

50376
1984
298

50376
1984
298

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

ANNEE 1983 - 1984

N° 116

Excellu du prêt

T H E S E

présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

(Mention : Sciences Naturelles)

par

Bernard GOUSSARD



MISE AU POINT D'UNE METHODE IMMUNOENZYMATIQUE

POUR LE DIAGNOSTIC DE LOA LOA

A L'AIDE D'ANTIGENES SOMATIQUES ET METABOLIQUES

Soutenu le 23 janvier 1984

JURY

- Monsieur le Professeur Bernard MONTUELLE, Président,
- Monsieur le Professeur Alain VERNES, Examineur,
- Monsieur le Docteur Bernard IVANOFF, Rapporteur,
- Monsieur le Docteur Guy TRONCHIN, Examineur.

0376
1984
298

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1984
298

ANNEE 1983 - 1984

N° 116

Exclu du prêt

T H E S E

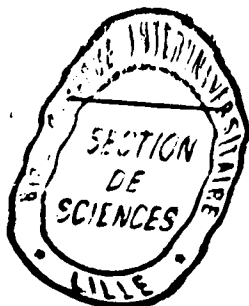
présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

(Mention : Sciences Naturelles)

par

Bernard GOUSSARD



MISE AU POINT D'UNE METHODE IMMUNOENZYMATIQUE
POUR LE DIAGNOSTIC DE LOA LOA
A L'AIDE D'ANTIGENES SOMATIQUES ET METABOLIQUES

JURY

Monsieur le Professeur Bernard MONTUELLE, Président,
Monsieur le Professeur Alain VERNES, Examineur,
Monsieur le Docteur Bernard IVANOFF, Rapporteur,
Monsieur le Docteur Guy TRONCHIN, Examineur.

50376
1984
298

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1984
298

ANNEE 1983 - 1984

N° 116

Exclu du prêt

T H E S E

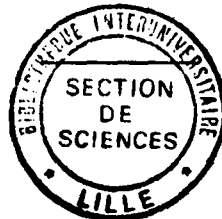
présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

(Mention : Sciences Naturelles)

par

Bernard GOUSSARD



MISE AU POINT D'UNE METHODE IMMUNOENZYMATIQUE

POUR LE DIAGNOSTIC DE LOA LOA

A L'AIDE D'ANTIGENES SOMATIQUES ET METABOLIQUES

Soutenu le 23 janvier 1984

JURY

Monsieur le Professeur Bernard MONTUELLE, Président,
Monsieur le Professeur Alain VERNES, Examineur,
Monsieur le Docteur Bernard IVANOFF, Rapporteur,
Monsieur le Docteur Guy TRONCHIN, Examineur.

A mes parents,

en témoignage de ma profonde affection.

A Marie-Dominique, ma femme,

A Anne-Sophie, Marie-Céline, François-Xavier, mes enfants

Je leur dédie ce travail en signe de mon amour.

A ma famille.

A mes Amis.

A tous ceux qui me sont chers.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur B. MONTUELLE
Directeur de l'IUT
à l'Université de LILLE

Je le remercie du grand honneur qu'il me fait
d'accepter la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille trouver, ici, le témoignage de ma
respectueuse reconnaissance.

A MES JUGES

Monsieur le Professeur Alain VERNES

Professeur à la Faculté de Médecine de Lille
Directeur de l'unité 42 de l'INSERM

Il a bien voulu accepter la direction de ce travail.

*J'ai pu apprécier son enthousiasme et son dynamisme
ainsi que son sens aigü de l'efficacité.*

*J'aimerais qu'il trouve, ici, l'expression sincère de
la profonde reconnaissance que je lui témoigne.*

Monsieur Bernard IVANOFF

Docteur d'Etat en Pharmacie,
Directeur Général du Centre International de Recherches
Médicales de Franceville

*Il a permis que ce travail s'effectue dans son Centre
de recherches. Il m'a fait profiter de ses compétences
grâce aux nombreux conseils qu'il m'a donnés. Il
accepte encore aujourd'hui d'être le rapporteur de
cette thèse.*

Qu'il trouve ici l'expression de toute mon amitié.

Monsieur Guy TRONCHIN

Docteur es Sciences

*Je lui suis reconnaissant d'avoir bien voulu s'intéres-
ser à mon travail en acceptant de le juger.*

Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie avec une mention spéciale Monsieur Yves GARIN pour l'aide efficace qu'il m'a procurée pour débiter ce travail et pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du C.I.R.M.F., et en particulier les techniciens du Service de Parasitologie : Hubert MOUKANA, André DELICAT, Paul N'GARI et Edouard DJENNO.

Mes remerciements vont également à Monsieur Gilles BEVILLE qui a su réunir toute la documentation nécessaire à ce travail. J'associe à ces remerciements Madame Annick BEVILLE qui a réalisé, avec patience et compétence, la frappe et la mise en page de cette thèse.

Enfin, je voudrais remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont permis la réalisation de ce travail, en particulier la population du Haut-Ogooué qui a accepté les prélèvements nécessaires à cette mise au point.

TABLE DES MATIERES

	<i>Pages</i>
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
<u>CHAPITRE PREMIER :</u>	
Préparation et purification des antigènes extraits de microfilaires sanguicoles	6
1.- <u>Préparation des antigènes bruts</u>	6
1.1. Isolement des microfilaires	6
1.2. Antigènes somatiques	6
1.3. Antigènes métaboliques	8
2.- <u>Purification des antigènes</u>	8
2.1. Chromatographie d'affinité	9
2.2. Sépharose 4 B	12
<u>CHAPITRE DEUXIEME :</u>	
Application de la technique E.L.I.S.A. au diagnostic des helminthiases	13
1.- <u>Principe de la technique E.L.I.S.A.</u>	13
2.- <u>Etude des différents paramètres</u>	15
2.1. Le support	15
2.2. L'antigène	15
2.3. Sensibilisation des supports	19
2.4. Liquide de lavage	20
2.5. Tampons d'incubations	20
2.6. Choix du conjugué	20
2.7. Substrat	21
2.8. Durée et température	21
3.- <u>Avantages et inconvénients de l'E.L.I.S.A.</u>	22
3.1. Sensibilité	22
3.2. Spécificité	23
3.3. Possibilité de quantifier les résultats	23
3.4. Coût de la réaction	23
3.5. Utilisation de la technique en zone d'endémie.	24

4.- <u>Application de la technique E.L.I.S.A. au dosage</u> des anticorps et des antigènes d'helminthiases	26
4.1. Trématodes	26
4.1.1. Bilharzioses	26
4.1.2. Fasciolase	33
4.2. Cestodoses	34
4.3. Nématodoses	35
4.3.1. Nématodes intestinaux	35
4.3.2. Larva migrans	35
4.3.3. Trichinose	35
4.3.4. Filarioses	36
CONCLUSION	37
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS	39
<u>CHAPITRE PREMIER :</u>	
Extraction et purification des antigènes de Loa loa	40
1.- <u>Matériel et Méthodes</u>	40
1.1. Isolement des microfilaires	40
1.1.1. Réactifs	41
1.1.2. Agglutination des hématies	43
1.1.3. Isolement	45
1.2. Préparation des antigènes somatiques	46
1.3. Préparation des antigènes métaboliques	47
1.4. Dosage des protéines	47
1.5. Purification des antigènes	48
1.5.1. Réactifs	48
1.5.2. Préparation du Sépharose	50
1.5.3. Couplage du gel	50
1.5.4. Chromatographie	51
1.5.5. Préparation des ligands	52
1.5.5.1. Sérum de lapins anti-protéines humaines	52
1.5.5.2. Sérum de lapins hyperimmuns	53
1.5.5.2.1. Immunisation	53
1.5.5.2.2. Contrôle de l'immunisation	54
1.5.5.2.3. Isolement des IgG de lapin	56
1.5.5.2.4. Chromatographie d'affinité contre du sérum humain	61
1.5.5.3. Deuxième chromatographie d'affinité.	62
1.5.6. Contrôle des produits	62
1.5.7. Résumé	62

1.6. Méthodes d'analyses statistiques	64
2.- <u>Résultats</u>	67
2.1. Isolement des microfilaires	67
2.2. Dosage des protéines	69
2.3. Antigènes bruts	69
2.4. Purification des antigènes	71
2.4.1. Couplage du Sépharose	71
2.4.2. Isolement des IgG de lapin	72
2.4.3. Eluats des chromatographies d'affinité ..	73
2.4.4. Immunodiffusion	73
3.- <u>Discussion</u>	81
4.- <u>Conclusion</u>	85

CHAPITRE DEUXIEME :

