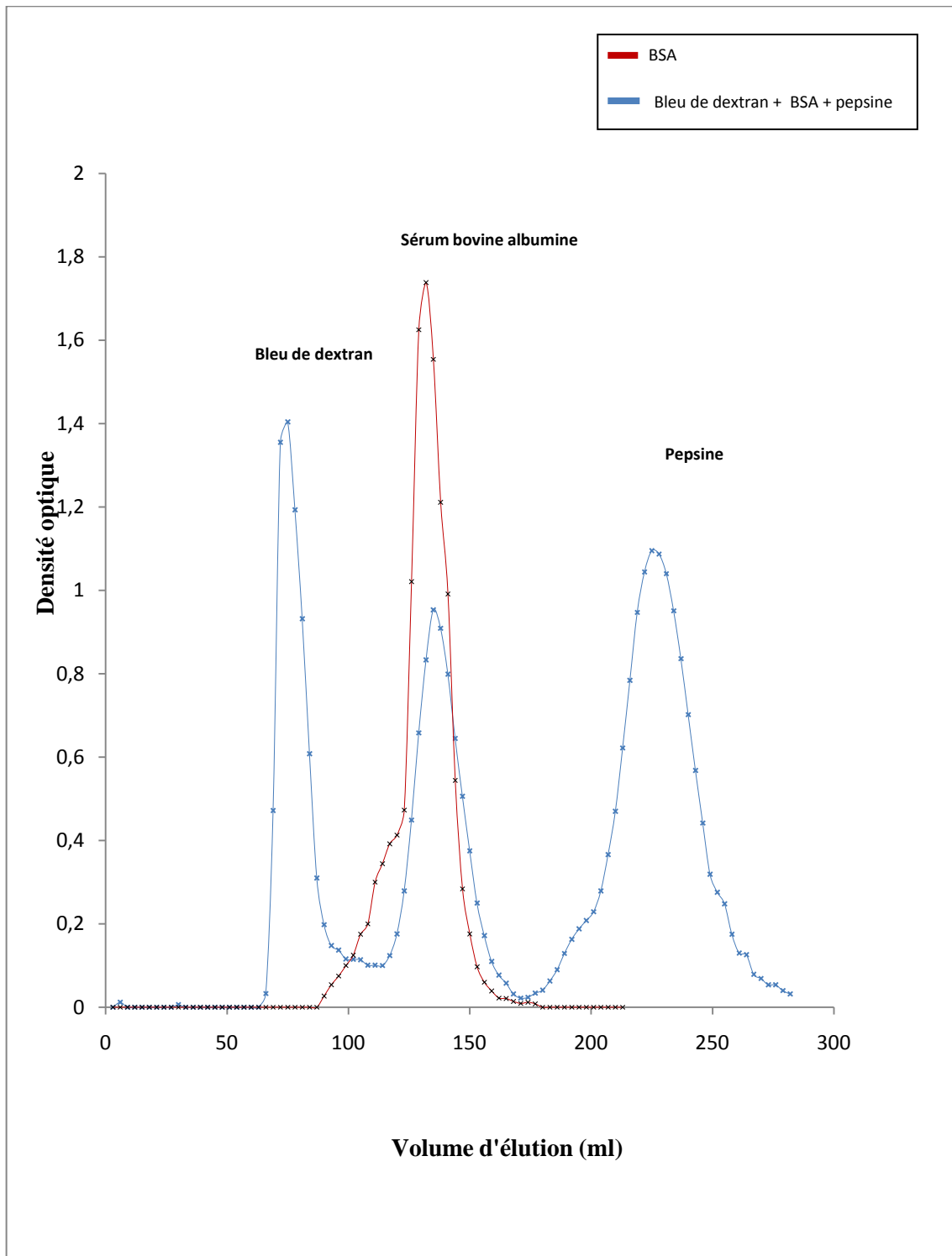


Figure 9 : Chromatographie par gel filtration sur Séphadex G200 des marqueurs de poids moléculaire

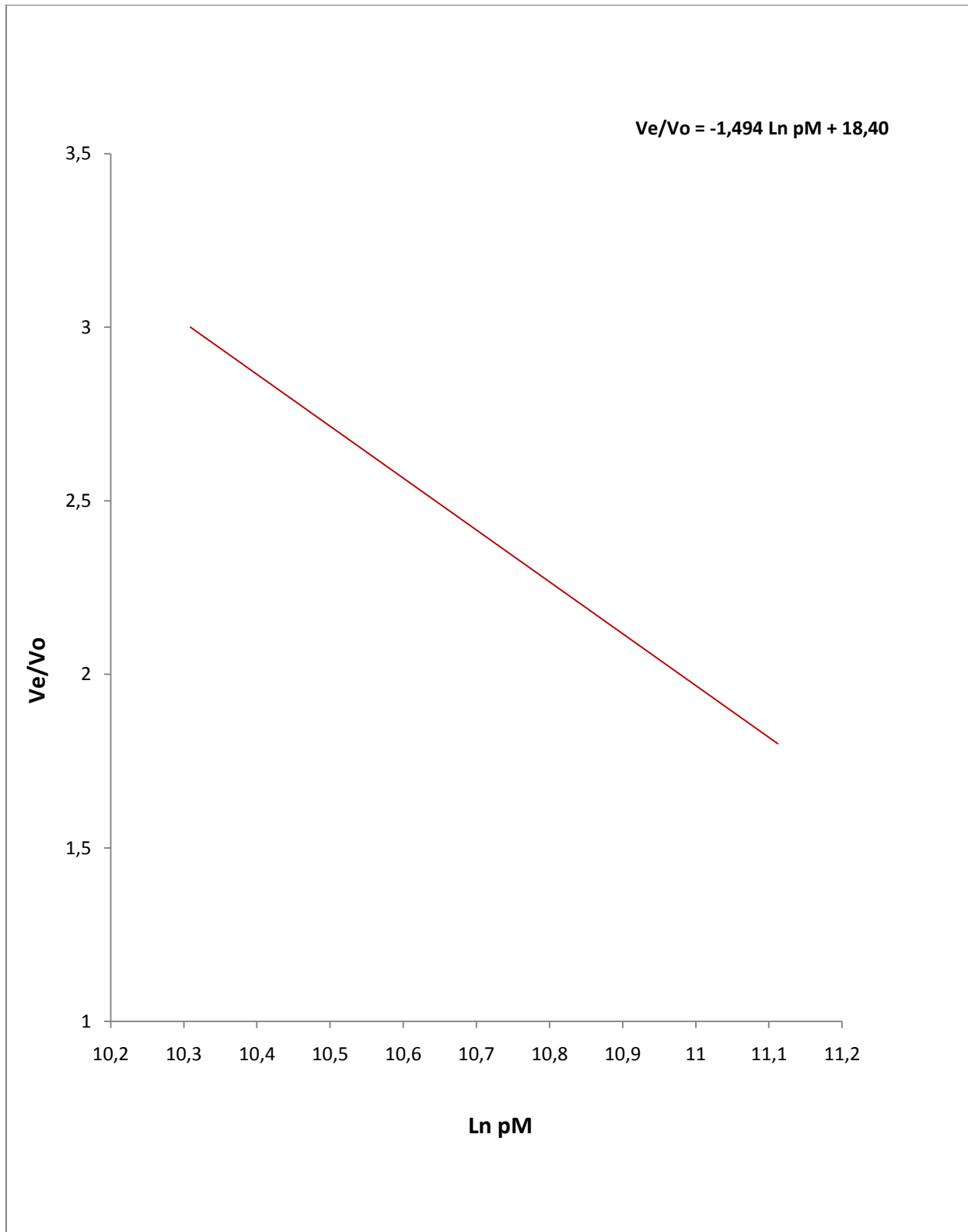


Figure 10 : Courbe étalon des marqueurs de poids moléculaire

Résultats et discussions

Par ailleurs, une double précipitation à 70% a été réalisée aussi sur le culot (issu de la précipitation à 70%) préalablement dialysé et concentré au Polyéthylène glycol (PEG), pour permettre de maximiser l'obtention de l'antigène 5. A la différence du premier relargage, le profil électrophorétique du surnageant a montré en plus de la bande unique, la présence d'une autre, similaire à celle obtenue lors du relargage à 65% (figure11). Ceci est probablement dû à un mauvais ajustement du pH ou à une contamination lors du transvasement du surnageant.

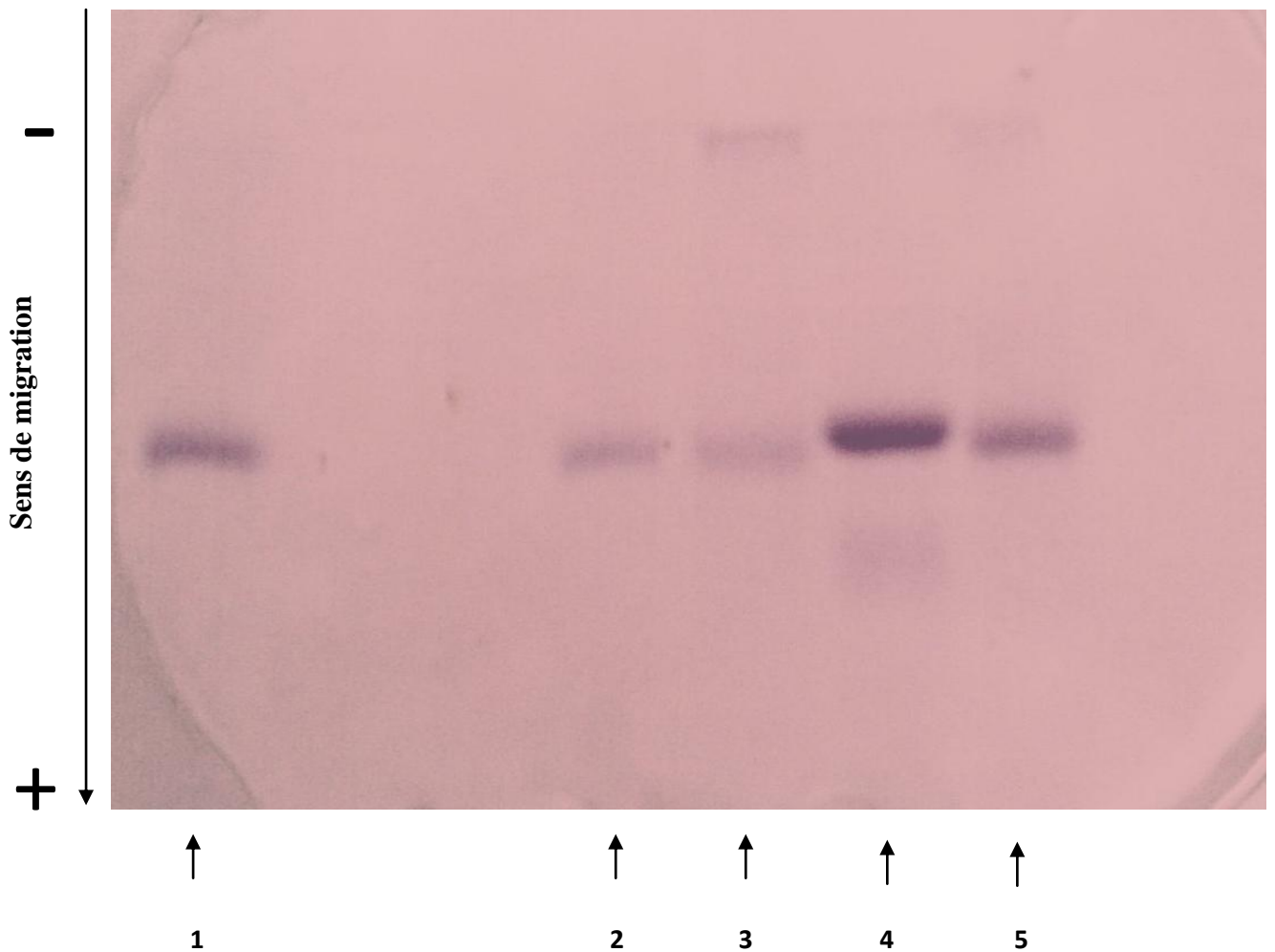


Figure 11 : Electrophorèse des surnageants issus des différentes précipitations au sulfate d'ammonium du liquide hydatique

Résultats et discussions

1 : Surnageant S1_{70%} issu de la précipitation à 70% de l'antigène brut

2 : BSA

3 : Surnageant S2_{70%} de la double précipitation à 70% du culot C_{70%} issu de la première précipitation

4 : Culot de la double précipitation à 70%

5 : Surnageant S_{65%} issu de la précipitation à 65% de l'antigène brut

Un deuxième relargage (double précipitation) refait dans les mêmes conditions et avec plus de précautions (en maintenant le même pH pour favoriser l'insolubilité de la protéine contaminante) a révélé une seule bande de même poids moléculaire que le surnageant issu de la première précipitation du liquide hydatique (figure 12).

