Immunofluorescence appliquée au sérodiagnostic de la toxoplasmose

TP 5 Première partie

GABIN-GAUTHIER

04/02/2010

I. LA TOXOPLASMOSE 2

II. PRINCIPE DES REACTIONS D'IMMUNOFLUORESCENCE 2

1. PRINCIPE GENERAL 2
2. LE MICROSCOPE A FLUORESCENCE 4
3. LE TOXO-SPOT IF 4

III. MODE OPERATOIRE 5

IV. FEUILLE DE RESULTATS 8

IMMUNOFLUORESCENCE APPLIQUEE AU SERODIAGNOSTIC DE LA TOXOPLASMOSE

TP 5 Première partie

I. La toxoplasmose

La toxoplasmose est une infection de type zoonose c'est-à-dire une maladie à réservoir animal et transmissible à l'homme. Elle est provoquée par *Toxoplasma gondii*, un protozoaire (type cellulaire eucaryote), parasite intracellulaire obligatoire, largement disséminé dans la nature chez les mammifères et notamment chez le chat.

La plupart des infections par *Toxoplasma gondii* sont inoffensives pour les individus non immunodéprimés, les femmes non enceintes, et passent même souvent inaperçues (parfois caractérisées par un état fébrile). Par contre, l'infection de femmes non immunisées au préalable et infectées pour la première fois durant leur grossesse peut se révéler dangereuse pour le fœtus et provoquer sa mort, ou des anomalies congénitales comme une cécité, des anomalies du système nerveux etc. La fréquence et la gravité de l'atteinte fœtale dépendront de plusieurs facteurs parmi lesquels la date de survenue de l'infection maternelle, la virulence de la souche infectante, l'importance de l'inoculum et la qualité de la réponse immunitaire de la mère. De même, chez un individu immunodéprimé (infecté par le HIV etc.) les infections peuvent être sévères et atteindre le cerveau. La toxoplasmose peut être traitée par des antibiotiques.

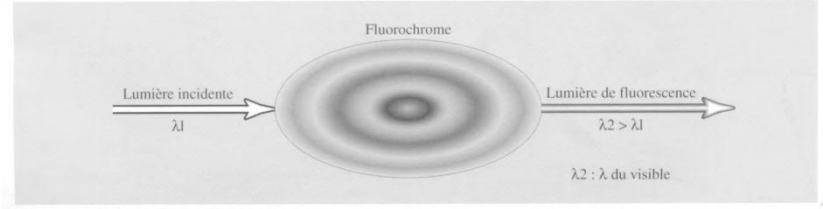
Le diagnostic d'une infection aiguë acquise durant la grossesse se fera par la mise en évidence d'une séroconversion, ou par une augmentation significative du titre d'anticorps détectés dans deux prélèvements séquentiels testés en parallèle.

Le diagnostic d'une infection par *T. gondii* repose essentiellement sur l'exploration biologique : mise en évidence du parasite, (mais sa recherche par examen direct est difficile pour ne pas dire aléatoire), recherche d'immunoglobulines spécifiques (IgM et IgG) par des tests d'agglutination, de l'immunofluorescence, des tests ELISA et d'immunocapture. La sérologie représente donc la base du diagnostic et du suivi de cette maladie.

II. Principe des réactions d'immunofluorescence

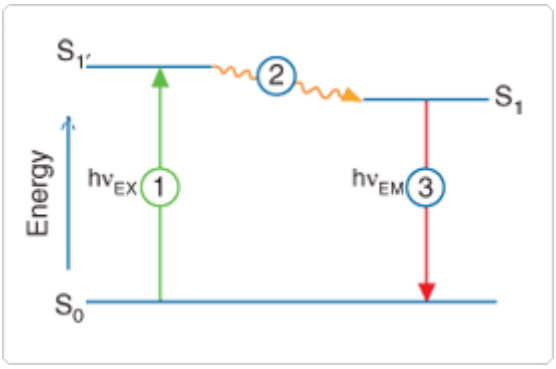
1. Principe général

Dans ces techniques, on utilise des anticorps marqués par des molécules qui ont la propriété d'être fluorescentes encore appelées fluorochromes. Ces molécules absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde, dite d'excitation et émettent une lumière d'une autre longueur d'onde dite d'émission.