Utilisation des antigènes somatiques et métaboliques à l'application de la technique E.L.I.S.A. dans le dosage des anticorps de Loa loa	86
1.- <u>Matériel et Méthode</u>	86
1.1. Matériel et réactifs	86
1.2. Exécution de la réaction	88
1.3. Etude des tampons	90
1.4. Détermination des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps	92
1.5. Etude de la reproductibilité de la technique .	93
1.6. Etude de la spécificité de la technique	97
2.- <u>Résultats</u>	98
2.1. Choix des tampons	98
2.2. Détermination des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps	101
2.2.1. Antigènes somatiques	101
2.2.2. Antigènes métaboliques	101
2.3. Etude de la reproductibilité de la technique .	106
2.3.1. Analyse de la variation inter-essai	110
2.3.2. Analyse de la variation intra-essai	111
2.3.3. Validité de la technique	111
2.4. Reproductibilité de la technique dans le temps	113
2.4.1. Comparaison inter-manipulation	115
2.4.2. Recherche d'un effet de bord	116

2.5. Etude de la validité et de la spécificité de la technique	118
2.5.1. Etude de la validité	118
2.5.1.1. Antigènes métaboliques	124
2.5.1.2. Antigènes somatiques	127
2.5.2. Etude de la spécificité	127
2.5.2.1. Etude avec des sérums de contrôle négatif	127
2.5.2.1.1. Antigènes métaboliques	127
2.5.2.1.2. Antigènes somatiques	128
2.5.2.2. Recherche d'une réaction croisée avec Dipetalonema perstans	128
2.5.2.3. Analyse globale de la population vivant en zone d'endémie	131
2.5.2.4. Corrélations	132
2.5.2.5. Limites de la réaction	134
3.- <u>Discussion</u>	135
CONCLUSION	145
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION.....	147
BIBLIOGRAPHIE	I

MISE AU POINT D'UNE METHODE IMMUNOENZYMATIQUE
POUR LE DIAGNOSTIC DE LOA LOA
A L'AIDE D'ANTIGENES SOMATIQUES ET METABOLIQUES

RESUME : Une étude a été menée dans le but de mettre au point une technique immunoenzymatique pour le dosage des anticorps anti-Loa loa à l'aide d'antigènes somatiques et métaboliques.

Après une large revue bibliographique des techniques d'isolement de microfilaire et de la technique E.L.I.S.A., les auteurs présentent une méthode d'isolement inédite et les résultats obtenus dans l'application de la technique E.L.I.S.A. au diagnostic de Loa loa.

L'intérêt de la méthode d'isolement est de permettre l'obtention, simultanée, d'antigènes métaboliques et somatiques avec un excellent rendement. La technique E.L.I.S.A. mise au point possède une bonne reproductibilité et une excellente spécificité (98,6 %). Elle permet de porter un diagnostic spécifique de Loase dans des zones d'endémie où sévissent plusieurs filarioses.

APPLICATION OF IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUE
FOR THE DIAGNOSIS OF LOA LOA
USING SOMATIC AND METABOLIC ANTIGENS

SUMMARY : A study was conducted to develop an immunoenzymatic method to measure Loa loa antibodies against somatic and metabolic antigens.

After thoroughly reviewing the literature on microfilarial isolation techniques and E.L.I.S.A. methods, the authors present a novel isolation

procedure and then the results obtained with this antigen and the E.L.I.S.A. procedure in the diagnosis of Loa loa.

The advantage of the isolation procedure is that it permitted simultaneous isolation of metabolic and somatic antigens. The E.L.I.S.A. procedure used gave a good reproductibility and excellent specificity (98.6 %). It permitted specific diagnosis of Loasis in endemic zones where filariasis are also present.

INTRODUCTION

La première description du nématode Loa loa a été faite en 1770 par MANGIN (122) qui l'isola chez une esclave, originaire de l'Afrique de l'Ouest, vivant sur l'île de Saint Domingue. C'est en 1864 que GUYON retrouva ce ver au Gabon (85). Selon cet auteur, Théodore de BRY fut le premier à décrire ce parasite dans un volume d'"INDIA ORIENTALIS" paru en 1597. GRUNTZIG (84) pense que la description de de BRY correspond plutôt à la filaire de Médine. Quoiqu'il en soit, ce n'est qu'en 1904 que LOSS décrivit en détail Loa loa (39).

Bien que découverte aux Antilles, la loase n'existe que dans l'Afrique de l'Ouest et, hormis un foyer au Soudan Méridional, cette parasitose est limitée au bloc forestier des fleuves Congo et Ogooué (nord-ouest de l'Angola, nord et ouest du Zaïre, Gabon, Congo, sud de la République Centrafricaine, du Tchad, du Cameroun et du Nigeria) (77).

La filaire Loa loa est un parasite spécifiquement humain. Les adultes vivent sous la peau et leur longévité peut dépasser quinze ans. La femelle émet des embryons ou microfilaires à gaines qui vivent dans les vaisseaux sanguins. Cependant la microfilarémie, après pique de l'hôte vecteur (Tabanides du genre Chrysops), n'est souvent décelée qu'un an et demi après infestation (77). Les tabanides en cause sont essentiellement Crysops dimidiata et Chrisops silacea. Ce sont deux espèces forestières souvent présentes toutes les deux dans un même foyer de filariose (65, 66). Bien que deux à trois millions d'individus soient atteints de loase (67), cette maladie a été longtemps considérée comme bénigne. Ce n'est qu'au cours des

dernières décennies que l'on a commencé à mettre en évidence des complications viscérales de la loase ; les plus graves sont des manifestations méningo-encéphaliques ayant un aboutissement souvent fatal. Ces complications étaient tout-à-fait exceptionnelles avant l'introduction du traitement de la loase, par le diéthylcarbamazine, et n'apparaît qu'à partir d'un taux de 1000 microfilaires pour 20 mm³ de sang (77).

Le diagnostic des loases se fait aisément si les microfilaires sont présentes ou lors du passage de l'adulte sous la conjonctive. Cependant, il faut savoir que les loases reconnues à l'examen direct ne forment qu'un faible pourcentage des individus atteints par la maladie (49, 62, 67, 68). En l'absence de microfilaires ou macrofilaires visibles, le diagnostic peut être porté cliniquement, par la présence d'oedèmes fugaces (oedèmes de Calabar), mais, comme dans beaucoup de parasitoses, les signes cliniques peuvent être absents. Le diagnostic de présomption peut être fait par la présence d'un taux élevé d'éosinophiles, mais, en zone tropicale, les causes de l'hyperéosinophilie sanguine peuvent être multiples.

C'est pourquoi le diagnostic immunologique de la loase a été envisagé depuis une vingtaine d'années et de nombreux modèles ont été proposés (100). Citons entre autres : les tests d'inhibition de migration des lymphocytes (138), l'hémagglutination passive (130,146) l'immunoélectrophorèse (27), l'immunofluorescence utilisant les

coupes en congélation de filaires adultes (2) ou de microfilaires (137), la dégranulation des basophiles (32), les tests cutanés (36).

Tous les auteurs s'accordent, cependant, à insister sur le fait que le diagnostic des maladies parasitaires en général, et des filarioses en particulier, ne sera vraiment fiable que lorsqu'il mettra en cause des antigènes spécifiques. Notre premier souci fut donc de mettre au point une technologie permettant de recueillir, en grand nombre et avec un coefficient de pureté élevé, des microfilaires qui serviraient à la préparation des antigènes, somatiques ou métaboliques, à partir desquels serait étudiée une technique immunoenzymatique de dosage des anticorps antimicrofilariens.

L'importance du taux d'infestation à Loa loa au Gabon (142) et l'éventualité d'une répercussion possible sur la démographie de ce pays (107) a amené le C.I.R.M.F. (Centre International de Recherches Médicales de Franceville) à effectuer une étude sur cette maladie et à chercher une méthode de diagnostic fiable pour cette parasitose. Nous avons choisi la technique E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) pour les nombreux avantages qu'elle présente, en particulier la possibilité d'effectuer simultanément un grand nombre de dosages.

Pour atteindre ce but, nous avons divisé notre travail en trois parties principales :

- la première résume, à l'aide d'une bibliographie exhaustive, les

principaux travaux effectués, d'une part sur la préparation et la purification des antigènes extraits de microfilaires sanguicoles, d'autre part sur l'application de la technique E.L.I.S.A. au diagnostic des helminthiases.