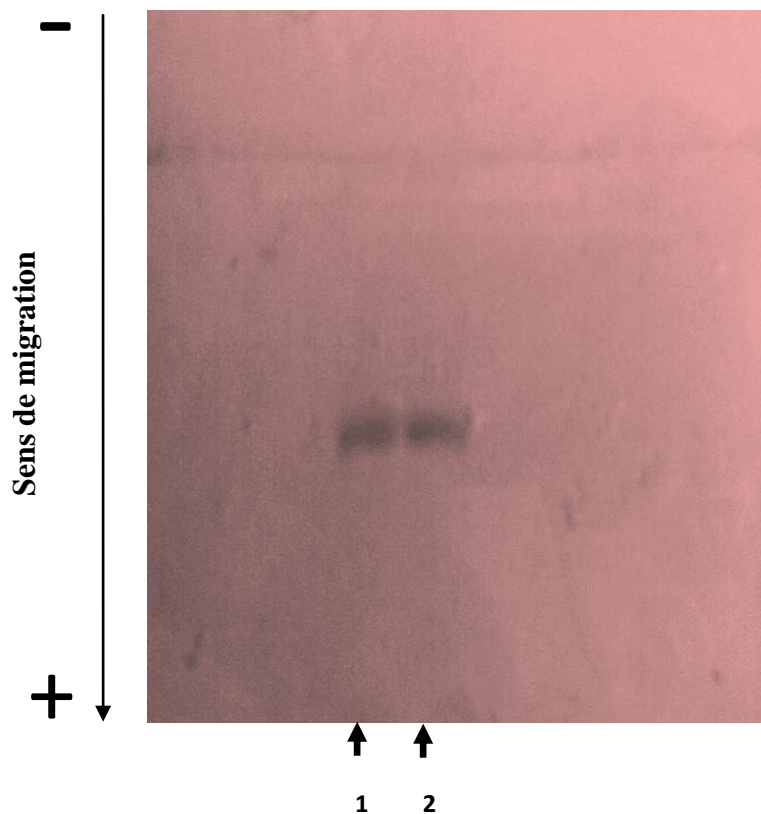


Figure 12 : Electrophorèse du surnageant issu de la double précipitation au sulfate d'ammonium du liquide hydatique

1 : Surnageant S1_{70%} issu de la précipitation à 70% de l'antigène brut

2 : Surnageant S2_{70%} de la double précipitation à 70% du culot C_{70%} issu de la première précipitation

Caractérisation physicochimique et immunologique de l'antigène 5

Afin de confirmer nos suppositions quant à la nature de la fraction obtenue lors de la précipitation à 70% nous avons essayé au moins de caractériser son poids moléculaire par électrophorèse sur milieu dénaturant et son antigénicité par la technique d'immunoélectrophorèse sur gel d'agarose et par un test d'immunisation des lapins.

Electrophorèse sur milieu dénaturant (SDS-PAGE)

Le surnageant préalablement solubilisé, issu de la précipitation à 70% (retenu pour la suite de notre étude), le culot à 70% ainsi que le liquide hydatique brut ayant été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique de Laemmli [96] ont permis de donner les profils illustrés sur la figure 13.

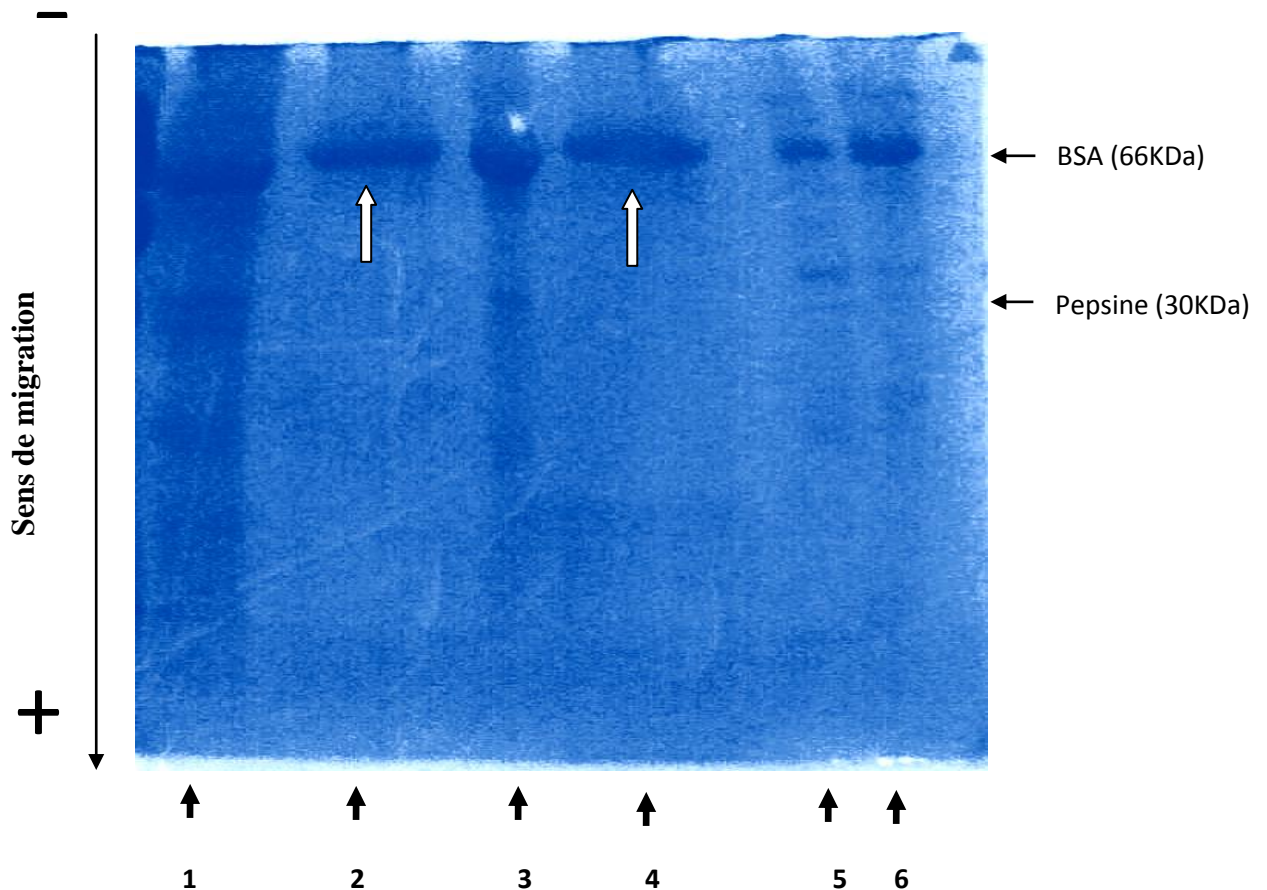


Figure 13: Electrophorèse sur milieu dénaturant (SDS-PAGE)

- 1 : Culot issu de la précipitation à 70% de l'antigène brut
- 2, 4 : Surnageant S_{70%} issu de la précipitation à 70% de l'antigène brut
- 3 : Marqueur de poids moléculaire (BSA et pepsine)
- 5, 6 : L'antigène brut

Afin de mieux visualiser les traces des autres bandes susceptibles d'être présentes dans le surnageant, l'échantillon a été bien concentré. Le résultat de la migration montre effectivement l'apparition d'une bande unique et bien nette (\Rightarrow) comparé au profil de l'antigène brut, migrant à proximité de la BSA utilisé comme marqueur de poids moléculaire de 66KDa.

Test d'immunisation

Une immunisation de 2 lapins a été effectuée, une avec le surnageant obtenu après précipitation à 70%, l'autre avec le liquide hydatique total. Une semaine plus tard, après le premier rappel, des prélèvements sanguins ont été réalisés et le sérum obtenu est testé par la technique d'hémagglutination passive, afin de s'assurer de l'antigénicité de nos échantillons. Le résultat de cette immunisation a montré un taux d'anticorps suffisamment élevé pour l'antigène total et l'antigène 5 avec un titre semblable de 16000 obtenu dès le premier rappel.

Immunoélectrophorèse

Cette technique se base essentiellement sur l'apparition d'un précipité formé par un complexe Ag-Ac ce qui révèle la reconnaissance de l'antigène et de l'anticorps correspondant. Après migration de l'antigène dans le gel d'agarose suivi d'une immunoprécipitation, utilisant deux immun-sérums positifs : sérum de malades atteints par l'hydatidose et un immun-sérum provenant de lapin immunisé par l'antigène total (liquide hydatique), le résultat révèle l'apparition pour les deux cas d'un seul arc de précipitation visible à l'œil nu (photo 6).

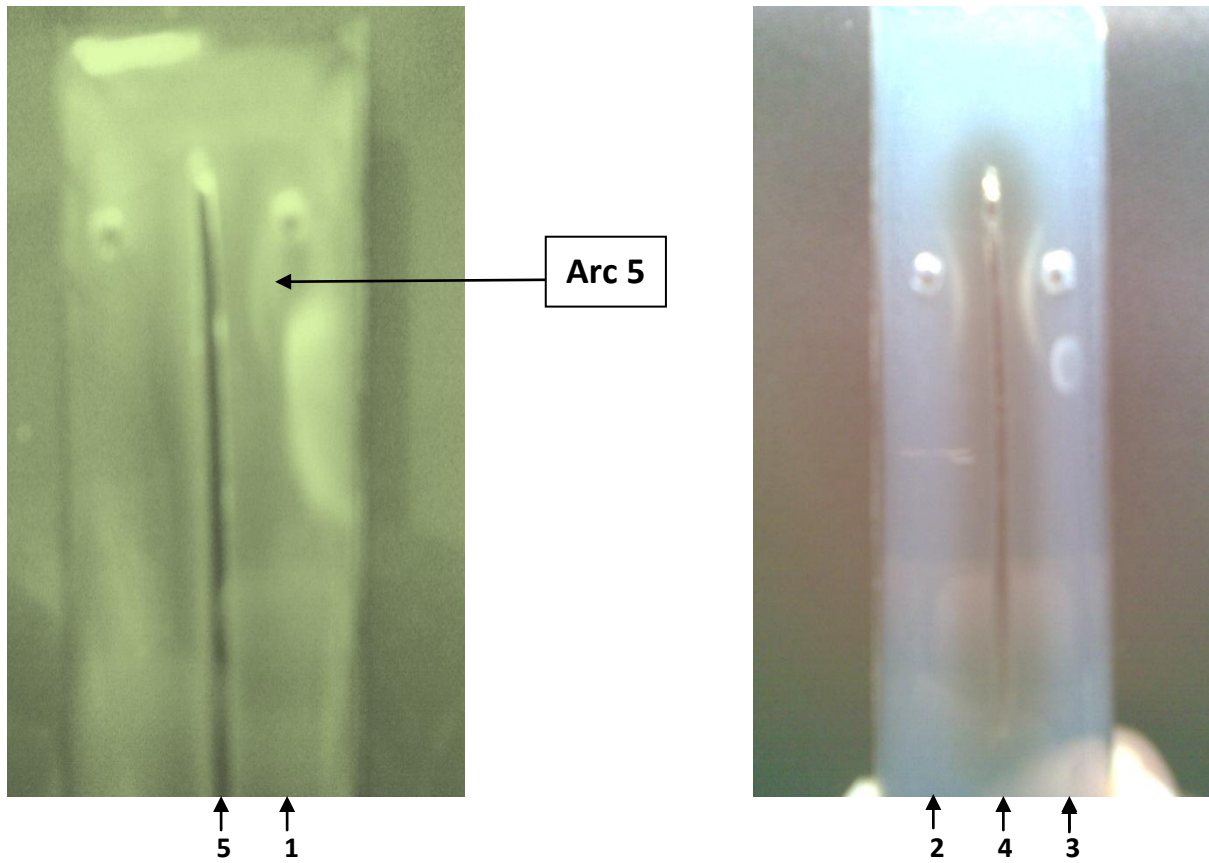


Photo 6 : Immunoélectrophorèse de l'antigène purifié

1, 2, 3 : L'antigène purifié

4 : Sérum de lapin immunisé par l'antigène total (liquide hydatique)

5 : Pool de sérum humain positif

Discussion

L'importance diagnostique de la fraction 5 a été prouvée et confirmée par plusieurs auteurs [2, 97, 98, 99] ce qui a fait de cette fraction l'antigène le plus largement utilisé dans les diverses réactions immunologiques.

Elle a été mise en évidence par plusieurs travaux [99, 100, 101, 102]. En effet, plusieurs techniques ont été décrites pour purifier partiellement les antigènes hydatiques [89, 91, 98, 99, 103]. Les techniques, utilisées au cours de leurs travaux n'ont permis d'obtenir que de faibles quantités de cette fraction. Par la suite, des investigations plus poussées ont abouti à une purification rapide et plus fiable par combinaison des techniques biochimiques telles que les précipitations aux sels avec des séparations chromatographiques, incluant la chromatographie d'affinité utilisant des anticorps monoclonaux [104].

Le test le plus fréquemment utilisé pour le diagnostic de l'hydatidose est l'immunolélectrophorèse, technique employée dans notre étude qui est basée sur la spécificité d'un arc typique [94, 105, 106, 107] désigné par l'arc 5 (obtenu dans notre cas). Les liquides hydatiques retenus pour la suite des essais ont été sélectionnés sur la base de leur forte antigénicité vis-à-vis des immun-sérums de malades, qui se traduit par la présence d'immunoglobulines spécifiques aux antigènes du parasite, ce qui indique l'apparition de plusieurs arcs de précipitation y compris l'arc 5.

Dans ce travail, la procédure de purification décrite consiste en une simple précipitation aux sels de sulfate d'ammonium (SA), technique très employée pour séparer les protéines d'intérêt. Cependant, cette approche ne permet pas une purification très poussée. En effet, pour obtenir un rendement satisfaisant en protéine, la concentration en SA et le pH ont été ajustés à des niveaux où d'autres protéines de solubilité proche puissent précipiter.

Parmi les différentes précipitations réalisées sur Le liquide hydatique, une meilleure séparation a été obtenue avec un relargage salin à 70%. Le surnageant issu de cette précipitation a permis de révéler selon le profil électrophorétique, après migration sur gel de polyacrylamide, une seule bande qui correspond à la fraction 5, migrant à proximité de la BSA de poids moléculaire 66 KDa. Aucune autre bande n'a été observée après concentration de l'échantillon.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Bout *et al.* et Piantelli *et al.* [101, 108] qui ont décrit que l'antigène 5 se trouve sous une forme monomérique de 60-67KDa [109] contrairement à ceux des travaux d'Oriol *et al.* [99] qui ont suggéré que l'antigène pouvait exister sous une forme polymérique qui peut atteindre des poids moléculaires très élevés [107].