Le terme fluorescence provient du minerai fluorine (CaF_2) qui peut présenter des phénomènes de fluorescence. Les molécules fluorescentes sont en général des molécules à cycle aromatique (avec des noyaux benzène). Le processus de fluorescence est un phénomène rapide, de l'ordre de la nanoseconde (10^{-9} s) alors que la

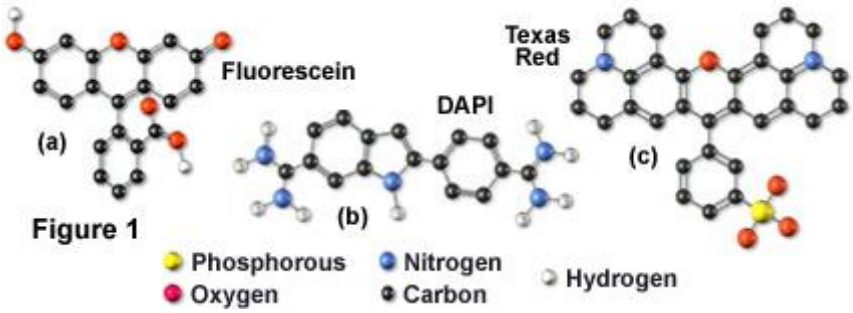
phosphorescence est beaucoup plus lent (10^{-3} s). On peut schématiser le phénomène de fluorescence par le diagramme de Jablonsky représentant l'état énergétique des électrons de la molécule.



Ce processus peut être schématisé en 3 étapes :

- ✓ L'étape 1 correspond à l'étape d'excitation. Un photon apporté par une source de lumière extérieure d'énergie hv_{EX} est absorbé par le fluorochrome, et faisant passer des électrons à un état excité (S1').
- ✓ L'étape 2 correspond à un état d'excitation pendant lequel le niveau d'énergie (S1') est partiellement dissipé ce qui conduit à un état excité de relaxation S1. Un peu d'énergie est dissipée sous forme de vibration et d'émission de chaleur.
- ✓ L'étape 3 correspond à l'émission de la lumière de fluorescence. Des photons d'énergie hv_{EM} sont émis et les électrons retournent à leur niveau d'énergie initial (S0). La diiférence d'énergie ou de longueur d'onde entre hv_{EX} et hv_{EM} est appelé saut de Stokes. C'est pour cela que la lumière émise possède une couleur différente de la lumière d'excitation (les longueurs d'ondes sont différentes).

Les fluorochromes les plus couramment utilisés sont la fluorescéine, la rhodamine, la phycoérythrine.



En couplant ces molécules à des anticorps, on peut alors les utiliser comme sondes spécifiques en immunologie.

Il faut également signaler que certaines molécules, présentes naturellement dans les cellules sont capables de fluorescence comme par exemple la chlorophylle, certaines protéines comme la GFP etc. On parle alors dans ce cas d'auto-fluorescence.

Les techniques immunologiques de fluorescence peuvent être classées en immunofluorescence directe, indirecte ou en sandwich :