- La deuxième partie présente les résultats personnels que nous avons obtenus au cours de l'extraction des antigènes de Loa loa et de leur utilisation en immunoenzymologie.
- Enfin, une troisième partie est consacrée à la discussion générale des résultats et à la conclusion.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE PREMIER

PREPARATION ET PURIFICATION DES ANTIGENES

EXTRAITS DE MICROFILAIRES SANGUICOLES

1.- PREPARATION DES ANTIGENES BRUTS

1.1.- Isolement des microfilaires

Les études immunologiques des filarioses humaines se heurtent à des problèmes multiples, dont l'un des premiers est l'obtention de matériels antigéniques en quantité suffisante (131). Pour Loa loa, la récolte des vers adultes ne peut être qu'accidentelle et limitée, puisque réduite pratiquement aux excrèses lors du passage conjonctival du ver. Par contre, comme pour Wuchereria bancrofti, la récolte des microfilaires, à partir du sang de sujets infestés, peut être facilement réalisée au laboratoire. Les méthodes de récolte de microfilaires utilisent, soit un agent de lyse des globules rouges (130, 154, 156), soit un gradient de densité (99, 127), soit une filtration sur membrane (1, 18, 19, 50). Toutes ces méthodes se heurtent à des problèmes de rendement de récolte et de pureté des microfilaires extraites. Récemment, GARIN (75) a décrit une méthode qui permet d'isoler 90 % des microfilaires présentes dans le sang avec une contamination quasi nulle du produit.

1.2.- Antigènes somatiques

Les antigènes parasitaires peuvent être divisés en deux grands

groupes (131, 17) :

- les antigènes somatiques, ou endoantigènes, ou antigènes structuraux qui sont constitués par les parasites eux-mêmes ou par des extraits solubles des parasites ;
- les antigènes métaboliques, ou exoantigènes, qui sont des produits d'excrétion et de sécrétion de l'activité physiologique du parasite.

Le principe même de la technique E.L.I.S.A. nécessite l'emploi d'antigènes solubles. Pour les antigènes somatiques, le produit antigénique est préparé à partir des microfilaires extraites.

L'approche la plus aisée pour obtenir des antigènes parasitaires, afin d'effectuer le diagnostic immunologique des affections, est l'utilisation soit du parasite lui-même, en tout ou en partie, soit d'extraits bruts du parasite. Mais ce type d'antigène pose un gros problème de standardisation car, en général, la partie immunogène ne représente qu'une faible fraction de l'ensemble (177).

Pour extraire les protéines d'un organisme, plusieurs méthodes peuvent être utilisées (131). La méthode la plus simple consiste à broyer à froid, congeler et décongeler les organismes plusieurs fois. Après une ultracentrifugation, le surnageant contient une grande partie des protéines solubles (30). On peut également obtenir ce type d'antigène par homogénéisation au moyen d'un POTTER (3,5, 43, 34), soit par destruction par les ultrasons (175, 101), soit en associant plusieurs méthodes (124, 7).

1.3.- Antigènes métaboliques

Le pouvoir immunogène des produits d'excrétion et de sécrétion des nématodes est connu depuis longtemps (162, 26, 181) ainsi que leur utilisation comme source d'antigènes pour le sérodiagnostic des parasitoses (163, 73, 51). L'intérêt principal de telles substances est de posséder un degré de pureté supérieur aux antigènes somatiques (177) et donc de diminuer les réactions croisées.

2. PURIFICATION DES ANTIGENES

Les parasites, qu'ils soient des protozoaires ou des métazoaires sont des organismes complexes présentant une mosaïque d'antigènes (28, 17), dont certains sont hautement immunogènes et d'autres faiblement. Les uns sont spécifiques et les autres responsables des réactions croisées (56).

Lors de la préparation des antigènes, une contamination par des protéines n'appartenant pas aux parasites est quasi inévitable et l'utilisation de telles préparations à l'état brut est très limitée (21).

L'emploi de techniques de plus en plus sophistiquées nécessite une purification et une standardisation accrue des antigènes parasitaires (131).

Les antigènes utilisés en E.L.I.S.A. sont solubles. Afin de pouvoir obtenir une reproductibilité des résultats, et, par suite, une plus grande fiabilité de la technique, la purification des antigènes doit être la plus rigoureuse possible, d'autant plus que les quantités réagissantes sont très petites (132).

Les méthodes de purification des antigènes parasitaires sont analogues aux méthodes de purification des protéines. L'immunologiste possède tout un arsenal de techniques pour aboutir aux résultats escomptés (64, 182, 74, 76). Toutes les méthodes possèdent leurs propres avantages et inconvénients, mais les résultats concernant les antigènes parasitaires ont été longtemps décevants. La situation a considérablement évolué aux environs des années 1970 par l'apport des techniques de chromatographie d'affinité utilisant, soit des inhibiteurs spécifiques d'enzymes, soit des immunoabsorbants (29).

2.1.- Chromatographie d'affinité

Les techniques conventionnelles de purification de protéines sont généralement basées sur de faibles différences physicochimiques des protéines du milieu à purifier. La plupart du temps, la séparation et la purification de ces mélanges sont longues et très souvent incomplètes. La séparation sélective des macromolécules par chromatographie d'affinité repose sur la propriété originale que possèdent

les anticorps de se lier spécifiquement et réversiblement aux antigènes qui leur correspondent par des liaisons ioniques non covalentes (42).

En liant une protéine, appelée ligand, à un support, appelé matrice, et en faisant agir un mélange de protéines, s'il existe des anticorps ou des antigènes spécifiques dans le couple ligand-mélange de protéines, les réactions spécifiques se produisent et la matrice retient les immuncomplexes formés. Il découle de cette constatation deux systèmes utilisables :

- A - On possède l'anticorps spécifique à l'antigène que l'on cherche à purifier : il suffit de coupler l'anticorps à la matrice, de faire agir le mélange contenant l'antigène à purifier et, après lavage, de dissocier les immuncomplexes formés et de récupérer l'antigène ainsi purifié (42).
- B - On ne possède pas l'anticorps spécifique, mais on possède un anticorps correspondant aux protéines "indésirables" : dans ce cas, on récupère la fraction qui ne forme pas d'immuncomplexe (7).

La chromatographie d'affinité, dans ses principes, est schématisée en figure 1.

Les techniques de chromatographie d'affinité ont été rendues possibles par les travaux d'AXEN et ceux de CUATRECASAS qui mirent au point les modalités de couplage d'un gel avec des protéines de façon stable par des liaisons covalentes (12, 13, 41).

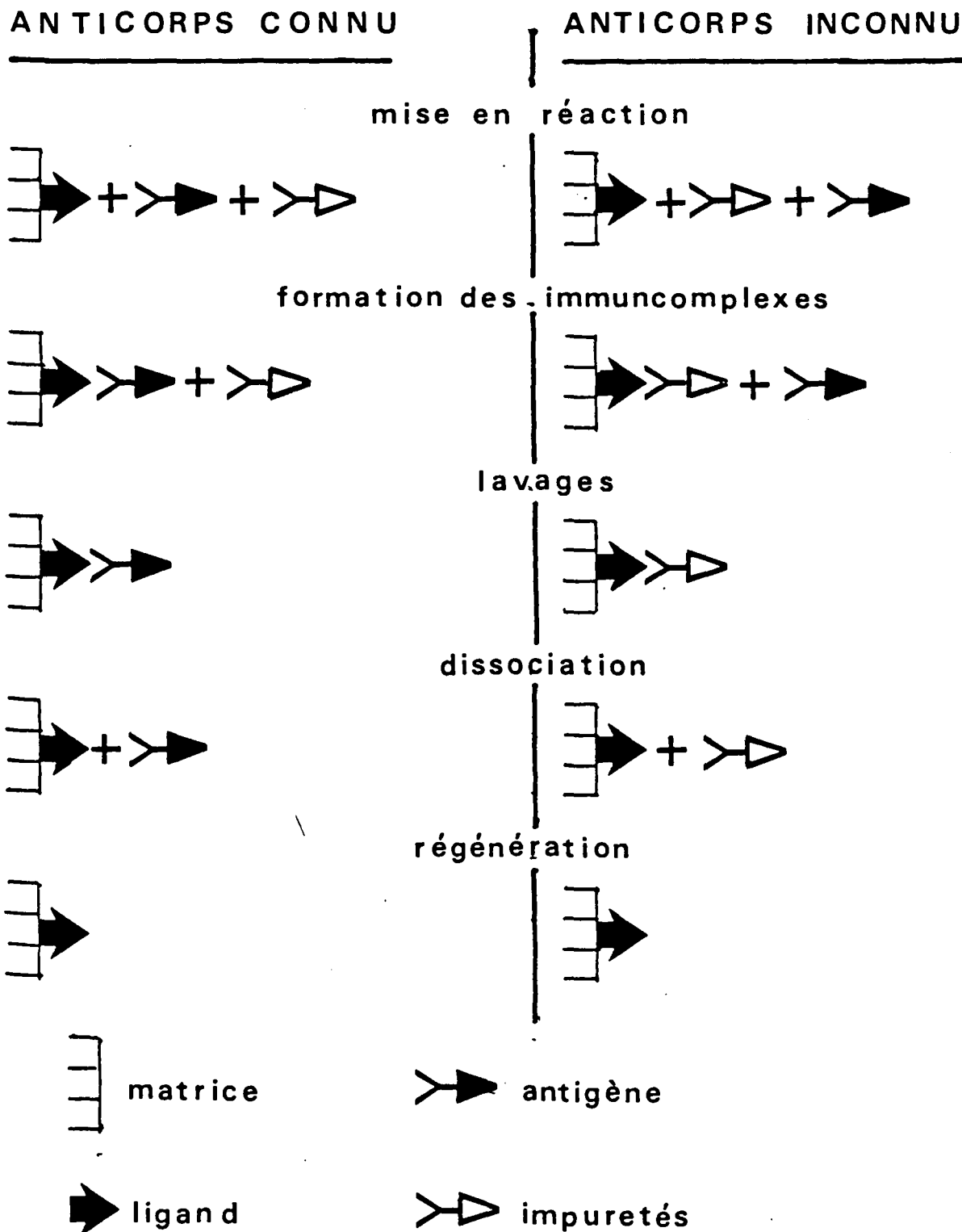


figure 1: Chromatographie d'affinité

L'ensemble, matrice plus ligand est appelé immunoadsorbant. Il peut être défini comme étant "un matériel insoluble dont certains de ses constituants ont la propriété de se combiner spécifiquement soit avec des anticorps, soit avec des antigènes" (20).