En effet, les travaux de Piantelli *et al.* et Lightowers *et al.* [92, 108] sont en accord avec nos résultats. Ces auteurs ont pu visualiser une seule bande de 67KDa qui correspond à celle qu'on a trouvée.

Selon les travaux d'Amri *et al.* [110], ces auteurs ont pu aussi déterminer par SDS-PAGE un poids moléculaire de 66 KDa après filtration moléculaire du liquide hydatique sur G200 suivi d'une chromatographie d'affinité sur concanavoline-A Ultrogel.

Ce résultat se rapproche en partie de ceux obtenus par les travaux de Di Felice *et al.* [104] et Lorenzo *et al.* [111] qui ont trouvé respectivement par la technique de western blot, deux bandes (66 et 56 KDa) et (67 et 57 KDa), la plus dominante est celle qui correspond à l'antigène 5 (66 KDa ou 67KDa).

La présence d'une deuxième bande (56 ou 57KDa) a été expliquée sur la base d'une différence rencontrée lors de l'élaboration de la fraction 5 à l'intérieur de l'hydatide [104] ou alors représente un dérivé d'une forme principale de l'antigène 5 provenant d'un processus impliquant une élimination d'une partie c-terminal [111].

Le fractionnement chromatographique par gel filtration du liquide hydatique a permis d'estimer le poids moléculaire de cette fraction à 63,42 KDa.

A la différence de nos résultats, Hamrioui *et al.*, [112] retrouvent la même fraction de 70 KDa après passage sur gel ACA 34 par contre une fois soumise à une électrophorèse (SDS-PAGE) elle se présente avec un poids moléculaire de 64KDa [113], proche de celui qu'on a obtenu.

Cette fraction a été aussi décrite par Chamekh *et al.* [114] qui a révélé deux bandes (PM=64 et 53 KDa) par la technique de Western blot dont la principale peut correspondre à 63.42KDa.

L'antigène 5 qui est une glycolipoprotéine thermolabile [86, 94] peut se présenter avec des poids moléculaires peu variables (60-67), ceci dépend des techniques utilisées lors de sa purification [104] ce qui explique alors cette différence.

Après avoir estimé son poids moléculaire, le pouvoir antigénique de cette fraction reste important à déterminer afin de pouvoir conclure en ce qui est de sa nature. Nous avons alors testé cette antigénicité par un test classique utilisé dans l'immunodiagnostic de l'hydatidose qui est la technique d'immunoélectrophorèse (IEP) et par un test d'immunisation des lapins.

Les résultats obtenus par ces tests ont montré que l'antigène purifié a mieux conservé ses caractères antigéniques malgré les différents traitements qu'il a subit. Ceci a été traduit d'une part par l'obtention dès le premier rappel d'un titre suffisamment élevé suite à la bonne réponse du lapin vis-à-vis de cette fraction 5, qui a été toujours reconnue comme étant la fraction la plus immunogène du liquide hydatique. D'autre part, par l'apparition d'un seul arc de précipitation vis-à-vis d'un pool de sérums de malades (arc 5 qui est typique à l'antigène 5) et d'un immun-sérum de lapin immunisé par l'antigène total (immun-sérum contenant des anticorps polyclonaux anti liquide hydatique).

Marquage de l'antigène 5 à l'iode-125

Résultats

La deuxième étape de cette étude, consiste à réaliser des essais de marquage à l'I-125 de l'antigène 5 partiellement purifié et caractérisé précédemment. Pour cela, nous avons contribué d'abord à la préparation du traceur radioactif tout en essayant d'optimiser le rendement de marquage puis son évaluation du point de vue qualité.

I –Préparation du traceur radioiodé

1- Pureté radiochimique du NaI-125

La pureté radiochimique de l'iodure de Na utilisé pour le marquage a été déterminée par chromatographie sur papier ITLC-SG. Le radiochromatogramme représenté sur la Figure 14 a donné 2 pics, le premier correspond à l'iodure de sodium qui migre avec le solvant, le deuxième à celui de l'impureté radiochimique qui est l'iodate (IO_3^-) et periodate (IO_4^-) qui restent sur la ligne d'origine. La pureté radiochimique de l'iodure de Na est de **92%**.

2- Marquage de l'antigène 5

L'antigène purifié (Ag) a été marqué à l'iode 125 par la méthode directe à la chloramine-T réalisable en une seule étape. Cette fraction, après marquage subit directement une purification par gel filtration sur séphadex G25.

2-1- Effet de la chloramine -T sur le rendement de marquage

Durant les essais de marquage, nous avons cherché à améliorer ce rendement et pour se faire, seule l'influence de la concentration en réactif oxydant a été étudiée. Les profils d'éluion de l'Ag marqué sont représentés sur les Figures (15, 16, 17,18) qui révèlent 2 pics, l'un correspond à l'Ag-125, l'autre à l'iode libre.

Les résultats obtenus montrent que le rendement de marquage dépend étroitement de la quantité de chloramine-T ajoutée à la solution de marquage. Il a été observé qu'à partir d'une concentration en chloramine-T égale à 0.4 mg/ml (2^{ème} marquage), le rendement de marquage de l'antigène purifié commence à augmenter pour atteindre une valeur de 63% à une concentration optimale de 2 mg/ml en chloramine-T.

