

Aspergillus flavus est un champignon pouvant provoquer des maladies chez les animaux (volaille, porc, bétail...) et il peut également contaminer des aliments, principalement des céréales.

Ce champignon est à l'origine de la libération d'une toxine (Aflatoxine) qui est à l'origine des principaux symptômes de la maladie.

Ainsi, dans les filières agroalimentaires, il est souvent recherché la présence de cette toxine dans les céréales alors que chez les animaux, pour diagnostiquer la maladie, on recherche souvent la présence d'anticorps sériques dirigés contre cette toxine.

On se propose d'étudier quelques aspects de la mise au point de tests permettant ta recherche d'aflatoxine dans les aliments et la recherche d'anticorps spécifiques de l'aflatoxine dans le bétail.

I Mise au point d'un kit de détection de l'aflatoxine dans des céréales

Dans un premier temps, le laboratoire veut vérifier que la présence d'aflatoxine peut être détectée par immunoprécipitation. La technique choisie est celle de l'immunodiffusion double en milieu gélatinifié. Le laboratoire possède des anticorps monoclonaux de type M de lapin anti aflatoxine.

- 1.1. Schématiser la structure de cette immunoglobuline en précisant le rôle de chacune de ces parties
- 1.2. Préciser les différences structurales d'une IgM sérique en comparaison à une IgG.
- 1.3. Qu'appelle t-on isotypie et allotypie des immunoglobulines ?
- 1.4. Si l'on injecte ces anticorps de lapin à une chèvre, quel(s) type(s) d'anticorps récupèrent-on ?

Pour cette technique, on se propose de couler une gélose d'agarose 1% dans une boîte de Pétri et de la percer à l'aide d'un emporte pièce, un trou central entouré de trous périphériques. Dans le trou central, on dépose 10 µL d'anticorps anti aflatoxine tandis qu'on remplit les trous périphériques avec 10 µL de suspension selon le schéma présenté dans la figure 1.

Après diffusion et incubation à température ambiante, on observe la boîte de Pétri (voir figure 1).

- 1.5. Quelle est une des conditions portant sur la structure de l'antigène qui permet d'obtenir un trait de précipitation ?
- 1.6. Qu'est-ce qu'un précipité ?
- 1.7. Qu'est-ce qu'un gel d'agarose et pourquoi utilise t-on ce type de gels pour des réactions de précipitations ?
- 1.8. Pourquoi cette technique est une technique d'immunodiffusion double ?
- 1.9. Expliquer l'absence de traits de précipité entre le trou 3 et le trou central de la gélose.
- 1.10. Que pouvez-vous déduire des observations des précipités entre les trous 2, 4, 6 et le trou central ?
- 1.11. Qu'indiquent la présence de l'éperon observé au niveau des traits de précipité des trous 4, 5 et le trou central.
- 1.12. D'après la bibliographie, les contaminations par *Aspergillus flavus* des céréales peut donner des concentrations d'aflatoxine dans les extraits céréaliers de l'ordre de 0,5 à 1 mg/mL. Que pouvez-vous déduire de l'absence de précipité entre le trou 1 et le trou central ?

II Recherche d'anticorps sériques dans le bétail

On veut mettre au point un sérodiagnostic des infections du bétail à *Aspergillus flavus*.

Il est connu que les principaux anticorps sécrétés par le bétail infecté sont des immunoglobulines M et que celles dirigées contre l'aflatoxine sont de bons marqueurs d'infection.

Le laboratoire veut développer une technique d'agglutination en tube. Pour cela, il faut commencer par fixer l'aflatoxine sur des billes de latex.

- 2.1. Qu'est-ce qu'un sérodiagnostic ?
- 2.2. Indiquer la raison pour laquelle il faut fixer l'aflatoxine sur des billes de latex.
- 2.3. Sachant que les anticorps sécrétés par les animaux malades sont agglutinants, en déduire le nom de cette technique.
- 2.4. Expliquer pourquoi certains anticorps sont agglutinants et pas d'autres.

Le protocole réalisé est le suivant.

Dans un premier, on réalise 4 dilutions du sérum de l'animal supposé infecté. Son sérum est ainsi dilué :

dilution 1 : 200 μ L dans 800 μ L de diluant : sérum dilué 1

dilution 2 : 200 μ L de sérum dilué 1 dans 800 μ L de diluant : sérum dilué 2

dilution 3 : 200 μ L de sérum dilué 2 dans 800 μ L de diluant : sérum dilué 3

dilution 4 : 200 μ L de sérum dilué 3 dans 800 μ L de diluant : sérum dilué 4

Puis on introduit dans chaque tube 200 μ L de chacun des sérum dilué 1, 2, 3 et 4 dans les tubes 1, 2, 3 et 4. Dans le tube 5, on met 200 μ L de diluant.

Dans les 5 tubes, on rajoute alors 800 μ L de suspension d'aflatoxine fixée aux billes de latex.

On centrifuge 5 minutes à 3000 tours/minute puis on remet le culot en suspension par une chiquenaude sur le fond du tube.

En présence d'une suspension homogène, le résultat est négatif (-) alors que dans le cas contraire, on observe des agglutinats en plus ou moins grands nombres (+ à ++) facilement visibles à l' il nu.

Les résultats et le protocole sont résumés dans le tableau suivant :

	1	2	3	4	5
Sérum dilué en μ L	200	200	200	200	0
Diluant en μ L	0	0	0	0	200
Suspension d'aflatoxine en μ L	tube	800	800	800	800
Dilution finale du sérum					
Agglutination	++	+	-	-	-

2.4. A quoi sert le tube 5 ? Justifier.

2.5. Donner la dilution finale du sérum dans chacun des tubes.

2.6. Indiquer le titre du sérum de l'animal sachant que le titre est donné par l'inverse de la plus forte dilution donnant encore une réaction d'agglutination.