De nombreuses substances ont été testées pour servir de matrice. Les plus employées sont :

- La cellulose, maintenant limitée à l'utilisation avec des acides nucléiques (42) ;
- L'agarose (21) qui présente pour avantages une très grande hydrophilie et un haut pouvoir de perméabilité aux macro-molécules ;
- Les gels de polyacrylamide (161), qui possèdent une grande stabilité chimique et de nombreux sites d'attachement aux ligands.

2.2.- Sépharose 4 B

Toutefois, le support qui semble présenter les meilleures qualités est le sépharose (42). A l'heure actuelle, le plus utilisé est le sépharose 4 B (63). Il n'est cependant pas utilisable directement et doit être, au préalable, activé par le bromure de Cyanogène (123).

CHAPITRE DEUXIEME

APPLICATION DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

AU DIAGNOSTIC DES HELMINTHIASES

1.- PRINCIPE DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

Depuis l'introduction des méthodes de marquages des immunoglobulines par des enzymes (9), de tels produits furent utilisés pour localiser les antigènes et les anticorps sur des coupes de tissus. Si les réactions immunoenzymologiques sont encore utilisées en microscopie optique ou électronique (165), l'application la plus large des anticorps marqués aux enzymes est la technique E.L.I.S.A. (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

La technique E.L.I.S.A., introduite par deux équipes de recherche, l'une en Suède (59, 60), l'autre en Hollande (170) est assez semblable, dans son principe, à la technique R.I.A. (RadioImmunosorbent Assay). Elle en diffère par le fait que le traceur radioactif est remplacé par un enzyme dont l'activité est révélée par un substrat coloré.

Toutes les techniques E.L.I.S.A. dérivent de la méthode originale décrite par ENGVALL et PERLMANN en 1972 (61).

L'antigène ou l'anticorps sont fixés sur un support solide par simple adsorption physique (35). Le produit supposé contenir les

les anticorps ou les antigènes correspondants est mis à incuber ; après rinçage, pour éliminer les protéines n'ayant pas réagi, une antiglobuline marquée avec un enzyme est ajoutée ; la présence de fixation de l'antiglobuline est révélée par le substrat de l'enzyme.

La méthode d'ENGVALL peut se résumer de la manière suivante :

1. Fixation de la sérum albumine humaine (HSA) diluée en tampon carbonate pH 9,6 pendant 3 heures à 37° C sur des tubes en polystyrène de dimensions 55 x 75.
2. Lavages avec du chlorure de sodium (0,85 %), pour éliminer les protéines non fixées au support.
3. Incubation de sérums de lapin anti-HSA, en tampon phosphate (PBS) additionné de polysorbate (TWEEN 20) et d'azide de sodium, pendant 6 heures à la température ambiante sous agitation.
4. Lavages en chlorure de sodium, de manière à éliminer les protéines n'ayant pas formé d'immuncomplexes.
5. Incubation pendant 16 heures d'un sérum de mouton anti-lapin marqué à la phosphatase alcaline.
6. Lavages pour éliminer l'excès d'antiglobuline.
7. Révélation de la fixation de l'antiglobuline par le paranitro-phénylphosphate.

A partir de cette technique, de nombreuses modifications, portant sur l'un ou l'autre des paramètres, ont été testées. Nous rassemblons

dans le tableau I certaines des modifications apportées à la méthode originale ; dans les paragraphes suivants, nous soulignons certains points qui nous semblent particulièrement intéressants.

2.- ETUDE DES DIFFERENTS PARAMETRES

2.1. Le support

La modification la plus importante intervenue dans la technique E.L.I.S.A. est l'utilisation des microplaques à hémagglutination (173) à la place des tubes à hémolyse utilisés dans la technique originale (61). Quelques auteurs (47, 48, 159, 149) ont proposé d'autres supports à la technique E.L.I.S.A., mais les applications de ces technologies à la parasitologie restent peu nombreuses.

L'adsorption des protéines sur le plastique peut être variable d'une qualité de support à une autre et même sur un support en fonction de la position des puits (effet de bord) (106, 164).

D'après BULLOCH (24), le polyvinyl présente de meilleurs qualités que le polystyrène mais le fait que les plaques en polyvinyl soient flexibles gêne considérablement la manipulation de tels supports.

2.2.- L'antigène

Le principe même de la réaction E.L.I.S.A. nécessite l'emploi

ANTIGENE	INCUBATION	LAVAGE	TAMPON SERUM	CONJUGUE	SUBSTRAT	SUPPORT	REF.
Sérum albumine	Tampon CO ₃ pH 9,6 3 h 37°C	NaCl + TWEEN 0,05 %	PBS + TWEEN 0,05 % + NaN ₃ 0,02 % 6 h T.A.	PHOS. ALC. 16 h T.A.	N.P.P.	Tubes Polys.	61
Liquide Hydat. Sch. Adulte	NaCl tamponné 7,2 3 h 37°C puis 4°C QS utilisation	NaCl 7,2 + TWEEN 0,05 %	PBS + TWEEN 0,05 % + NaN ₃ 6 h T.A.	Peroxydase 1 nuit	O. Dianisidine 1 h	Tubes polys.	22
AC. Anti IgE	1 µg/ml - Barbital 4 h T.A.	NaCl + TWEEN	PBS + TWEEN + BSA 1 nuit T.A.	PHOS. ALC. en CO ₃	N.P.P. 30 à 60 mn	Tubes polys.	95
Liquide Hydat.	1 à 2 µg/ml PBS 7,2 3 h 37°C	PBS + TWEEN	PBS 6 h T.A.	Peroxydase 1 nuit	O. Dianisidine 1 h	Tubes polys.	69
Article général	300 µl dilution/puits en CO ₃ pH 9,6 1 nuit 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN 300 µl/puits 2 h 37°C	PHOS. ALC. 300 µl/puits 2 h T.A.	N.P.P. 1 mg/ml en diéthanolamine pH 9,8	Micro Polys.	171
Sch. mansonii	50 µl à 0.025 % (P/V) CO ₃ pH 9,6 3 h 37°C puis 4°C QS utilisation	H ₂ O	PBS + TWEEN 50 µl/puits 45 mn 37°C	Peroxydase PBS + BSA 1 % 45 mn 37°C	Acide 5 Am. 1 h T.A.	Micro Polys.	48
17 Antigènes différents	CO ₃ pH 9,6 (meilleur résultat)	NaCl 0,85 % + TWEEN 0,05 %	PBS + TWEEN + BSA 30 mn O.T. 2 h Acide 5 Am.	Peroxydase 30 mn O.T. 3 h Acide 5 Am.	O.T. 40 mn Acide 5 Am. 30 mn	Micro Polys.	5
Trypanosome	5 µg/ml CO ₃ pH 9,6 1 nuit + 4°C Prétraitement par GLUTARALDEHYDE 1 % H ₂ O 1 h 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN + GELATINE 0,5 % + NaN ₃ 0,02 % 3 h T.A.	Peroxydase 3 h T.A.	O. Dianisidine Acide 5 Am.	Micro Polys.	144

.../...