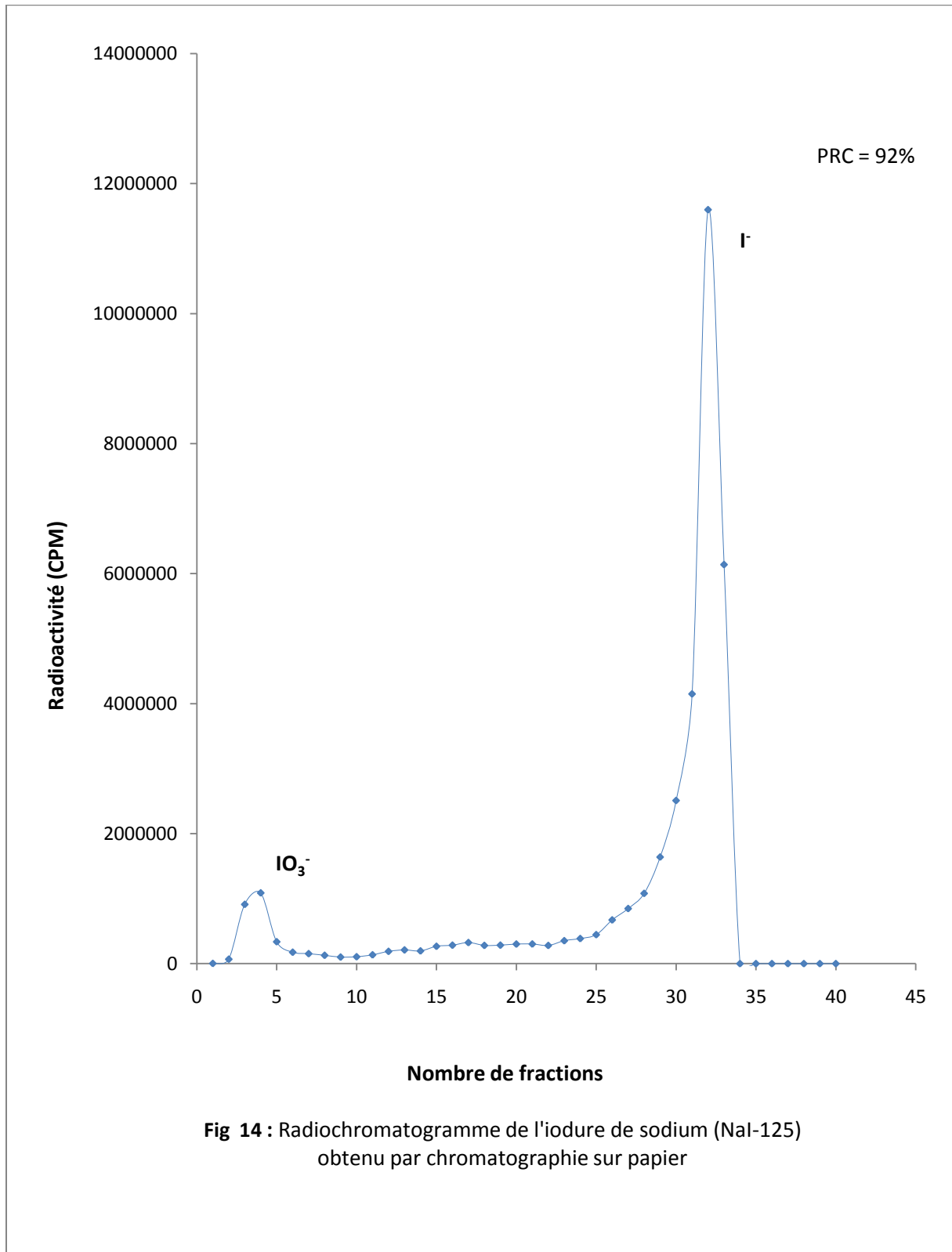
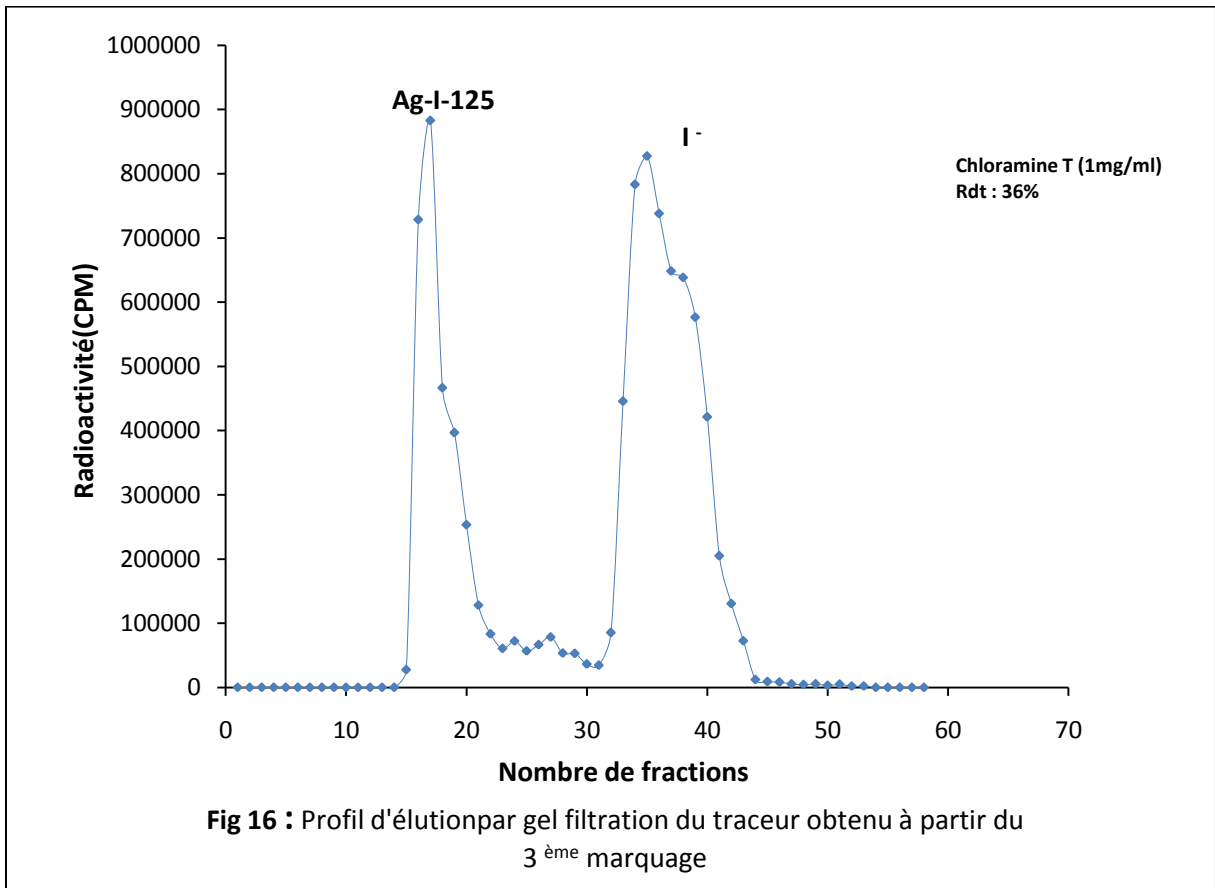
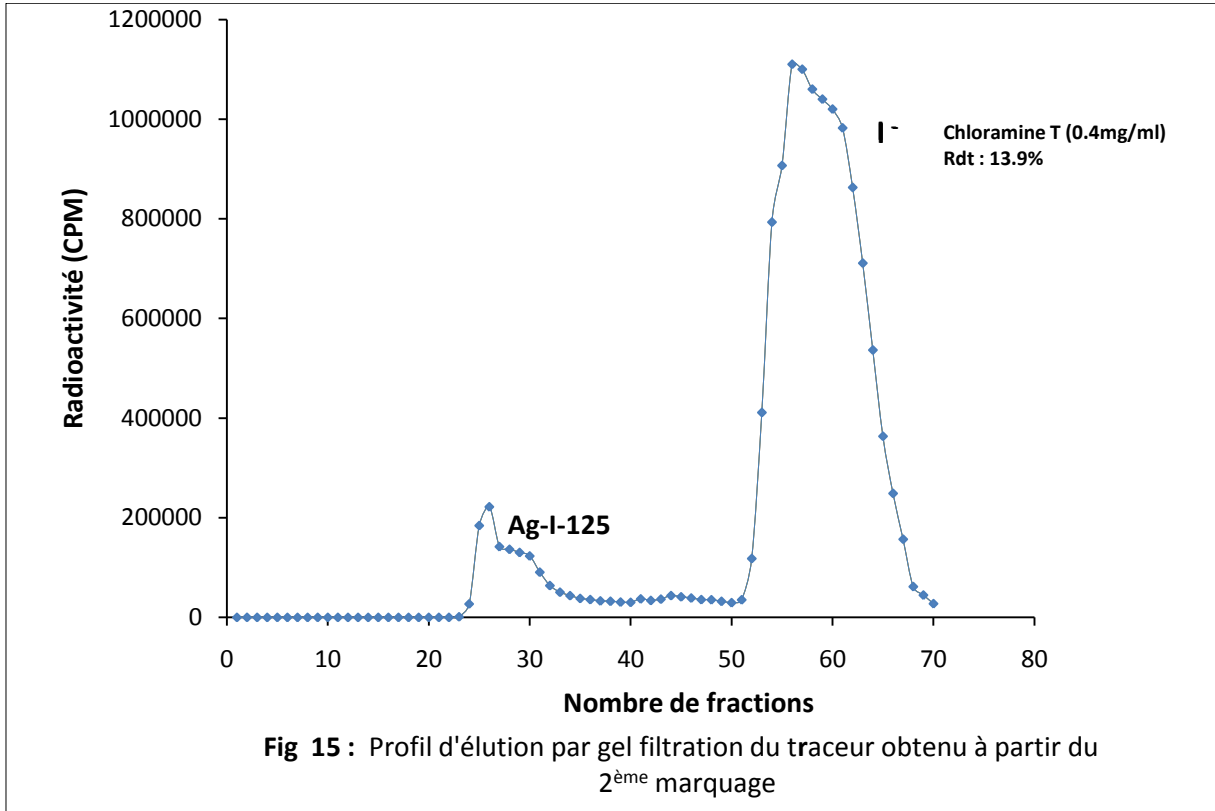
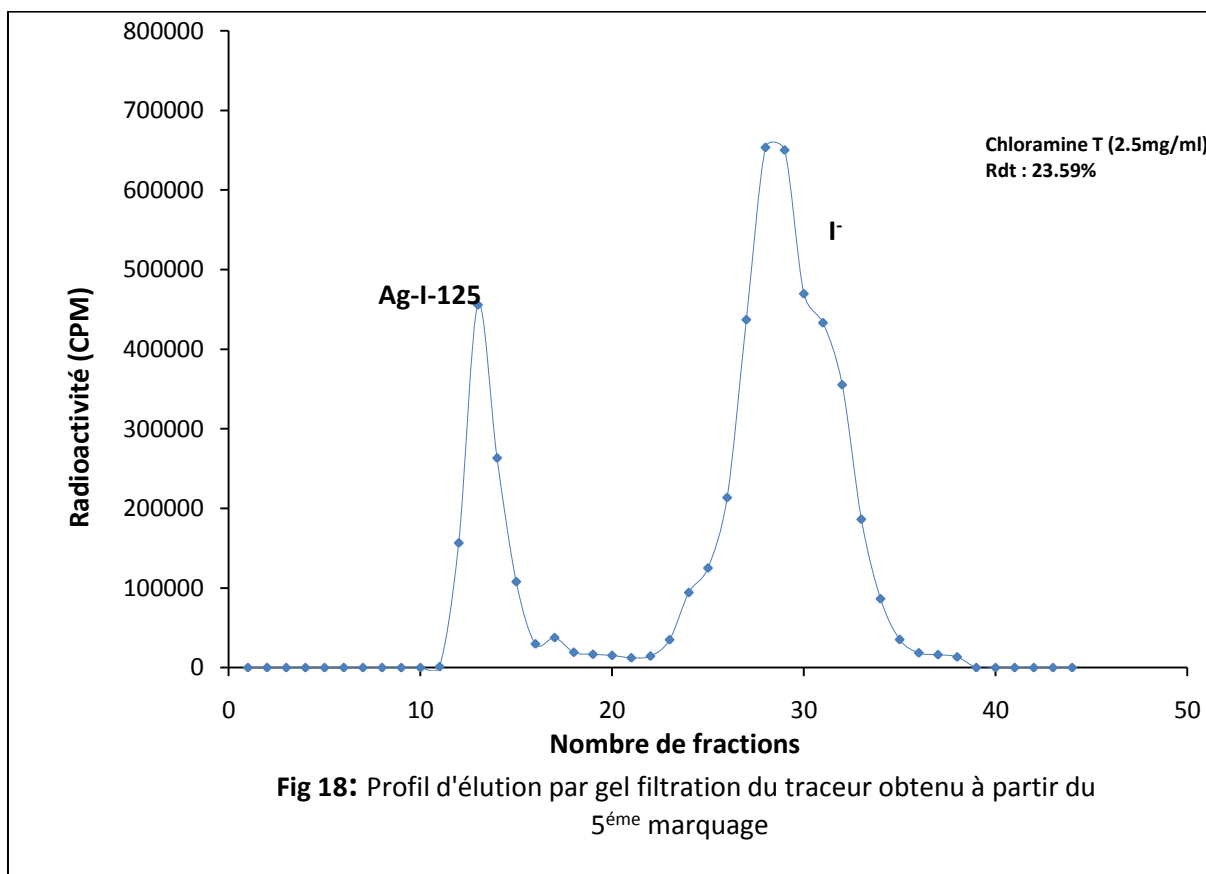
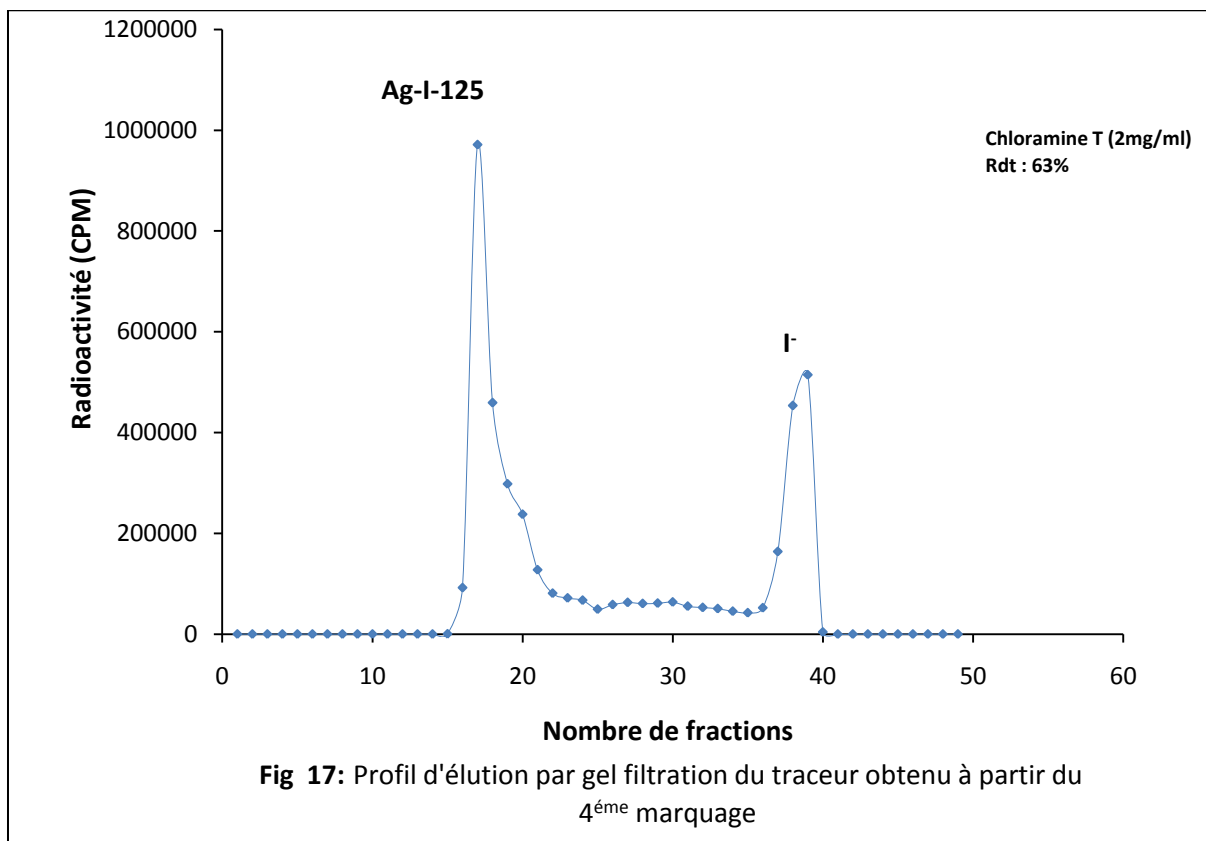


Fig 14 : Radiochromatogramme de l'iodure de sodium (NaI-125) obtenu par chromatographie sur papier





II –Evaluation du traceur radioiodé

Après l'étape de purification par gel filtration, l'Ag marqué a été évalué du point de vue pureté radiochimique (PRC), activité spécifique, activité volumique et immunoréactivité.

1- Pureté radiochimique (PRC)

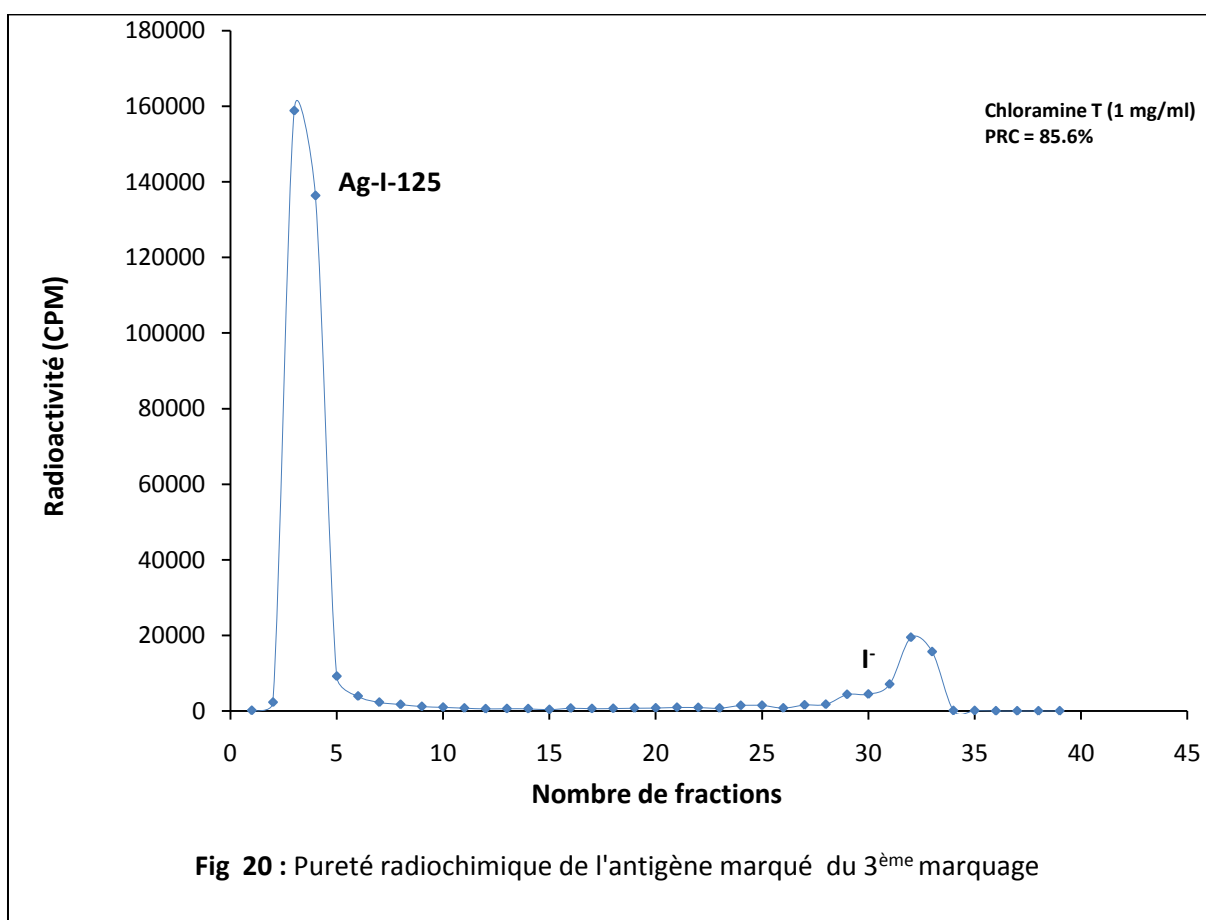
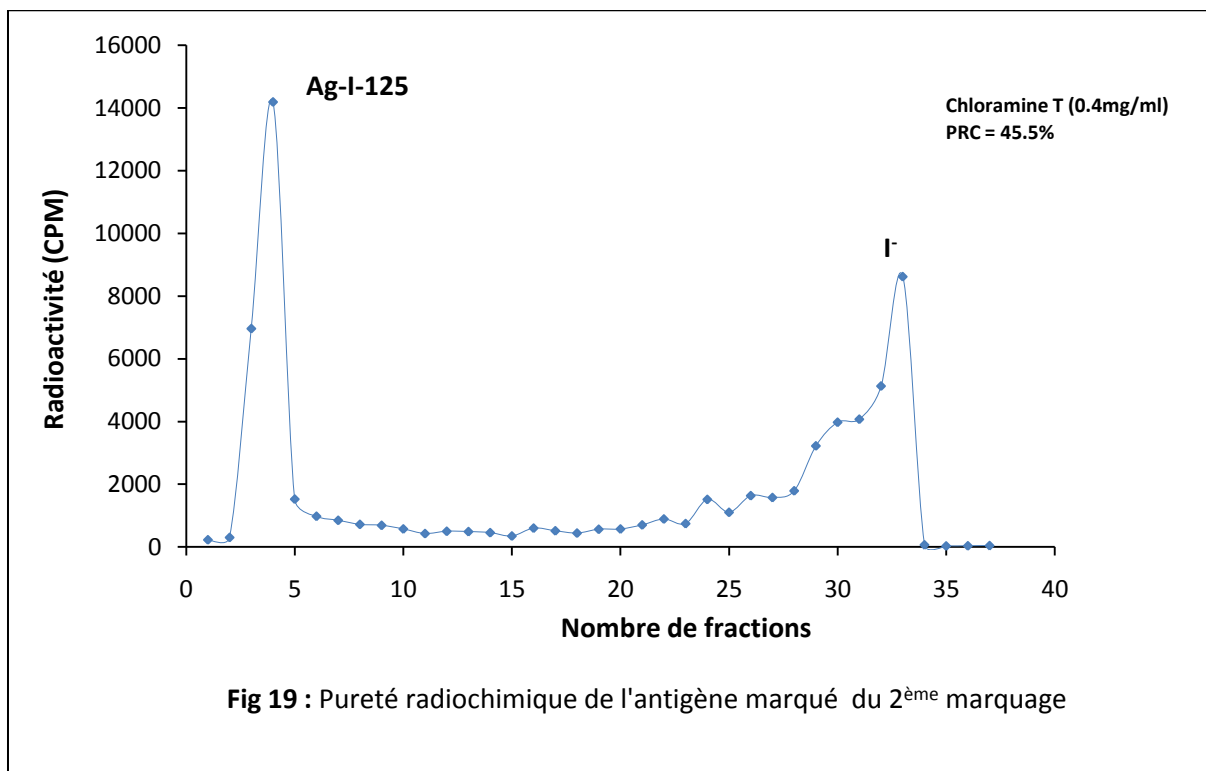
Dans le but d'obtenir des traceurs les plus purs possible, les fractions d'élution de l'Ag marqué obtenues des différents marquages et présentant les plus hautes activités ont été poolées. Les éluats de l'antigène marqué du 4^{ème} marquage qui a donné le plus grand rendement ont été fractionnés en deux F_{4(a)} et F_{4(b)} afin d'augmenter mieux la pureté radiochimique (Tableau 6).