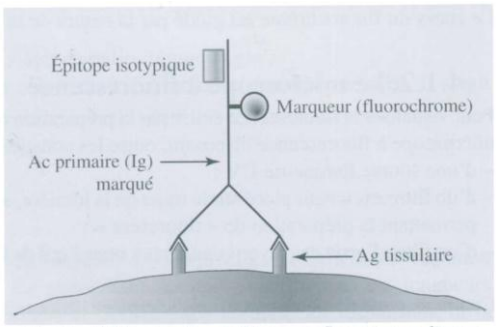


Fig.21 - Schématisation de l'immunofluorescence directe

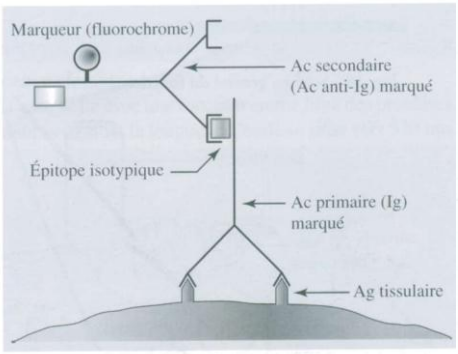
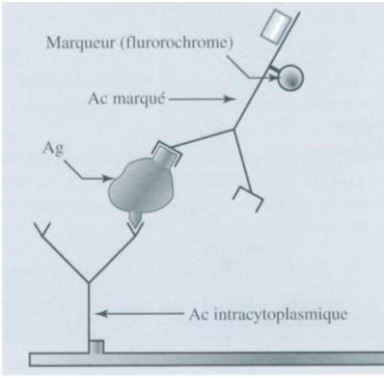
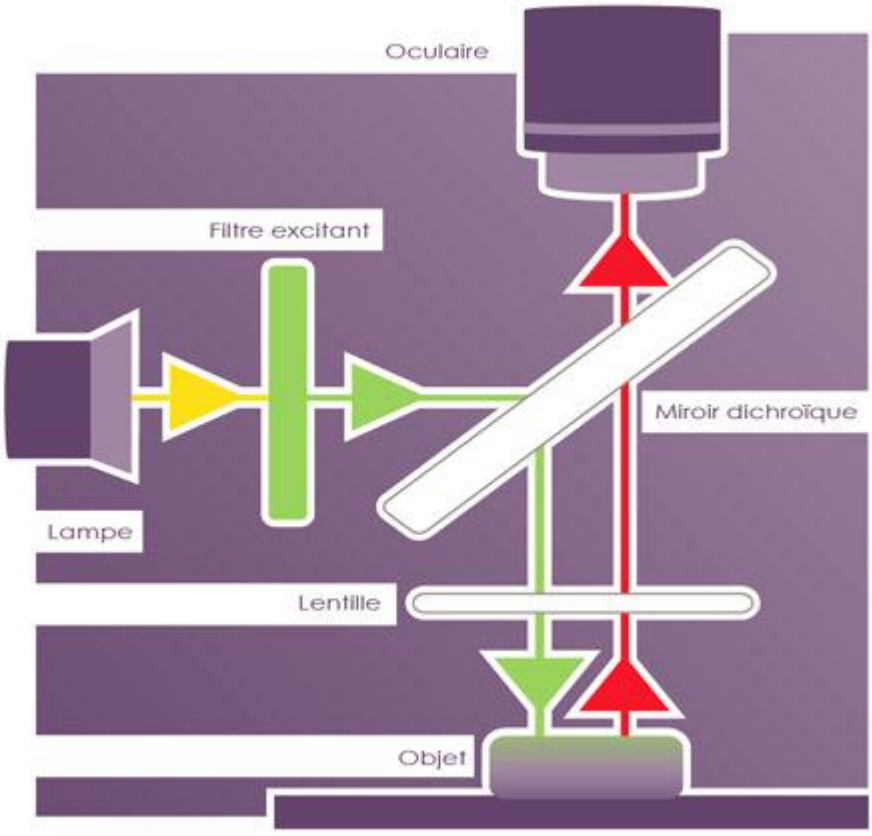


Fig.22 - Schématisation de l'immunofluorescence indirecte



23 - Schématisation de la méthode « sandwich »

2. Le microscope à fluorescence



3. Le Toxo-spot IF

Il s'agit d'une réaction immunologique en deux étapes :

- ✓ Les immunoglobulines sériques humaines antitoxoplasmiques éventuellement présentes dans l'échantillon se fixent aux toxoplasmes déposés et fixés sur les lames de Toxo-Spot IF. Les éléments non fixés sont ensuite éliminés par lavage.
- ✓ Les immunoglobulines fixées sont révélées par une globuline anti-immunoglobulines humaines marquée avec un isomère de la fluorescéine (le FITC ou isothyocyanate de fluorescéine). Ce conjugué est appelé Fluoline H. Les éléments non fixés sont éliminés par lavage. La longueur d'onde d'excitation du FITC est de 494nm, celle d'émission est de 518nm.