ANTIGENE	INCUBATION	LAVAGE	TAMPON SERUM	CONJUGUE	SUBSTRAT	SUPPORT	REF.
E.S. Larves 2 T. canis	0.15 µg/ml CO ₃ pH 9,6 2 h 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN 3 h T.A.	PHOS. ALC. 1 nuit + 4°C	N.P.P. QS coloration	Micro Polyv.	52
Oeuf Sch. mansonii	3 µg/ml CO ₃ pH 9,6 3 jours 4°C	NaCL 0,85 % + TWEEN 0,05 %	PBS + TWEEN 18 h 25°C	Peroxydase 1 h 37°C	Acide 5 Am. 30 mn 25°C	Micro Polyv.	89
Toxoplasme	1 % solution 0,61 mg/ml 1 nuit + 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN + FCS 2 % 2 h 37°C	Peroxydase 1 h 37°C	O.P.D. 30 mn T.A.	Micro Polys.	169
Toxoplasme	10 µg/ml TRIS HCl pH 7,2 1 nuit T.A.	H ₂ O	PBS + BSA 4 % 15 mn 40°C	Peroxydase 15 mn 40°C	O.P.D. 10 mn T.A.	Billes Polys.	16
Seteria digitata	CO ₃ pH 9,6 3 h 37°C + 1 nuit 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN + BSA 3 h 37°C + 1 h 4°C	PHOS. ALC. 1 h 37°C + 1 nuit 4°C	Disodium P.P. 0.1 M CO ₃ pH 10 2 h 37°C	Micro Polys.	55
Toxoplasme	5 µg/ml Ag Lille 3 µg/ml Ag BILT. PBS 7,2 3 h 37°C	PBS + TWEEN 0,2 %	PBS + TWEEN 0,2 % 4 h T.A. Sérums au 1/500	Peroxydase PBS 1 nuit 4°C	Acide 5 Am. 1 h T.A. Arrêt : HCl	Micro Polys.	31
	25 µg/ml Ag Lille 5 µg/ml Ag BILT. PBS 7,2 1 h 37°C	H ₂ O + TWEEN 0,05 %	PBS + BSA 1 % 2 h 37°C Sérums au 1/128	Peroxydase PBS + TWEEN 0,05 % + BSA 4 % 1 h 37°C	Acide 5 Am. 1 h T.A.	Micro Polys.	
	2 µg/ml Ag Lille CO ₃ pH 9,6 1 nuit T.A.	PBS + TWEEN 0,05 %	PBS + TWEEN 0,05 % 5 h T.A. Sérums au 1/500	Peroxydase PBS + TWEEN 0,05 % 1 nuit T.A.	Acide 5 Am. 15 mn T.A. Arrêt : NaOH	Micro Polys.	
						.../...	



ANTIGENE	INCUBATION	LAVAGE	TAMPON SERUM	CONJUGUE	SUBSTRAT	SUPPORT	REF.
mf. W. bancrofti	1,5 µg/puits	?	?	Pénicillinase	Pénicillinase + iodine	Micro Polyv.	102
As. suum	10 µg/ml CO ₃ pH 9,6 1 nuit + 4°C	PBS + TWEEN	PBS + TWEEN + Gélatine 3 h T.A. Sérum au 1/200	Peroxydase 3 h	Acide 5 Am. 1 h	Micro Polys.	141
mf. W. bancrofti	2 µg/ml CO ₃ pH 9,6 3 h 37°C + 1 nuit 4°C	PBS + sérum de bovin immu- nisé S. digitata + TWEEN	1 h 37°C même tampon	Peroxydase 1 h 37°C	O.P.D. 20 mn 37°C	Tubes Polys.	57

TABLEAU I : MODIFICATIONS APORTEES A LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

ABBREVIATIONS UTILISEES

T.A.	Température ambiante	Acide 5 Am.	Acide 5 Aminosalicylique
Hydat.	Hydatique	O.T.	Orthotoluidine
Sch.	Schistosome	O.P.D.	Orthophényl diamine
mf. W. bancrofti	Microfilaires <u>Wuchereria bancrofti</u>	Tubes Polys.	Tubes polystyrène
As. suum	<u>Ascaris suum</u>	Micro Polys.	Microplaques à hémagglu- tination en polystyrène
Ag. Lille	Antigène préparé à Lille (Institut Pasteur)	Micro Polyv.	Microplaques en polyvinyl
Ag. BILT.	Antigène préparé à BILTHOVEN (Institut National de Santé)	P/V	Poids sur Volume
CO ₃	Tampon Carbonate	E.S.	Excrétés et Secrétés.
PBS	Tampon phosphate		
BSA	Albumine bovine		
FCS	Sérum de veau foetal		
PHOS. ALC.	Phosphatase Alcaline		
N.P.P.	Para nitrophénylphosphate		

d'antigènes solubles. La très grande sensibilité de la méthode demande une purification extrêmement poussée de ces antigènes. Les essais de réduction des réactions croisées lors de l'emploi d'antigènes hétérologues (55, 141) ne sont que des pis-aller.

Comme nous l'avons signalé plus haut (cf. purification des antigènes), l'utilisation des produits de sécrétion et d'excrétion ainsi que l'apport fondamental de la chromatographie d'affinité ont ouvert des perspectives intéressantes pour les recherches dans le domaine de la parasitologie.

La faible quantité d'antigène nécessaire à l'exécution de la technique E.L.I.S.A. (de l'ordre de 0,2 à 2 microgrammes par réaction) permet de mettre l'accent sur la purification des antigènes, bien que la quantité d'antigènes nécessaires ne semble pas dépendre de sa pureté (6).

2.3.- Sensibilisation des supports

Les meilleurs résultats sont obtenus en incubant l'antigène en tampon à pH alcalin (5). Il apparaît intéressant de faire précéder l'incubation d'un passage des plaques à 37°C (144). ROFFI (141) note que certains supports nécessitent un prétraitement à la glutaraldehyde avant leur utilisation. DEELDER (45) fait la même constatation avec la poly-L.lysine.

2.4.- Liquide de lavage

A priori, aucun liquide de lavage ne semble devoir être écarté. Ce qui importe surtout c'est la qualité de ces lavages. En général, un minimum de trois lavages de cinq minutes chacun est nécessaire pour obtenir des résultats corrects. La majeure partie des auteurs utilise du polysorbate (TWEEN 20) dans leurs tampons.

2.5.- Tampons d'incubations

L'adjonction de macromolécules (gélatine, BSA, sérum de veau...) aux tampons d'incubation des sérums et des conjugués réduit considérablement le "bruit de fond" dû à la fixation non spécifique des sérums et des conjugués. Certains produits, tel le polyéthylène glycol ajouté aux tampons, peuvent donner des résultats concluants (153).

2.6.- Choix du conjugué

Les deux enzymes les plus couramment utilisés sont la peroxydase et la phosphatase alcaline. La peroxydase possède l'avantage d'aboutir à une coloration brune parfaitement décelable à l'oeil (24). La phosphatase alcaline présente l'intérêt de développer une cinétique plus lente et surtout d'être moins influencée par la température de la réaction (5). Quand on connaît les difficultés à obtenir des températures relativement basses en milieux d'endémies parasitaires, la phosphatase alcaline s'impose comme enzyme de marquage. De plus, la coloration développée avec la phosphatase alcaline peut être aisément

bloquée (30).

Le couplage de cet enzyme avec les protéines s'effectue soit à l'aide de la glutaraldehyde (9, 10, 11), soit par oxydation par le periodate de sodium (128). Les conjugués les plus souvent commercialisés sont ceux qui utilisent la technique à la glutaraldéhyde.

2.7.- Substrat

Le substrat de la phosphatase alcaline est le paranitrophenyl phosphate. Le tampon adéquat à ce substrat est un tampon diethanolamine à pH alcalin et contenant des ions magnésium (173).

La peroxydase possède plusieurs substrats utilisables (5). Actuellement, les plus utilisés sont l'ortho toluidine et l'acide 5 Amino-salicylique.

2.8.- Durée et température

Les meilleurs résultats ont été obtenus en incubant les sérums et les conjugués à 37°C. La réaction enzyme-substrat doit se faire à la température ambiante (6, 30). Pour l'utilisation de la peroxydase, l'obscurité est indispensable. Le temps de révélation varie d'un système à l'autre. Toutefois, une durée de 30 minutes est en tous les cas suffisante pour visualiser la réaction, et n'est pas trop importante pour dépasser le pic de coloration.

La cinétique de la réaction à la phosphatase est plus lente que celle à la peroxydase et, de plus, la température influe moins sur la phosphatase que sur la peroxydase (174). Comme il est difficile en milieu équatorial d'obtenir, même en local climatisé, une température inférieure à 20°C, la phosphatase alcaline semble mieux adaptée aux diagnostics sur le terrain des maladies parasitaires.

3.- AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'E.L.I.S.A.

L'OMS (133) a défini les qualités d'une technique d'immuno-diagnostic. Elle doit être SENSIBLE, SPECIFIQUE, QUANTITATIVE, ECONOMIQUE et APPLICABLE DANS LES ZONES D'ENDEMIC.

3.1.- Sensibilité

Les études ont surtout été faites par rapport à la R.I.A. (176, 53) et par rapport aux techniques I.F.I. (ImmunoFluorescence Indirecte) (4). Pour l'immunofluorescence, dans une étude portant sur 450 sérums, l'auteur conclut que le pourcentage global de positivité est sensiblement identique dans les deux méthodes. Toutefois, la grande sensibilité de la technique E.L.I.S.A. conduit à des résultats quantitativement supérieurs donc d'interprétation plus facile (4). Par rapport à la R.I.A., la sensibilité est quasiment la même.