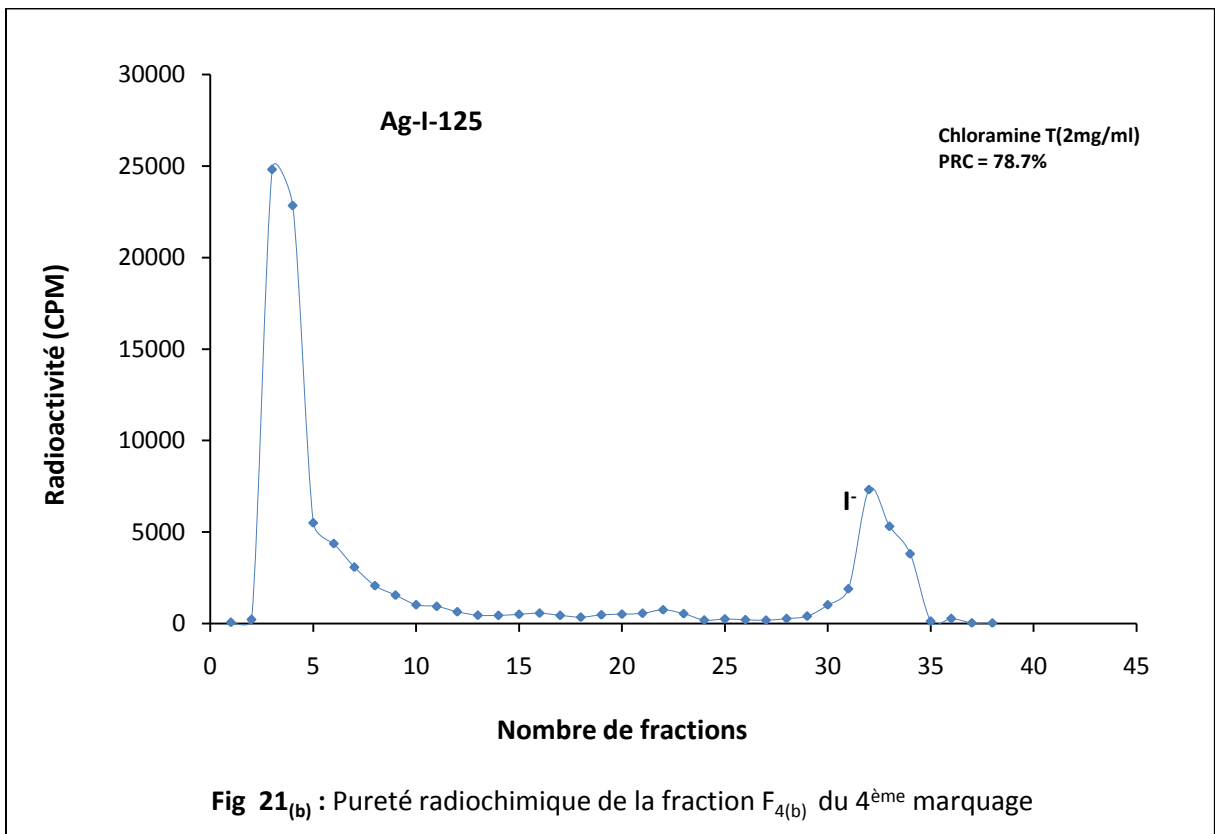
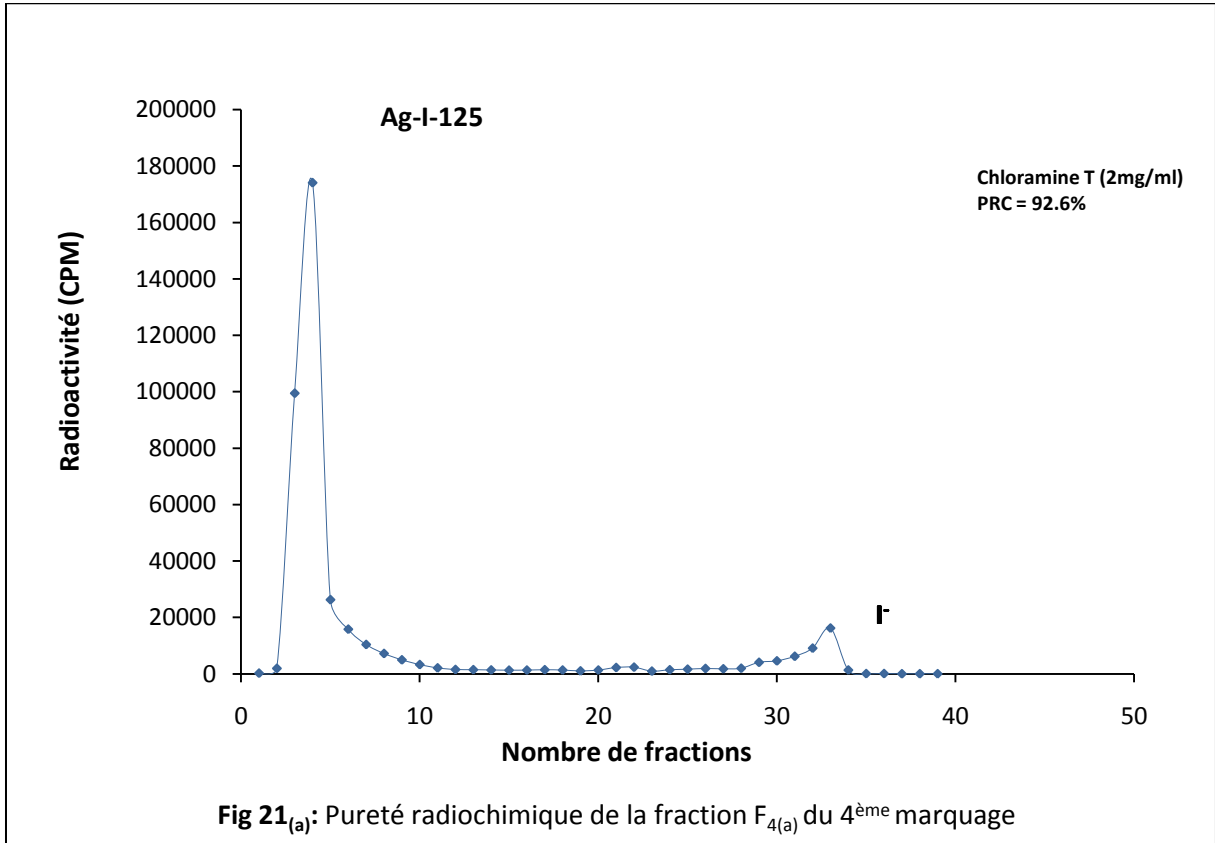
Tableau 6: Pureté radiochimique du traceur issu des différents marquages

N°de marquage	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄		M ₅
Fractions poolées	F ₁	F ₂	F ₃	F _{4(a)}	F _{4(b)}	F ₅
Radioactivité mesurée (CPM/10µl)	-	5,5 10 ⁵	7 10 ⁵	9,5 10 ⁵	2,8 10 ⁵	4,5 10 ⁵
PRC(%)	-	45.5	85.6	92.6	78.7	-

La PRC de l'Ag marqué a été contrôlée par chromatographie sur papier (ITLC-SG) utilisant comme éluant un mélange de méthanol/eau (85/15). Les chromatogrammes obtenus (Figures 19, 20, 21_(a), 21_(b)), révèlent la présence de 2 pics dont le premier est caractéristique du traceur. Dans ces conditions, les iodures (¹²⁵I) migrent au front du solvant tandis que la protéine marquée est à proximité du point de dépôt.

Les PRC des fractions de l'antigène marqué du 2^{ème} et du 3^{ème} marquage sont respectivement de 45.5% et 85.6%. Les pourcentages de 92.6% et 78.7% représentent respectivement les PRC des fractions F_{4(a)} et F_{4(b)} du 4^{ème} marquage (Tableau 6).





2- Activité spécifique

Les activités spécifiques des traceurs des différents marquages effectués sont portées sur le Tableau 7. La meilleure activité spécifique de l'antigène marqué est de 11.7 μ Ci/ μ g obtenu avec le 4^{ème} marquage.

Tableau 7: Activité spécifique du traceur issu des différents marquages

N° du marquage	Activité spécifique (μ Ci/ μ g)
M ₂	2.88
M ₃	7.17
M ₄	<u>11.7</u>
M ₅	4.18

3- Activité volumique

Les valeurs des activités volumiques mesurées pour le 3^{ème} et 4^{ème} marquage sont rapportées dans le Tableau 8. La fraction F_{4(a)} du 4^{ème} marquage a donné une activité plus élevée de l'ordre de 52.05 μ Ci/ml.

Tableau 8 : Activité volumique du traceur issu des différents marquages

N° du Marquage (fraction)	Activité volumique (μ Ci/ml)
M ₃ (F ₃)	38.83
M ₄ (F _{4(a)})	<u>52.05</u>
M ₄ (F _{4(b)})	15.51

4- Immunoréactivité

L'immunoréactivité a été contrôlée par la technique RIA par la détermination du pourcentage de liaison non spécifique du traceur B₀/T et le pourcentage de liaison spécifique B/T vis-à-vis du sérum de lapin immunisé par l'antigène purifié et des sérums de malades atteints par l'hydatidose.

4-1- Liaison non spécifique « LNS »

L'étude du pourcentage de fixation non spécifique réalisé sur 3 traceurs obtenus à partir du 3^{ème} et 4^{ème} marquage a montré que les valeurs du LNS (B₀/T) étaient très élevées, variant entre 19 et 23% (Tableau 9).

Tableau 9 : Détermination de la liaison non spécifique

fraction (N° du marquage) % de fixation	fraction F ₃ (M ₃)	fraction F _{4(a)} (M ₄)	Fraction F _{4(b)} (M ₄)
B ₀ /T (%)	19	22.9	21.8

Ce résultat nous a mené à revoir la technique RIA afin d'étudier l'effet de certains paramètres tels que la composition du tampon d'essai et les agents de précipitation des formes liées (Ac-Ag marqué) et libres (Ag marqué).

Pour la suite des essais, nous avons choisi parmi les traceurs étudiés celui de la fraction F_{4(a)} issu du 4^{ème} marquage qui a présenté une meilleure PRC et une activité spécifique élevée.

▪ **Composition du tampon d'essai**

Le tampon d'essai utilisé pour la technique RIA est composé de phosphate à 0.05 M additionné de 0.3% de sérum bovine albumine (BSA). Nous avons tenté de voir l'effet de la concentration de BSA sur le pourcentage de fixation non spécifique.

La variation de la concentration de BSA n'a apporté aucun changement au pourcentage de liaison non spécifique. Le tableau10 montre ces valeurs qui sont de même ordre pour les 4 concentrations.