K. Gabin-Gauthier, ETSL

La lecture de la réaction se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence . La Fluoline H contient des Ac anti Ig totales humaines et détecte donc toutes les catégories d'Ac humains et en particulier les Ig G, A et M. La Fluoline H est diluée extemporanément dans un tampon PBS en présence de Bleu Evans dilué au 1/10 000. Le Bleu Evans est utilisé comme contre-colorant, pour améliorer les contrastes entre réaction positives et négatives ! Ainsi les toxoplasmes n'ayant pas fixé la Fluoline H apparaitront colorés en rouge.

III. Mode opératoire

Vous disposez par binôme de :

- ✓ 1 lame Toxo-spot IF et 1 lamelle (60 X 24mm)
- ✓ 150µL de sérum d'un patient dilué au 1/50 en PBS
- ✓ 300µL de Fluoline H diluée (dilution au 1/400) en tampon PBS + bleu Evans à 1/10 000
- ✓ 2-3 gouttes de liquide de montage Fluoprep
- ✓ tampon PBS, pH 7,4

1) Effectuer des dilutions successives de raison 2 de votre sérum de patient de 1/50 à 1/3200 en tampon PBS. Faire un tableau de vos dilutions et le faire valider par le professeur.
2) **Réaliser un témoin conjugué** : déposer 20 µl de PBS sur le premier cercle de la lame.
3) **Echantillons** : déposer sur le deuxième cercle 20 µl de la première dilution, puis sur le cercle suivant 20 µl de la deuxième dilution. Répéter cette opération sur les cercles restants avec les autres échantillons à tester.
4) Incuber 30 minutes à 35-39°C en chambre humide.
5) Laver 2 fois les lames avec du PBS pendant 5 minutes. Egoutter. Sécher.
6) Recouvrir chaque cercle (y compris le témoin conjugué) de 20 µl de conjugué Fluoline H dilué et contenant du bleu d'Evans au 1/10 000
7) Incuber 30 minutes à 35-39°C en chambre humide.
8) Laver 2 fois les lames avec du PBS pendant 5 minutes. Passer rapidement dans un bain d'eau distillée. Sécher. Couvrir avec une lamelle (montage avec 2 gouttes de Fluoprep)
9) Lire les lames au microscope à fluorescence.

Lecture

Avant de lire les échantillons, vérifier l'absence de fluorescence du témoin conjugué (la coloration rouge sombre des toxoplasmes est liée à la présence du bleu d'Evans). Si le témoin conjugué présente une fluorescence, la série ne doit pas être validée et les échantillons devront être testés dans une autre série.

- ✓ **Réaction positive** : fluorescence verte périphérique (liseré continu) ou pouvant atteindre toute la surface du toxoplasme.
- ✓ **Réaction négative** : absence de fluorescence (la coloration rouge sombre des toxoplasmes est liée à la présence de bleu d'Evans) ou bien fluorescence verte seulement mono ou bi-polaire.

Résultats et interprétation

La comparaison de la plus grande dilution de l'échantillon montrant encore une réaction positive, avec celle obtenue pour le Toxotrol F (étalonné en UI/ml), permet d'exprimer le titre de ces derniers en UI/ml selon les recommandations de l'OMS.

Exemple :

- ✓ Toxotrol à 100 UI/ml, dernière dilution positive : 1/1600
- ✓ Echantillon, dernière dilution positive : 1/400.
- ✓ Titre échantillon : (100 x 400) / 1600 = 25 UI/ml.

Sur 2 prélèvements à 3 semaines d'intervalle :

- ✓ Si titre stable : immunité ancienne (en général, titre compris entre 10 et 300 UI/ml). Le plateau des anticorps est atteint environ 2 mois après le début de l'infection.
- ✓ Si titre en augmentation : le plus souvent toxoplasmose en évolution. Il est conseillé de rechercher les anticorps IgM.

Remarque : lorsque les sérums sont testés simultanément, un écart supérieur à une dilution traduit une augmentation du titre.

IV. Feuille de résultats

Immunofluorescence

Schématisez les étapes de cette technique pour un sérum positif en utilisant les symboles suivants :

Ag *Toxoplasma gondii* : ▲

Ig anti *Toxoplasma gondii* :

Ig anti Ig humaines marquées à la fluorescéine :

Tableau de mode opératoire pour la dilution du sérum du patient :

Rôle témoin conjugué :