3.2.- Spécificité

La spécificité de la réaction E.L.I.S.A. est liée à la pureté des antigènes. Ce problème constitue, à l'heure actuelle, un facteur limitant de la technique surtout dans les zones où plusieurs parasitoses coexistent (141).

3.3.- Possibilité de quantifier les résultats

La technique E.L.I.S.A. se prête aisément à la quantification des résultats. Des études sont en cours de manière à fournir des produits de référence aux expérimentateurs (132, 133), et d'établir une méthodologie et un compte-rendu des résultats standardisés (54). D'ores et déjà, la technique E.L.I.S.A. est appliquée commercialement au diagnostic de certaines parasitoses (177).

3.4.- Coût de la réaction

La technique E.L.I.S.A. ne nécessite pas un équipement aussi sophistiqué que l'I.F.I. et, à fortiori, que la R.I.A. De plus, elle ne présente pas les dangers de la manipulation de produits radioactifs. Les produits nécessaires à la réaction E.L.I.S.A. sont certes plus coûteux que ceux utilisés en I.F.I., mais la faible quantité de produits entrant en réaction et la bonne stabilité des produits utilisés, même dans les conditions défavorables imputables aux régions d'endémies, font que cet argument tombe de lui même. Il faut ajouter que les populations des zones d'endémies parasitaires sont en général plus

réticentes que d'autres aux prélèvements sanguins (5, 177). La technique E.L.I.S.A., du fait qu'elle est peu consommatrice de sérum, semble parfaitement adaptée au diagnostic de masse. Les résultats des essais effectués sur des échantillons prélevés au lobe de l'oreille et recueillis sur papier filtre l'ont largement confirmé (54).

3.5.- Utilisation de la technique en zone d'endémie

La situation même du C.I.R.M.F., le fait que les prélèvements nous soient parvenus d'un rayon de plus de 70 kilomètres, répond favorablement à cette question.

A l'heure actuelle, les laboratoires capables d'effectuer la technique E.L.I.S.A. se trouvent encore éloignés des zones de prélèvements.

Un laps de temps de 24 à 48 heures entre le prélèvement sanguin et l'analyse n'influence pas la concentration des anticorps (24, 169).

Le prélèvement effectué par ponction au doigt et recueilli sur papier filtre (112, 119) accroît considérablement ce délai et rend ainsi la technique E.L.I.S.A. parfaitement adaptée au diagnostic parasitaire.

Dans le Tableau II, la technique E.L.I.S.A. est comparée au R.I.A. et à l'I.F.I., le R.I.A. étant la technique qui se rapproche le plus de l'E.L.I.S.A., bien que son utilisation en parasitologie soit très limitée (132), alors que l'I.F.I. est la technique de sérodiagnostic la plus largement répandue en épidémiologie parasitaire.

CRITERES	E.L.I.S.A.	R.I.A.	I.F.I.
Sensibilité	+++	+++	+
Spécificité	Fonction de l'antigène	Fonction de l'antigène	en général +
Reproductibilité (A)	+++	+++	++
Lecture (A)	Objective	Objective	Subjective
Application sur le terrain	+++	-	+
Automatisation (1)	+++	+++	-
Coût de la réaction	-	+++	++
Préparation des antigènes	Difficile	Difficile	Facile
Risque de contamination	-	+++	-

TABLEAU II : COMPARAISON DES TECHNIQUES E.L.I.S.A., R.I.A. et I.F.I.

(A) L'emploi de systèmes automatiques, surtout au niveau de la lecture des résultats (37, 40, 120, 151, 155) permet une manipulation parfaitement standardisée pour un système E.L.I.S.A. donné, sans faire intervenir le coefficient propre à l'expérimentateur.

Un autre avantage fondamental de la technique E.L.I.S.A. est la possibilité qu'elle offre de pouvoir s'appliquer directement à la recherche des antigènes circulants (172, 143, 171, 174), alors que les techniques R.I.A. et I.F.I. demandent l'emploi simultané d'un système "Defined Antigen Substrate Sphere (D.A.S.S.) (47, 48).

La Figure 2 schématise la technique E.L.I.S.A. dans ses deux applications.

4.- APPLICATION DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A. AU DOSAGE DES ANTICORPS ET DES ANTIGENES D'HELMINTHIASES

Plusieurs auteurs ont publié des articles généraux sur l'application de la technique E.L.I.S.A. aux parasitoses. Les plus significatifs sont groupés dans le Tableau III.

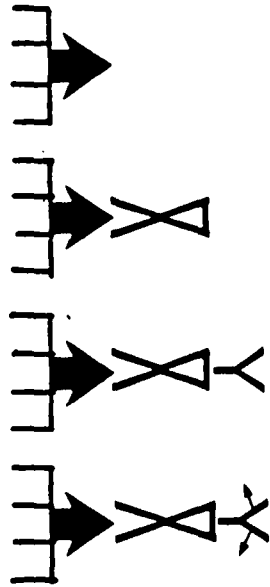
Nous signalons également deux articles généraux présentant plusieurs méthodes de sérodiagnostic des parasitoses (100, 177).

4.1.- Trématodes

4.1.1. Bilharzioses

Les articles les plus nombreux concernant la technique E.L.I.S.A. appliquée aux verminoses sont ceux se rapportant aux infections dues aux Schistosomes. En effet, la production d'antigènes ne pose pas d'énormes difficultés car l'infestation expérimentale par les Schistosomes est relativement aisée à réaliser.

dosage des anticorps



dosage des antigènes

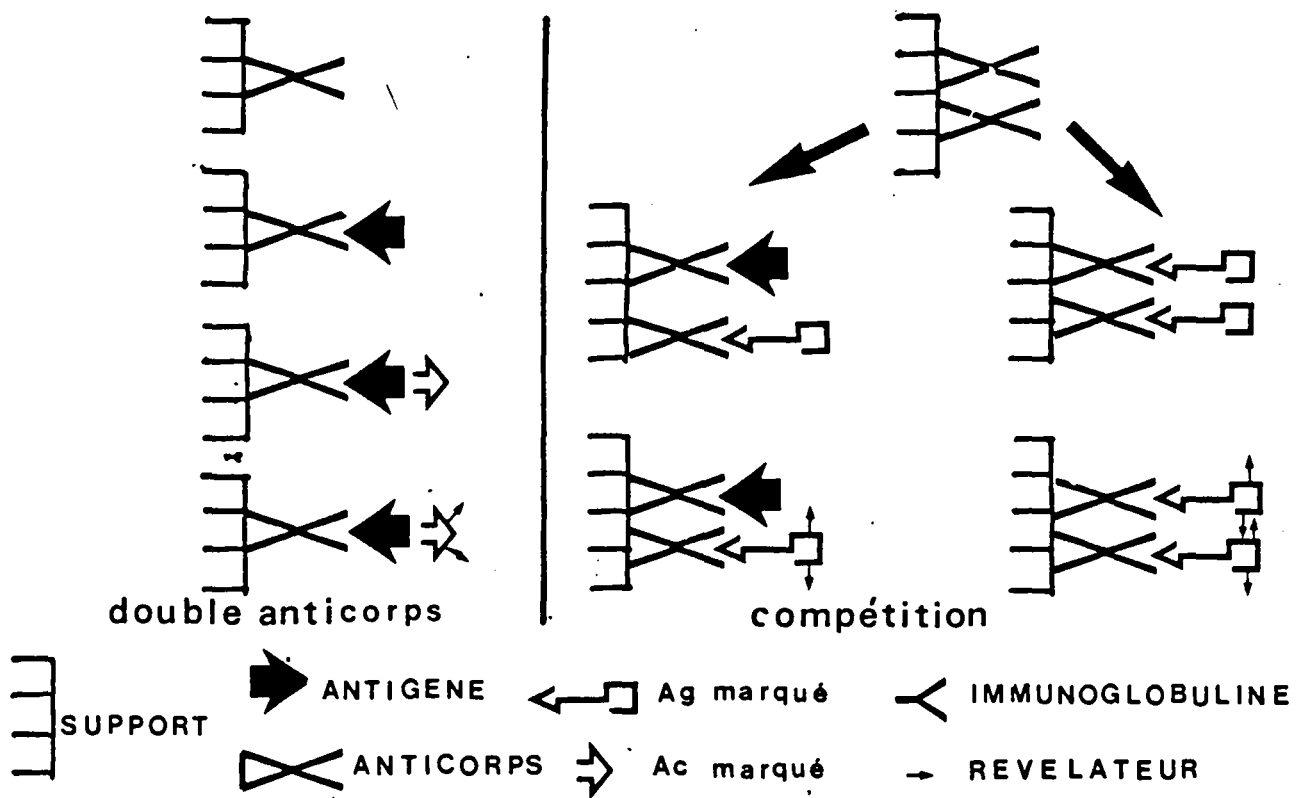


figure 2 : Principe de l'E.L.I.S.A.