Tableau 10 : Effet de la variation de la concentration de BSA sur le LNS

Concentration de BSA (%) % de fixation	0	0.1	0.3	3
B ₀ /T (%)	24	24	24	23

▪ **Effet des agents de précipitation**

Le pourcentage de fixation non spécifique obtenu avec le PEG8000 à 22% et le PEG4000 à 23% paraît semblable pour deux concentrations variables de BSA (Tableau 11).

Tableau 11: Effet de la concentration du PEG sur le LNS

PEG % de fixation	PEG 8000 (22%)		PEG 4000 (23%)	
	0,3% de BSA	3% de BSA	0,3% de BSA	3% de BSA
B ₀ /T (%)	23	-	24	23

Le tableau représenté ci dessous montre aussi l'effet de la variation du volume du PEG et de la gamma globuline (γ G) sur la précipitation du traceur libre et donc sur le taux de fixation non spécifique (LNS).

Les résultats des essais montrent que lorsqu'on diminue le volume de la γ G, cela entraîne une diminution de la liaison non spécifique. Quant à l'augmentation du volume du PEG, aucun effet n'a été observé (Tableau12).

Tableau 12 : Effet de la variation du volume des agents de précipitation

PEG (ml)	γ G (μ l)	B ₀ /T (%)
1	100	24
1	50	21
1	25	<u>16</u>
1.5	25	<u>16</u>
1.5	50	20.9

4-2-Liaison spécifique (B/T)

4-2-1- L'immunoréactivité vis-à-vis de l'immun-sérum de lapin immunisé par l'antigène purifié

L'immun-sérum positif obtenu après immunisation du lapin par l'antigène 5 a été utilisé pour tester la liaison spécifique B/T. Le titre de cet immun-sérum qui est de 16000 a été déterminé par la technique d'hémagglutination passive au niveau du service de parasitologie de l'IPA.

Le test de positivité a été réalisé avec des immun-sérums bruts et dilués. Un sérum prélevé de lapin sain a été utilisé comme témoin négatif pour les tests RIA.

Les résultats exprimés par la moyenne de B/T montrent un pourcentage de liaison satisfaisant et significatif vis-à-vis de l'immun-sérum brut et dilué (Tableau 13) par rapport à

Résultats et discussions

celui du sérum négatif. Le seuil de positivité déterminé dans notre cas à partir du témoin négatif peut être estimé à une valeur supérieure à 10%.

Tableau 13 : Test de l'immunoréactivité du traceur vis-à-vis de l'immun-sérum de lapin

PEG(ml)	γ G(μ l)	B ₀ /T(%)	S ^L (%)	S ^L _{1/100} (%)	S ^L _{1/1000} (%)	S ⁻ (%)	S ⁻ _{1/100} (%)
1	25	16	63	29.5	13	9.6	3.7
1.5	25	16	57	-	-	6.8	-

S^L : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin brut

S⁻_{1/100} : % de liaison avec le témoin négatif dilué à 1/100

S^L_{1/100} : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin dilué à 1/100

S⁻ : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin négatif

S^L_{1/1000} : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin dilué à 1/1000

• Effet de la variation du volume du traceur

L'effet de la variation du volume du traceur sur la réaction (Tableau 14) montre que les valeurs du pourcentage de liaison spécifique sont de même ordre même si le volume est doublé.

Tableau 14: Effet de la variation du volume du traceur sur l'immunoréactivité

Traceur : 100 μ l					Traceur : 200 μ l				
PEG (ml)	γ G(μ l)	B ₀ /T(%)	S ^L (%)	S ⁻ (%)	PEG (ml)	γ G(μ l)	B ₀ /T(%)	S ^L (%)	S ⁻ (%)
1	25	16	63	9.6	1	25	15.6	60	9
1.5	25	16	57	6.8	1.5	25	16	58	7.7

S^L : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin brut

S⁻ : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin négatif

4-2-2- L'immunoréactivité vis-à-vis des sérums de malades atteints par l'hydatidose

Par ailleurs, le test RIA réalisé sur des sérums de malades positifs atteints par l'hydatidose, mis à notre disposition par le service de parasitologie de l'IPA révèle une très faible immunoréactivité par rapport au sérum humain négatif. Les résultats du test sont portés dans le tableau 15.

Résultats et discussions

Tableau 15 : Test de l'immunoréactivité du traceur vis-à-vis des sérums de malades

		Traceur : 100 µl		
$B_0/T(\%)$	$S_1^H(\%)$	$S_2^H(\%)$	$S_3^H(\%)$	$S_H^-(\%)$
16	16.5	18.6	16	14.5
		Traceur : 200µl		
$B_0/T(\%)$	$S_1^H(\%)$	$S_2^H(\%)$	$S_3^H(\%)$	$S_H^-(\%)$
15.6	14	18.7	15.66	13.5

$S_{1,2,3}^H$: % de liaison avec les sérums de malades

S_H^- : % de liaison avec le sérum humain négatif (témoin négatif)

B_0/T : Liaison non spécifique

- ***Effet des conditions de conservation des immun- sérums sur l'immunoréactivité***

Dans le but de trouver une explication aux résultats précédents, l'effet des conditions de conservation des immun-sérums (duré, température, présence ou non de conservateur) sur l'immunoréactivité du traceur a été étudié.

Deux immun-sérums de lapin ont été mis en vis-à-vis du traceur. Ces sérums présentent un même titre de 16000 (testés juste après leur prélèvement) sauf que leurs conditions de conservation sont différentes (Tableau ci-dessous).

Tableau N° 16 : Tableau montrant les conditions de conservation des sérums testés en RIA

Sérums	Sérum de lapin (S_L^A)	Sérum de lapin (S_L^R)	Sérums humains
Conditions de conservation			
Duré de conservation	2 mois	1 jour	6 mois à 1 an
Température	+4°C	+4°C	+4°C
Agent de conservation	-	Azide de sodium	-

Les résultats du test RIA rapportés sur le Tableau 17 montrent que le pourcentage de liaison vis-à-vis de l'immun-sérum de lapin S_L^A est faible par rapport à celui de l'immun-sérum récent S_L^R .

Résultats et discussions

Tableau 17: Test de l'immunoréactivité du traceur vis-à-vis des immun-sérums de lapin

Traceur : 100 μ l			
$B_0/T(\%)$	$S_L^A(\%)$	$S_L^R(\%)$	$S_L^-(\%)$
16	<u>24.5</u>	<u>63</u>	9.6
Traceur : 200 μ l			
$B_0/T(\%)$	$S_L^A(\%)$	$S_L^R(\%)$	$S_L^-(\%)$
15.6	<u>22.9</u>	<u>60</u>	9

S_L^A : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin (ancien)

S_L^R : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin (récent)

S_L^- : % de liaison avec l'immun-sérum de lapin négatif (témoin négatif)

B_0/T : Liaison non spécifique

En parallèle, le titre des sérums de malades utilisés en RIA a été recontrôlé (tests réalisés au niveau du service de parasitologie de l'IPA). Les résultats révèlent que le facteur de dilution diminue de l'ordre de 87% par rapport à celui obtenu lors du premier test (test d'hémagglutination passive).

Discussion

Le radiomarquage des anticorps monoclonaux a débuté en 1970 pour la détection de tumeurs, puis la synthèse de nouveaux ligands pour la médecine nucléaire s'est orientée vers des structures protéiques et peptidiques. Initialement, le marquage était réalisé à l'iode radioactif.

La fixation de l'iode au substrat organique modifiant peu la structure de la molécule du fait de son faible encombrement stérique, il est utilisé essentiellement pour le marquage de petites molécules et des ligands de récepteur afin de limiter les interactions avec les sites de reconnaissance et les modifications des propriétés pharmacocinétiques de la molécule biologique.

La deuxième étape de ce travail a accordé un intérêt, d'abord à l'étude du marquage de l'Ag 5 purifié à l'iode-125 ensuite à l'évaluation de la qualité du traceur obtenu.

La réaction de marquage doit être définie et contrôlée afin de préparer un traceur avec une bonne activité spécifique. Elle doit présenter un bon rendement de marquage et la pureté radiochimique de ce traceur actif doit être supérieure, si possible, à 90% afin d'éviter une étape de purification supplémentaire difficilement réalisable en routine.

L'hydrolyse acide de la fraction 5 a mis en évidence les principaux acides aminés essentiels [86]. La présence des acides aminés aromatiques tels que la tyrosine et l'histidine (entrant dans la composition de cette molécule) a porté notre choix vers un marquage à l'iode par oxydation à la chloramine-T

La réaction d'iodation par la chloramine-T est la méthode de choix pour de nombreux composés contenant une structure phénolique [74]. Simple, facile peu coûteuse, elle est réalisée par addition de cet oxydant et du NaI^{125} en présence du substrat puis incubation à température ambiante. La réaction est rapide, elle est stoppée par adjonction d'un réducteur, le pyrosulfite de sodium.

L'étude de l'effet de l'un des paramètres de la réaction d'iodation qui est la concentration en chloramine-T a montré une amélioration remarquable du rendement de marquage allant de 13.96% jusqu'à 63% respectivement pour des concentrations en chloramine-T de 0.4 à 2mg/ml. Il a été constaté aussi, qu'une concentration supérieure à 2 mg/ml entraîne une diminution du rendement à une valeur de 23.5%. Ceci est une conséquence d'éventuels

dommages causés par la chloramine-T qui est un oxydant fort, susceptible de dégrader les protéines [63, 69] .

La spécificité et la sensibilité d'un dosage radioimmunologique sont liées directement à la qualité du traceur. Dans le but de séparer ce dernier des différents contaminants présents dans le milieu réactionnel (molécules endommagées, chloramine-T, métabisulfite, l'iode libre...) et augmenter ainsi sa pureté radiochimique, le traceur a été purifié par gel filtration sur séphadex G25 (choisi selon le domaine de fractionnement) avec un débit de 0.7ml/h à raison de 700 μ l par tube.

Les essais de radiomarquage pour de faibles concentrations de chloramine-T n'ont pas permis d'obtenir une pureté radiochimique suffisante. Dans ces conditions, il aurait fallu peut être augmenter la durée de la réaction. Une pureté de 92.6% est atteinte avec 2 mg/ml de chloramine-T, soit une activité spécifique de 11.7 μ Ci/ μ g. La valeur de PRC se trouve dans la limite requise par les normes ($\geq 90\%$). Cette fraction $F_{4(a)}$ est choisie pour l'évaluation de l'intégrité immunologique de l'antigène marqué.

Plusieurs méthodes de séparation ont été développées, mais l'idéal est de trouver une méthode efficace, simple, reproductible, rapide et moins couteuse. Pour notre cas, nous avons choisi une méthode simple par séparation chimique (précipitation au polyéthylène glycol) [115].

Les résultats du contrôle d'immunoréactivité ont montré que le pourcentage de liaison non spécifique (LNS) était très élevé.

Afin de diminuer ce pourcentage à une valeur qui répond à une norme tolérable, nous avons procédé à introduire des changements sur quelques paramètres impliqués dans le protocole. Les résultats ont montré qu'une diminution dans le volume de la gamma globuline (γ G) a permis d'obtenir un pourcentage de liaison non spécifique de l'ordre de 16%. Selon les travaux réalisés par plusieurs auteurs, cette liaison peut prendre des valeurs très faibles comme elle peut atteindre des valeurs extrêmes de l'ordre de 29% mais qui restent acceptables tant que la liaison spécifique est élevée.

Ce pourcentage de 16% pourrait éventuellement être amélioré en essayant d'introduire d'autres changements :

- Une diminution dans la concentration du PEG qui est probablement forte ce qui a entraîné une diminution de la solubilité de la molécule marquée [115].
- Essayer de changer probablement la solution tampon par une autre tel que le véronal ou le borate de sodium qui présente une zone de pH proche de 8.5, ce qui va favoriser peut être une meilleure solubilité de la molécule marquée (plus la différence entre le pH du milieu et le pHi de la molécule marquée est grande plus la solubilité devient importante).
- PEG qui est probablement non adapté à ce type de traceur et qui selon certains auteurs [21] donne une liaison non spécifique élevée.
- Utilisation d'un autre système de séparation plus efficace et simple telle que le coating des anticorps sur tube en polystyrène.

En ce qui concerne la liaison spécifique du traceur, (B/T) une bonne réactivité a été observée vis-à-vis du sérum de lapin immunisé par l'antigène purifié obtenu après le premier rappel. Ce résultat qui semble être satisfaisant est la conséquence :

- D'une part, de la bonne réponse du lapin à l'antigène purifié
- D'autre part, de la conservation de l'intégrité antigénique de la molécule marquée.

L'immunoréactivité du traceur vis-à-vis des sérums de malades atteint par l'hydatidose a révélé une faible liaison spécifique. Ce résultat a été montré qu'il était du aux mauvaises conditions de conservation des sérums impliquées dans les tests RIA. D'après la bibliographie, ils préconisent de conserver les échantillons entre 2-8°C si le dosage est effectué dans les 24 heures qui suivent le prélèvement, dans le cas contraire, il est préférable de les conserver en aliquotes à -20°C.

Ceci a été observé dans notre étude qui a montré une diminution du pourcentage de liaison vis-à-vis de l'immun-sérum de lapin (testé après deux mois de conservation à +4°C à partir de la date du prélèvement) de l'ordre de 61% par rapport à celui obtenu avec l'immun- sérum récent (testé après un jour de conservation à +4°C). Ceci pourrait être expliqué par une éventuelle dénaturation des anticorps (changement dans la conformation du paratope de l'anticorps) qui a engendré une perte de spécificité ou probablement à la présence de contaminants qui ont réagit de manière non spécifique avec ces anticorps présents.

Cette hypothèse a été consolidée après vérification par la technique d'hémagglutination passive du titre des sérums humains utilisé en RIA dont la durée de conservation dépasse les 6 mois. Les résultats obtenus ont montré effectivement que le facteur de dilution devient 8 fois inférieur à celui obtenu lors du premier test (diminution de l'ordre de 87%), ce qui explique alors le faible pourcentage de liaison.

Il ressort de ces résultats, qu'une grande attention doit être accentuée sur la manière de conservation des immun-sérums utilisés dans les tests de dosage notamment les tests radioimmunologiques et probablement à leurs origine (sérum humain est plus complexe que celui du lapin qui nécessite éventuellement un traitement avant son utilisation).

Une autre hypothèse pour expliquer cette faible immunoréactivité vis-à-vis des sérums de malade par rapport à ceux des lapins est la présence probable d'impureté dans l'antigène purifié qui est l'albumine humaine. Cette protéine a été décrite par plusieurs auteurs comme étant une des impuretés provenant de l'hôte qui se trouve avec une forte concentration [116].

Le marquage radioactif est une étape primordiale qui permet de conditionner la spécificité et la sensibilité des tests qui sont étroitement dépendants de la nature de l'antigène marqué.

La présence susceptible de cette impureté avec l'antigène 5 peut facilement avoir une influence sur le rendement de marquage autrement dit le pourcentage de fixation de l'iode à cette fraction.

Les travaux réalisés sur le marquage du liquide hydatique (l'antigène total) du mouton ont montré que l'albumine marquée se présente avec une proportion majeure par rapport à la totalité des antigènes [92]. Si cette hypothèse est vraie, la faible réactivité du traceur vis à vis du sérum de malade pourrait être expliquée :

- Par la présence dans le milieu réactionnel d'un faible taux d'antigène 5 marqué (la réaction de marquage de l'albumine est probablement plus favorisée par rapport à celle de l'antigène 5 du fait de l'accessibilité des acides aminés mis en jeu dans la réaction d'iodation).
- Par la forte concentration en chloramine-T qui a engendré la rupture des ponts disulfures liant les deux sous unités de la fraction 5 [92]. Cette dissociation a été déjà décrite par Jackson [73] qui a montré que cet effet peut conduire à l'apparition de nouveaux déterminants antigéniques et donc à une perte de l'activité immunologique

des protéines. Dans ces conditions, il aurait fallu peut-être tester l'intégrité antigénique des traceurs obtenus avec les concentrations faibles en chloramine-T avant de passer aux fortes concentrations.

- Par une forte activité spécifique qui a engendré une dégradation importante de l'antigène 5 induite par les effets de la radiolyse [117] et qui se manifeste par l'accroissement du LNS et d'une diminution de la liaison spécifique [118].
- Ou alors par une faible activité spécifique qui a entraîné un faible rendement de détection et donc une faible sensibilité du dosage [118].

Ces résultats sont cependant susceptibles d'être sans doute largement améliorés dans le futur en essayant d'une part d'introduire quelques techniques qui vont permettre d'obtenir un antigène avec un degré de pureté acceptable et d'autre part, essayer d'optimiser la réaction de marquage tout en jouant sur plusieurs paramètres tels que la concentration en chloramine-T, en substrat, le pH du milieu et même la durée du marquage.

Ces essais vont se poursuivre alors jusqu'à définir toutes les conditions optimales qui vont permettre de préparer un traceur avec une bonne activité spécifique et une pureté radiochimique élevée pour pouvoir l'utiliser dans les dosages radioimmunologiques.

CONCLUSION

CONCLUSION

Ce travail préliminaire portant sur la valorisation d'un déchet biologique en vue de préparer un traceur radioactif « Ag5-I¹²⁵ » a fait l'objet de plusieurs techniques à savoir la gel filtration qui nous a permis de visualiser les différentes fractions protéiques du liquide hydatique, la précipitation au sulfate d'ammonium qui a donné un meilleur rendement de purification de l'antigène 5 à 70% de saturation en sulfate d'ammonium et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) qui a mis en évidence cet antigène avec un poids moléculaire de 66KDa.

Son pouvoir antigénique testé par immunoelectrophorèse a permis aussi de révéler un seul arc de précipitation typique à l'antigène 5(arc 5) et a montré une bonne immunogénicité suite à la réponse des lapins.

L'essai de radiomarquage de l'antigène à l'iode 125 a permis d'atteindre un rendement satisfaisant de l'ordre de 63% correspondant à une concentration en chloramine T de 2mg/ml.

Après une évaluation du traceur obtenu, ce dernier s'estime avec une pureté radiochimique acceptable de 92.6% et une activité spécifique de 11.7 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

L'étude de l'intégrité antigénique du traceur a montré une liaison non spécifique de 16%. Une bonne réactivité de l'ordre de 63% a été obtenue contre les anticorps de lapin immunisés par l'antigène purifié contrairement à celle testée vis-à-vis des sérums de malades qui se présente avec un faible pourcentage.

Ces essais seront cependant poursuivis avec une grande attention qui doit être accentuée sur la manière de conservation des sérums utilisés dans ces tests de dosage. Quelques techniques devront être aussi introduites dans la procédure de purification afin d'améliorer la pureté de l'antigène à marquer.

Les conditions de marquage de l'antigène 5 à l'iode 125 doivent être aussi bien défini, en essayant d'optimiser à la fois tous les paramètres (concentration de l'antigène, la concentration en chloramine T, la durée de marquage et le pH de la réaction) afin d'améliorer l'activité spécifique du traceur pour une meilleure sensibilité du dosage RIA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Craig P. S. and Richard. M. D. (1981).** Studies on the specific immunodiagnosis of larval cestode infection of cattle and sheep using antigens purified by affinity chromatography in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Int. J. Parasitol.* 11 : 441-449.
2. **Yarzabal L.A., Schantz, P.M. and Lopez-Lemes, M.H.(1975).** Comparative sensitivity and specificity of the casoni intradermal and immunoelectrophoresis test for the diagnosis of the hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24 :843-848.
3. **Lamy L. H. (1980).** Protozoaires et Helminthes parasites. 3^{ème} Edition.
4. **Thompson R. C. A. (1986).** Biology and systematics of echinococcus : 5-44 in Thompson. R. C. A. (Ed). *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease.* London, George Allen et Unwin.
5. **Thompson R. C. A. (1995).** Biology and systematics of echinococcus : 1-43 in Thompson. R. C. A. (Ed). *The Biology of Echinococcus and Hydatid Disease.* London, George Allen et Unwin.
6. **Thompson R. C. A. and Lymbery. A. J. (1990).** Echinococcus : biology and strain variation. *Int. J. Parasitol.* 20. (4) :457-469.
7. **Association française des enseignants (1997).** Parasitologie-Mycologie. Edition ANNOFEL.
8. **Nozais J.P., Darty. A. et Danis. M. (1996).** Traité de parasitologie médicale. *Edition Pradel*
9. **Acha. P. et Szyfres. B. (1989).** Zoonose et maladies transmissibles communes à l'homme et aux animaux. *Edition Office National des Epizooties.*
10. **Houin R., Flisser. A. et Liance. M. (1994).** Cestodes larvaires : Cestodoses larvaires. *Encyclopedie chirurgico-médicale* 8-511-A-10
11. **Vidor E., Piens M. A., Abbas M., Petavy A. F. (1986).** Biochimie du liquide hydatique (*Echinococcus granulosus*). Influence de la localisation sur la perméabilité des kystes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 61. (3) :334-340
12. **Okelo G. B. A. (1986).** Hydatid disease : research and control in Turkana : III-Albendazole in the treatment of inoperable hydatid disease in Kenya-a report on 12 cases. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* 80 (2) : 193-195.
13. **Williams J. F., Perezesandi M. and Oriol R. (1971).** Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20. (4) : 575-579
14. **Dottorini S. and Tassi C. (1977).** *Echinococcus granulosus* : Characterization of the main antigenic component (arc 5) of hydatid fluid. *Exp. Parasitol.* 43 : 307-314
15. **González-Sapienza G. and Cachau R. (2003).** "Identification of critical residues of an immunodominant region of *Echinococcus granulosus* antigen B." *J. Biol. Chem.* 278:20179-20184.
16. **Gonzalez G., Nieto .A., Fernandez C., Orn A., Wernstedt C., and Hellman U.(1996).** Two different 8 kDa monomers are involved in the oligomeric organization of the native *Echinococcus granulosus* antigen B. *Parasite Immunol.* 18:587-596
17. **Gonzalez-Sapienza G., Lorenzo C., and Nieto A. (2000).** Improved immunodiagnosis of cystic hydatid disease by using a synthetic peptide with higher diagnostic value than that of its parent protein, *Echinococcus granulosus* antigen B. *J. Clin. Microbiol.* 38:3979-3983.
18. **Lorenzo C., Ferreira H.B., Monteiro K.M., Rosenzvit M., Kamenetzky L., García H.H., Vasquez Y., Naquira C., Sánchez E., Lorca M., Contreras M., Last J.A. and González-Sapienza G.G. (2005).** Comparative analysis of the diagnostic performance of six major *Echinococcus granulosus* antigens assessed in a double blind randomized multi-center study. *J. Clin. Microbiol.* 43:2764-2770.
19. **Golvan Y. J. (1984).** Eléments de parasitologie médicale. 4^{ème} Edition Flammarion Médecine Science : 119-130.

20. **Gemmell M. A. (1990).** Australasian contributions to an understanding of the epidemiology and control of hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*-past, present and futur. *Int. J. Parasitol.* 20. (4) : 431-456.
21. **Rausch R.L.(1985).** Parasitology : retrospect and prospect. *Journal of Parasitology* 71:139-151
22. **Lymbery A. J., Thompson. R. C. A.. (1988).** Electrophoretic analysis of genetic variation in *Echinococcus granulosus* from domestic hosts in Australia. *Int. J. Parasitol.* 18. (6) :803-811
23. **Kumaratilake. L. M., Thompson. R. C. A., Eckert. J., Alekssandro A. D.(1986).** Sperm transfer in *Echinococcus* (cestoda : Taeniidae). *Zeitschrift Für Parasitenkund* 72 :265-269.
24. **Lymbery A. J., Hobbs R.P. and Thompson. R. C. A. (1989).** The dispersion of *Echinococcus granulosus* in the intestine of dogs. *Journal of Parasitology* 74 :562-570
25. **Atek. M. et col. (1997).** Situation épidémiologique de l'année 1997 sur la base des cas déclarés à l' INSP. *Relevé. Epidémiologique Mensuel (INSP)*. VIII. (13)
26. **Develoux M. (1996).** L'hydatidose en Afrique en 1996 : aspects épidémiologiques. *Med. Trop.* 56 : 177-183.
27. **Rausch R. L. (1997).** *Echinococcus granulosus* : Biology and Ecology. Andersen. F. F. L., Ouheli. H., Kachani. M, eds. *Compodium on Cystic Echinococcosis. In Africa and Middle Eastern Countries With Special Reference to Morocco*. Provo, UT : Brigham Young University Press : 18-53.
28. **Euzeby J. (1990).** Actualisation de l'épidémiologie de l'hydatidose. Les échinococques hydatigènes: spéciation; cycle biologique; conséquences épidémiologiques. *Bul. Acad. Nat. Med.* 174. (4) : 571-582.
29. **Gentilini M., Duflo B. et Danis M. (1986).** Médecine tropicale. *Edition Flammarion. Médecine science.*
30. **Andersen. F. L. (1997).** Introduction to cystic echinococcosis and description of cooperative research project in Morocco. Andersen. F. L., Ouheli. H., Kachani. M, eds. *Compodium on cystic echinococcosis. In Africa and Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco*. Provo, UT : Brigham Young University Press : 1-17
31. **Bach J-F. et Lesavre P. (1981).** Immunologie. *Edition Flammarion médecine sciences.*
32. **Barbieri M., Fernandez V., Gonzalez G., Luaces V. M., and Nieto A. (1998).** Diagnostic evaluation of a synthetic peptide derived from a novel antigen B subunit as related to other available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis. *Parasite Immunol.* 20:51-61.
33. **Rosenzvit M.C., Camicia F. and Kamenetzky L.(2006).** Identification and intra-specific variability analysis of secreted and membrane-bound proteins from *Echinococcus*. *Parasitology International* 55 : S63-S67.
34. **Zhang L.H., Leggatt G.R. and McManus D.P. (1995).** Further characterization of the 38 ka antigen from *Echinococcus granulosus* (hydatid disease) cyst fluid: evidence for antigenic heterogeneity and reactivity with anti-P1 antibodies. *Parasite Immunol.* 17(6):287-96.
35. **Biava M. F. et Kurés L. (1990).** Diagnostic biologique des échinococcoses. *Rev.Prat.* 40. (3) : 201-204.
36. **Craig P. S. (1997).** Immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* and a comparison of technique for diagnosis of canine echinococcosis. Andersen. F. L., Ouheli. H., Kachani. M, eds. *Compodium ON Cystic Echinococcosis. In Africa and Middle Eastern Countries with Special Reference to Morocco*. Provo,UT : Brigham Young University Press : 85-118.
37. **Wen H., Craig P. S. (1994).** Immunoglobuling subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51. (6) :741-748.