SUJETS TRAITES	REFERENCES
Application aux parasites	29
Application aux parasites	22
Corrélation avec d'autres sérologies	23
Application aux parasites	174
Evaluation de certains paramètres	24
Application aux parasites	149
Comparaison avec R.I.A.	176
Article général	171
Etude de 17 antigènes parasitaires	5, 6
Article général	90
Application en parasitologie et mycologie	30
Application de la microméthode	172
Application aux parasites pour IgG, IgM	86
Article général	80, 81

TABLEAU III : ARTICLES GENERAUX

Les premières publications sur le sujet apparaissent dès 1975 (29). Les auteurs utilisent un extrait brut issu de vers adultes. La même année, HULDT (96) applique la technique E.L.I.S.A. à des extraits purifiés d'oeufs. LUNDE (117) étudie ces deux types d'antigènes conjointement à un extrait de cercaires. Les auteurs concluent à une meilleure sensibilité des extraits d'oeufs et, en analysant les sérums de malades avec des antigènes de vers et de cercaires, ils déterminent une meilleure réponse aux antigènes cercariens en cas d'infestation récente, et réciproquement une meilleure réponse aux antigènes de vers adultes en cas d'infestation chronique. Ces travaux ont été confirmés récemment par SUZUKI (160). A partir d'antigènes extraits d'adultes, FARAG (70) établit une spécificité dans diverses infestations à Schistosomes, mais, dans son étude, 11 sujets sur 16, ne présentant pas d'oeufs dans les selles et/ou dans les urines mais vivant en zone d'endémie bilharzienne, présentent une réponse immunologique positive.

A l'aide d'un antigène mixte de cercaires et d'adultes, LUNDE (118) étudie les anticorps de type IgG et IgM. Il différencie les infections aiguës et chroniques.

A l'aide des antigènes extraits d'adultes, PINON (139) couple une immunoélectrodifusion à un E.L.I.S.A. La technique ainsi décrite, et appelée E.L.I.E.D.A. par les auteurs, met en évidence deux fois plus de systèmes antigènes-anticorps précipitants par rapport à l'immunoélectrodifusion classique.

ROTMANS (148) compare, en technique E.L.I.S.A., des antigènes extraits d'adultes avec des produits de sécrétion et d'excrétion d'oeufs chez S. mansoni. Avec les antigènes bruts, il note d'importantes réactions croisées avec S. haematobium, F. hepatica, E. granulosus, O. volvulus, S. stercoralis, E. histolytica. En fractionnant par chromatographie les produits d'excrétion et de sécrétion, il observe une disparition des réactions croisées avec les fractions à haut poids moléculaire (PM > 200 000). Les auteurs avaient montré que les fractions extraites d'adultes responsables des réactions spécifiques étaient celles de poids moléculaires compris entre 60 000 et 180 000 (147).

KELSOE (104) montre que la technique E.L.I.S.A. appliquée aux Bilharzioses à S. mansoni, en utilisant des extraits d'adultes, est plus spécifique si les plaques sont prétraitées à la Poly-L.lysine. DEELDER (45, 46) caractérise deux fractions responsables de la spécificité de la réaction ; ces fractions sont associées à des polysaccharides intestinaux. En étudiant sept fractions antigéniques issues d'adultes, d'oeufs, de produits d'excrétion et de sécrétion, séparées par chromatographie, cet auteur confirme le bien fondé du traitement des microplaques par la Poly-L.lysine. Dans cette expérimentation, le meilleur antigène est une fraction d'extrait d'adulte soluble dans l'acide trichloracétique (46).

Dans une étude sur S. japonicum, LONG (113, 114, 115) montre que les meilleurs antigènes pour l'E.L.I.S.A. sont des extraits d'oeufs, la fraction responsable de la spécificité de la réaction étant une glycoprotéine.

MADWAR (121) montre que la recherche des antigènes circulants en cas d'infestation par des S. haematobium donne des résultats supérieurs par une technique d'électrophorèse à contre courant par rapport à un E.L.I.S.A. Cet auteur utilise des anticorps induits par des extraits d'adultes. En utilisant les mêmes types d'anticorps, ISMAIL (98) applique une technique E.L.I.S.A. à double anticorps et détermine que la détection des antigènes circulants est possible trois semaines après une infestation expérimentale chez le babouin ; la réponse maximum de la réaction se situe à la 16ème semaine. Alors que le taux d'anticorps n'est décelable qu'après 9 semaines pour atteindre un maximum à 28 semaines après l'infestation, le taux d'antigène circulant décroît rapidement après traitement (4 à 5 semaines) ; ainsi la technique permet de juger de l'efficacité d'un traitement.

FERREIRA (72) détecte les antigènes circulants de S. mansoni chez la souris infestée par une faible quantité de cercaires ; ces antigènes sont de type polysaccharides.

La plupart des auteurs cités comparent la technique E.L.I.S.A. à d'autres méthodes immunologiques. Nous signalons dans le Tableau IV d'autres auteurs qui ont plus spécialement effectué des études comparatives entre la technique E.L.I.S.A. et les autres méthodes diagnostiques des Bilharzioses.

Le prélèvement de faible quantité de sang sur papier filtre s'applique parfaitement à l'immunodiagnostic des Bilharzioses par la technique

PARASITES	ELEMENTS DE COMPARAISON	REFERENCES
<i>S. japonicum</i>	Circumoval precipitation) 183
	Comptage des oeufs dans les selles	
<i>S. haematobium</i>	Immunofluorescence indirecte) 87
<i>S. mansoni</i>	Immunoagglutination	
<i>S. hematobium</i>	Circumoval precipitation) 93
<i>S. mansoni</i>	Immunodiffusion rapide	
<i>S. mansoni</i>	Defined antigen substrate spheres) 48
<i>S. mansoni</i>	Radio immuno assay) 92, 91
	Circumoval precipitation	

TABLEAU IV : ETUDE COMPARATIVE DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.
A D'AUTRES METHODES DIAGNOSTIC

E.L.I.S.A. (112, 119).

Les travaux effectués avec une technique E.L.I.S.A. ont permis de mettre en évidence des anticorps dirigés contre le DNA chez les animaux infestés par S. mansoni (94), ainsi que des résistances croisées aux infestations entre S. haematobium et S. mansoni (178).

4.1.2.- Fasciolase

On sait que le diagnostic immunologique des infestations à Fasciola hepatica est très important car cette maladie ne s'extériorise que tardivement (apparition des oeufs dans les selles en trois ou quatre mois). En utilisant une technique E.L.I.S.A., LEVINE (109) détecte les anticorps anti-fasciola chez la souris deux semaines après l'infestation ; par contre, l'efficacité du traitement est, selon cet auteur, mieux étudiée par une technique d'électrophorèse à contre courant, alors que HILLYER (87) juge la technique E.L.I.S.A. parfaitement adaptable aux suivis des traitements en utilisant un antigène d'adulte de F. hepatica purifié sur Sephacryl S 200.

GRELCH (83) compare la technique E.L.I.S.A. à l'immunofluorescence pour le sérodiagnostic des fasciolases bovines. L'intérêt de la technique E.L.I.S.A. est confirmé par BURDEN (25) qui, en outre, montre l'absence de réactions croisées avec des sérums de veaux infestés par Ostertagia ostertagi.

4.2.- Cestodoses

Les premiers travaux sur les applications de la technique E.L.I.S.A. aux hydatidoses datent de 1975 (23, 69). La valeur du diagnostic est confirmée dans la littérature (4, 6, 7), bien que les réactions croisées soient nombreuses dans l'étude de cette parasitose (97). FELGNER (71) propose le stick E.L.I.S.A. comme une alternative intéressante. PINON (140) utilise son système E.L.I.E.D.A. pour suivre l'évolution des hydatidoses et identifier les IgM en cas de rupture de kystes hydatiques du foie, ou les IgA pour les kystes pulmonaires.

Les études comparatives de l'E.L.I.S.A. avec les autres méthodes immunologiques (125, 158) ont amené les auteurs à considérer la technique E.L.I.S.A. comme une méthode de choix dans les zones où l'hydatidose ne coexiste pas avec d'autres parasitoses voisines. En tout lieu, la méthode E.L.I.S.A. reste excellente pour juger de l'efficacité du traitement des hydatidoses. Tous les auteurs s'accordent pour dire que la technique E.L.I.S.A. ne sera vraiment fiable pour l'hydatidose que lorsque les expérimentateurs obtiendront des purifications très poussées des liquides hydatiques.