38. **Afferni C., Pini C., Misiti-Dorello P., Bernardini L., Conchedda M. and Vicari G. (1984).** Detection of specific IgE antibodies in sera from patients with hydatidosis. *Clin Exp Immunol.* **55**(3):587–592.
39. **Craig P. S., Zeyhel E. et Romig T. (1986).** Hydatid disease : research and control in turkana, Kenya : II-The role of immunological technique for the diagnosis of hydatid disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80.** (2) : 183-192
40. **Pinon J.M., Poirriez J., Lapan H., Geers R., Penna R. and Fernandez D. (1987).** Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by enzyme-linked immunofiltration assay. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**(3):291–295.
41. **Touil C. (1986).** Production, purification de l'interferon. *Thèse de Magister.*
42. **Touil C., Wietzerbin. J., Sanceau. J. and Tayebi. B. (1991).** Detection et caractérisation d'une activité interféron type $\alpha\beta$ et de deux cytokines TNF_{α} et IL_6 au cours de l'hydatidose humaine. *J. Algerien. Med.* **1** :18-20.
43. **Rigano R., Profumo E., Difelice G. Ortona E., Teggi A. and Siracusano A. (1995)_a.** In vitro production of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from hydatid patients. *Clin. Exp. Immunol.* **99** : 433-439.
44. **Rigano R., Profumo E., Ioppolo S., Notargiacomo S., Ortona E., Teggi A. and Siracusano A. (1995)_b.** Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin. Exp. Immunol.* **102** :281-285.
45. **Torcal J., Navarro-Zorraquino M., Lozano R., Larrad L., Salinas J. C., Ferrer J. (1996).** Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin. Exp. Immuno.* **106** : 317-322.
46. **Bourré P.** Aide-Mémoire de Parasitologie et de Pathologie Tropicale. *3ème édition Flammarion. Médecine-sciences.*
47. **Eckert J., and Deplazes P. (2004).** Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:107–135.
48. **Morar R. and Feldman C.(2003).** Pulmonary echinococcosis. <https://doi.org/10.1183/13659075.21106977>. *FNI Eur. Respir. J.* **21** : 1069-77.
49. **Amrani M., Zouaidia F., Belabbas M.A., Labrousse F., Catanzano G., Elhachimi A.(2000).** Hydatidose : à propos de quelques localisations inhabituelles. *Med. Trop.* **60** : 271-272.
50. **Schantz M.R. (2006):** Progress in diagnosis, treatment and elimination of echinococcosis L., Ouheli. H., Kachani. M, eds. *Compodium on Cystic Echinococcosis. In Africa and Middle Eastern Countries With Special Reference to Morocco.* Provo, UT : Brigham Young University Press : 18-53
51. **Belkaid M., Tabet Derraz O., Hamrioui B., Zenaidi N. et Bahbou M. (1992).** Diagnostic de laboratoire en parasitologie. *Tome 1.*
52. **Carmena D., Martinez J., Benito A. and Guisantes J.A. (2004).** Characterisation of excretory-secretory product from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potentiel for immunodiagnosis of human cystic echinococcus. *Parasitology* **129**(3) : 371 -378.
53. **Zhang W., Li J., and McManus D. P. (2003).** Concepts in immunology and diagnosis of hydatid disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:18–36.
54. **McManus D.P, Zhang. W, Jun. Li, Bartley P.B.(2003).** Echinococcosis *Lancet.* **362**:1295-304.
55. **Okelo G. B. A. (1986).** Hydatid disease : research and control in Turkana : III-Albendazole in the treatment of inoperable hydatid disease in Kenya-a raport on 12 cases. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* **80** (2) : 193-195.
56. **Ba J.I, Yazdanpanah Y., Ajana F. et Nguyen S.(2004) :** Hydatidose pulmonaire : prise en charge médicochirurgicale. *La Revue de Médecine Interne* ; **25** : 248-50.

57. **El-On J. (2003).** Benzimidazole treatment of cystic echinococcosis. *Acta. Trop.* 85 : 243-52.
58. **Kammerer W.S. and Schantz M.R.(1993).** Echinococcal disease. *Infect..Dis. Clin. North. Am.* 7 : 605-618.
59. **Hamrioui B. (1986).** Etude des composants du liquide hydatique, leur apport en hydatidologie. *Thèse de doctorat en science médicale. Algerie.*
60. **Apparu M. et Madelmont J.C. (1998).** Molécules marquées à l'iode radioactif. In: Comet M.,Vidal M. Radiopharmaceutiques - Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. *Presse Universitaire de Grenoble* : 249-87.
61. **Guerreau D. et Saccavini J.C.(1998).** Macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode.In : Comet M, Vidal M. Radiopharmaceutiques – Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. *Presse Universitaire de Grenoble*: 350-64.
62. **Pillai M.R.A. and Bhandarkar S.D.(1998).** Radioimmunoassay “Principles and practice”. *Third edition, India.*
63. **Conder GA, Andersen F.L. and Schantz P.M. (1980).** Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: an evaluation of double diffusion, immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal tests. *J. Parasitol.* 66(4):577-84.
64. **Grovenstein E.Jr et Coll.(1962).** *J. Am. Chem. Soc.*84 : 212
65. **Grovenstein E.Jr et Coll.(1973).** *J. Am. Chem. Soc.*95 : 4261
66. **Krohn K.A. et Coll.(1977).** *Biochim.Biophys.Acta.* 490 :497
67. **Mayberry W.E. et Coll. (1965).** *Biochemistry-U.S.* 4:2606.
68. **Bourdoiseau M.(1986).** Iodine radio-chemistry and radiopharmaceutical product labelling. *Nucl Med Biol.* 13(2):83-8.
69. **Robles A.M., Balter HS and al.(2001).** Improved radioiodination of biomolecules using exhaustive Chloramine-T oxidation. *Nucl. Med. Biol.* 28(8):999-1008.
70. **Bolton A.E. (1986).** Comparative methods for the radiolabeling of peptides. *Methods Enzymol.* 124: 18-29
71. **Palmer M.(1999).** Basics mechanisms of radiolabelling. Ln: *Textbook of radiopharmacy. Theory and practice*,3ed, ed. C.B. Sampson.Gordon and Breach Science publishers : 530.
72. **Regoezci E. (1987).** In Vivo Behavior of Catabolized labels derived from iodo proteins. Ln : *Iodine Labeled plasma proteins.* Vol II, Part B; CRC Press : 43-71.
73. **Jackson D.C.(1980).** Some effects of chloramines T induced radioiodination on the physicochemical properties of oligomeric proteins. *J. Immuno. Med.* 34: 253-260.
74. **Hunter W.M. and Greenwood F.C.(1962).** Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495-500.
75. **Paus E., Borner O., and Nustad K.(1982).** Radioiodination of proteins with the iodogen method.In radioimmunoassay and related procedures in medicine. *IAEA.SM.259.18.161.*
76. **Fracker P.J. et Coll.(1978).** *Biophys.Res.Commun.* 80:849
77. **Ünak T,Akgün Z, Yildiril A and al.(2001).** Self-radioiodation of iodogen. *Appl. Radiat .Isot.*54:749-52.
78. **Davison P.F.(1987).** A versatile procedure for the radioiodination of proteins and labelling reagents. *Biochim. Biophys. Acta.*926(2):195-202
79. **Thorell J.I. and Johansson B.G.(1971).** Enzymatic iodination of polypeptides with I¹²⁵ to high specific activity. *Biochemical.Biophys.Acta.* 251:363-369.
80. **Marchalonis J.J.(1969).** An enzymic method for the trace iodination of mmunoglobulins and other proteins. *Biochem.J.* 113 : 299-305.
81. **Karonen S.L.(1990).** Developments in techniques for radioiodination of peptides hormones and other proteins. *Scan.. J. Clin.. Lab. Invest..* 50(suppl 201):135-8.

82. Coenen H.H., Mertens J. & Mazière B.(2006). Radioionidation reactions for pharmaceuticals, compendium for effective synthesis strategies. *COST.Netherlands : Springer.*
83. Kamoun. P. (1987). Appareils et méthodes en biochimie. *Edition Flammarion.*
84. Wilson K. and Walker J. (1994). Principles and techniques of practical biochemistry. (4e éd) *Cambridge University Press. Oxford.*
85. Audigie C. L., Dupont G. et Zonszain F. (1995). Principes des méthodes d'analyse biochimique. *Edition Doin.*
86. Bradford M.M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 12, 248-254.
87. Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot WH. et Jones K.M. (1986). Tableau de saturation de sulfate d'ammonium et mode d'emploi. *Data for biochemical research*, Clarendon Press, Oxford : 537-8.
88. Dawson R.M.C., Elliot D.C., Elliot WH. et Jones K.M. (1986). Propriétés physicochimiques de nombreuses marques de gel: rétention d'eau ou de solvant, domaine de fractionnement et limite d'exclusion, stabilité, réactivité, etc. *Data for biochemical research*, Clarendon Press, Oxford, p. 514-9.
89. Belkaid M., Belazzoug S., Hamrioui B.(1982). Guide pratique du laboratoire de parasitologie.*OPU.*
90. Ait said L., Merghoub N.(1999). Contribution au développement des réactifs de base pour le dosage radioimmunométrique de l'hormone thyroïdienne humaine. *Mémoire d'ingénieur d'Etat en Génie Biologique.*
91. Al-Yaman F.M. and Knobloch J.(1989). Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37(1):101-7.
92. Lightowers M.W., Liu D.Y., Haralambous A. and Rickard M.D.(1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.*37(2):171-82.
93. Shepherd J.C. and McManus D.P.(1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25 :143-154.
94. Capron A., Vernes A & Biguet J. (1967) Dans : Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose in : Le kyste hydatique du foie.27-40, SIMEP.
95. Coltorti E.A. and Varela-Diaz V.M. (1978). Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* Ag5 antigens by the double diffusion .*Tran. R. Soc. Trop. Med.* 72: 226-229.
96. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bactériophage T4. *Nature* 227, 680.
97. Lorenzo C., Last J., Last J. and González-Sapienza G. (2005). The immunogenicity of *Echinococcus granulosus* Ag5 is determined by its post translational modifications. *Parasitology.*131(5) :669-677.
98. Musiani P., Piantelli M., Lauriola L., Arru E. and Pozzuoli R.(1978). *Echinococcus granulosus* : Specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. *Journal for Clinical Pathology* 31:475-478.
99. Oriol R., Williams. J. F., Pérezesandi. M. and Oriol. C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20. (4) : 569-574.
100. Biguet J., Rose F., Capron A. et Tranvanky P. (1965). Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse. *Revue d'Immunologie.*29 :5-30.

- 101. Bout D., Fruit J. et Capron A. (1974).** Purification d'un antigène spécifique du liquide hydatique. *Ann. Immunol.* 125 c : 775-788.
- 102. Capron D., Biguet J., Vernes A. et Afchain D. (1968).** Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôtes-parasite. *Pathologie Biologie.* 16 :121-138.
- 103. Lauriola L., Piantelli M., Pozzuoli R., Arru E. and Musiani P. (1978).** Echinococcus granulosus : Preparation of mono specific antisera against antigens in sheep hydatid fluid. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektions-krankheiten und Hygiene, Erste Abteilung Originale. Reihe A.* 240 : 251-257.
- 104. Di Felice G., Pini C., Afferni C. and Vicari G. (1986).** Purification and partial characterization of the major antigen of Echinococcus granulosus (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20(2):133-42.
- 105. Capron A., Yarzabal L., Vernes A. & Fruit J. (1970).** Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine. (Bilan personnel à propos de 400 observations) *Pathologie Biologie* 18 :357-365.
- 106. Hamel K.L. and Ris D.R (1982).** The use of a cathodic antigen in the immunoelectrophoretic serodiagnosis of Echinococcus granulosus in sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3(4):419-25.
- 107. Zhang L. and McManus D.P. (1996).** Purification and N-terminal amino acid sequencing of Echinococcus granulosus antigen 5. *Parasite Immunol.* 18 : 597-606.
- 108. Piantelli M., Pozzuoli R., Arru E. and Musiani P. (1977)** Echinococcus granulosus : Identification of subunits of major antigens. *Journal of Immunology* 119,1382.
- 109. González-Sapienza G. (2003).** Echinococcus granulosus antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family. *Biochemical Journal* 369:191-198.
- 110. Amri M., Mezioug D., Ait Aissa S. et Touil-Boukoffa C. (2005).** Purification de 2 antigènes de l'échinococcose humaine par filtration sur gel et chromatographie d'affinité : L'impact sur la production de l'IL-8, l'IL-12 et le NO. *J.S.A.C.* 15 :187.
- 111. Lorenzo C., Salinas G., Brugnini, A., Wernstedt C., Hellman U. and Gonz'alez-Sapienza G. (2003).** Echinococcus granulosus antigen 5 is closely related to proteases on the trypsin family. *Biochem. J.* 369: 191-198.
- 112. Hamrioui B., Ovlaque. G., Belkaid. M. and Capron. A. (1988).** Purification du liquide hydatique du mouton. *Arch. Inst. Past. Algerie* 56 : 117-123
- 113. Hamrioui B., Ovlaque. G., Belkaid. M. and Capron. A. (1988).** Caractères physicochimiques de la fraction 5 du liquide hydatique. *Arch. Inst. Past. Algerie* 56 : 124-129.
- 114. Chamekh M., Facon B., Dissous C., Haque A. and Capron A. (1990).** Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of Echinococcus granulosus antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods.* 134(1):129-37.
- 115. Bornet H. et Charrie A. (1992).** Conditions expérimentales d'un immunodosage. Dans : Les immunodosages de la théorie à la pratique. *Edition Acomen.*
- 116. Coltorti E.A. and Varela-Diaz V.M. (1972).** IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *Journal of Parasitology* 58: 753-756.
- 117. Ekins R.P., Newman G.B. and O'Riordan J.L.H. (1967).** Theoretical aspects of "saturation" and radioimmunoassay radioisotops in medicine. In : in vitro studies, Proceedings Symposium, Oak Ridge. *US Atomic Energy Commission* 59-100.
- 118. Edwards R.P. (1985)** Immunoassay : An introduction. *William Heinmann Medical books. London.*

ANNEXE