Les travaux concernant les autres cestodoses portent essentiellement sur le diagnostic des cysticercozes à Taenia solium (8, 38, 58) et à Taenia saginata (82). Là encore, le principal écueil à la technique est la présence de réactions croisées nombreuses.

4.3.- Nématodoses

4.3.1.- Nématodes intestinaux

Chez les nématodes intestinaux, les résultats présentés par l'application de la technique E.L.I.S.A. sont, à ce jour, décevants (33, 129) car les nématodes intestinaux possèdent entre eux de nombreuses communautés antigéniques qui ne permettent pas un diagnostic spécifique des maladies. De plus, l'extériorisation des maladies par la présence d'oeufs de nématodes dans les selles est, en général, suffisante pour établir un diagnostic sûr. La technique E.L.I.S.A. est d'un grand intérêt dans les nématodoses tissulaires, soit parce que ces maladies ne s'extériorisent pas (Larva migrans, Trichinose), soit parce que la présence des parasites ne reflète que très imparfaitement l'infestation (Filariose).

4.3.2.- Larva migrans

Les travaux effectués sur les syndromes de Larva migrans montrent une possibilité très grande de diagnostic par la méthode E.L.I.S.A., et ceci soit avec des antigènes homologues (43, 78), surtout des produits d'excrétion et de sécrétion (51), soit même avec des antigènes hétérologues (180).

4.3.3.- Trichinose

C'est pour la trichinose que les premières applications de la technique E.L.I.S.A. aux helminthiases furent décrites (150). Pour cette maladie, les travaux ont surtout porté sur un diagnostic vétérinaire. Dans une étude effectuée dans huit pays Européens (167), la

technique E.L.I.S.A. est comparée à trois autres méthodes diagnostiques (trichinoscopie, digestion musculaire et immunofluorescence). Les auteurs concluent à l'efficacité de l'E.L.I.S.A. et de l'immunofluorescence par rapport aux techniques directes avec une plus grande sensibilité de la technique E.L.I.S.A. et une meilleure corrélation entre les différents expérimentateurs.

Pour la trichinose humaine, la technique E.L.I.S.A. a permis de détecter des immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE spécifiques de la maladie (168).

4.3.4.- Filarioses

La difficulté à obtenir des antigènes homologues dans les filarioses humaines (exception faite d'Onchocerca volvulus) a amené les auteurs à utiliser, pour le sérodiagnostic des filarioses, des antigènes d'autres nématodes (Ascaris suum, Dipetalonema vitae...). Les résultats obtenus en technique E.L.I.S.A. avec de telles préparations antigéniques se sont avérés décevants (141). Une meilleure approche du problème est d'utiliser des antigènes de filaires autres que celles étudiées ; ainsi Brugia malayi est utilisée avec une bonne spécificité au diagnostic de Wuchereria bancrofti (134). Pour la même affection, DISSANAYAKE (55, 56) utilise des antigènes de Serataria digitata ; il observe une bonne sensibilité et un faible nombre de réactions croisées. Ces auteurs ont, par une technique E.L.I.S.A., mis en évidence des immunoglobulines IgM dans le sang de cordon ; ils concluent à la possibilité d'une infestation transplacentaire par W. bancrofti (57).

technique E.L.I.S.A. est comparée à trois autres méthodes diagnostiques (trichinoscopie, digestion musculaire et immunofluorescence). Les auteurs concluent à l'efficacité de l'E.L.I.S.A. et de l'immunofluorescence par rapport aux techniques directes avec une plus grande sensibilité de la technique E.L.I.S.A. et une meilleure corrélation entre les différents expérimentateurs.

Pour la trichinose humaine, la technique E.L.I.S.A. a permis de détecter des immunoglobulines IgG, IgM, IgA et IgE spécifiques de la maladie (168).

4.3.4.- Filarioses

La difficulté à obtenir des antigènes homologues dans les filarioses humaines (exception faite d'Onchocerca volvulus) a amené les auteurs à utiliser, pour le sérodiagnostic des filarioses, des antigènes d'autres nématodes (Ascaris suum, Dipetalonema vitae...). Les résultats obtenus en technique E.L.I.S.A. avec de telles préparations antigéniques se sont avérés décevants (141). Une meilleure approche du problème est d'utiliser des antigènes de filaires autres que celles étudiées ; ainsi Brugia malayi est utilisée avec une bonne spécificité au diagnostic de Wuchereria bancrofti (134). Pour la même affection, DISSANAYAKE (55, 56) utilise des antigènes de Serataria digitata ; il observe une bonne sensibilité et un faible nombre de réactions croisées. Ces auteurs ont, par une technique E.L.I.S.A., mis en évidence des immunoglobulines IgM dans le sang de cordon ; ils concluent à la possibilité d'une infestation transplacentaire par W. bancrofti (57).

Une filaire de chien (Dirofilaria immitis) semble être une bonne source d'antigène pour le diagnostic par E.L.I.S.A. des filarioses humaines (179).

Onchocerca volvulus peut être récolté relativement facilement à partir des nodules onchocerquiens ; ainsi les antigènes homologues préparés et purifiés donnent des résultats très satisfaisants en E.L.I.S.A. (3, 145), surtout s'il s'agit d'antigènes métaboliques (44). A notre connaissance, les seuls travaux utilisant comme source d'antigènes des microfilaires sont ceux de KALIRAJ (102, 103), ceux de DISSANAYAKE (57) avec des antigènes somatiques de Wuchereria bancrofti, et ceux de KHARAT (105) qui utilise des antigènes métaboliques de Wuchereria bancrofti.

CONCLUSION

La connaissance des antigènes parasitaires reste très imparfaite et suivant les recommandations de l'OMS (132, 133), l'accent doit être mis sur l'étude de ces antigènes à tous les stades du développement des parasites. Ces études doivent être orientées dans plusieurs directions :

- une meilleure séparation et une meilleure purification des produits antigéniques à partir des hôtes intermédiaires et définitifs ;*
- une meilleure connaissance des impératifs de culture in vitro des parasites ;*

- une étude approfondie des relations hôtes-parasites.

La technique E.L.I.S.A. semble être la méthode qui réunit le plus de critères recommandés par l'OMS ; toutefois, il semble irrationnel de développer des techniques sophistiquées pour doser des anticorps (ou les antigènes) et en utilisant encore des antigènes (ou les anticorps) "incorrects" (49).

DEUXIEME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE PREMIER

EXTRACTION ET PURIFICATION DES ANTIGENES DE LOA LOA

1.- MATERIEL ET METHODES

1.1.- Isolement des microfilaires

Pour l'obtention des microfilaires nécessaires à la préparation des antigènes, nous avons utilisé une technique dérivée de celle que nous avons mise au point dans notre laboratoire (75). La méthode modifiée a fait l'objet d'une récente publication (79). Les modifications portent essentiellement sur trois points :

- l'adjonction, dans tous les milieux, d'E.D.T.A. Na (Ethylénediamine tétracétique acide tétrasodium dihydrate), aux mêmes concentrations que celles employées pour les prélèvements sanguins (0,75 mg d'E.D.T.A. Na par ml de milieu) a permis d'éviter la formation d'un réseau de fibrine qui gênait considérablement la récolte des microfilaires ;
- l'utilisation systématique de pénicilline (100 UI/ml) et de streptomycine (0,1 mg/ml) a permis d'éviter la contamination bactérienne ;
- l'emploi d'une "chambre de migration" a permis de recueillir plus aisément et avec plus de sécurité les microfilaires isolées et surtout d'aboutir à la production de produits d'excrétions et de sécrétions utilisables comme antigènes métaboliques.

L'isolement des microfilaires se déroule en deux temps : après une agglutination des hématies, les microfilaires sont extraites de leur milieu par migration en veine liquide.

1.1.1.- Réactifs

. RPMI - HEPES

RPMI 1640 (Flow Laboratoires).....	100 ml
HEPES (25 mM).....	596 mg
Pénicilline.....	10 000 UI
Streptomycine.....	10 mg

(HEPES = N.2. Hydroxyethylpiperazine N'2. ethanesulphonic acid)
filter sur 0,22 μ et vérifier que le pH est compris entre 6,8
et 7,2.

. RPMI - HEPES - EDTA

RPMI - HEPES.....	100 ml
EDTA Na.....	75 mg

filtrer sur 0,22 μ .

. FICOLL - EDTA

Ficoll type F.P. (d = 1.077 - Sigma Laboratoire).	100 ml
EDTA Na.....	75 mg

filtrer sur 0,22 μ

. CHAMBRES DE MIGRATION (Fig. 3)

Elles sont réalisées à l'aide de boîtes Falcon de 50 cm³ (Poly-labobloch réf. 19009) et de paillettes à insémination artificielle (I.M.V. réf. 101) de 250 μ l. L'étanchéité est assurée par une résine du type RUBSON (R).

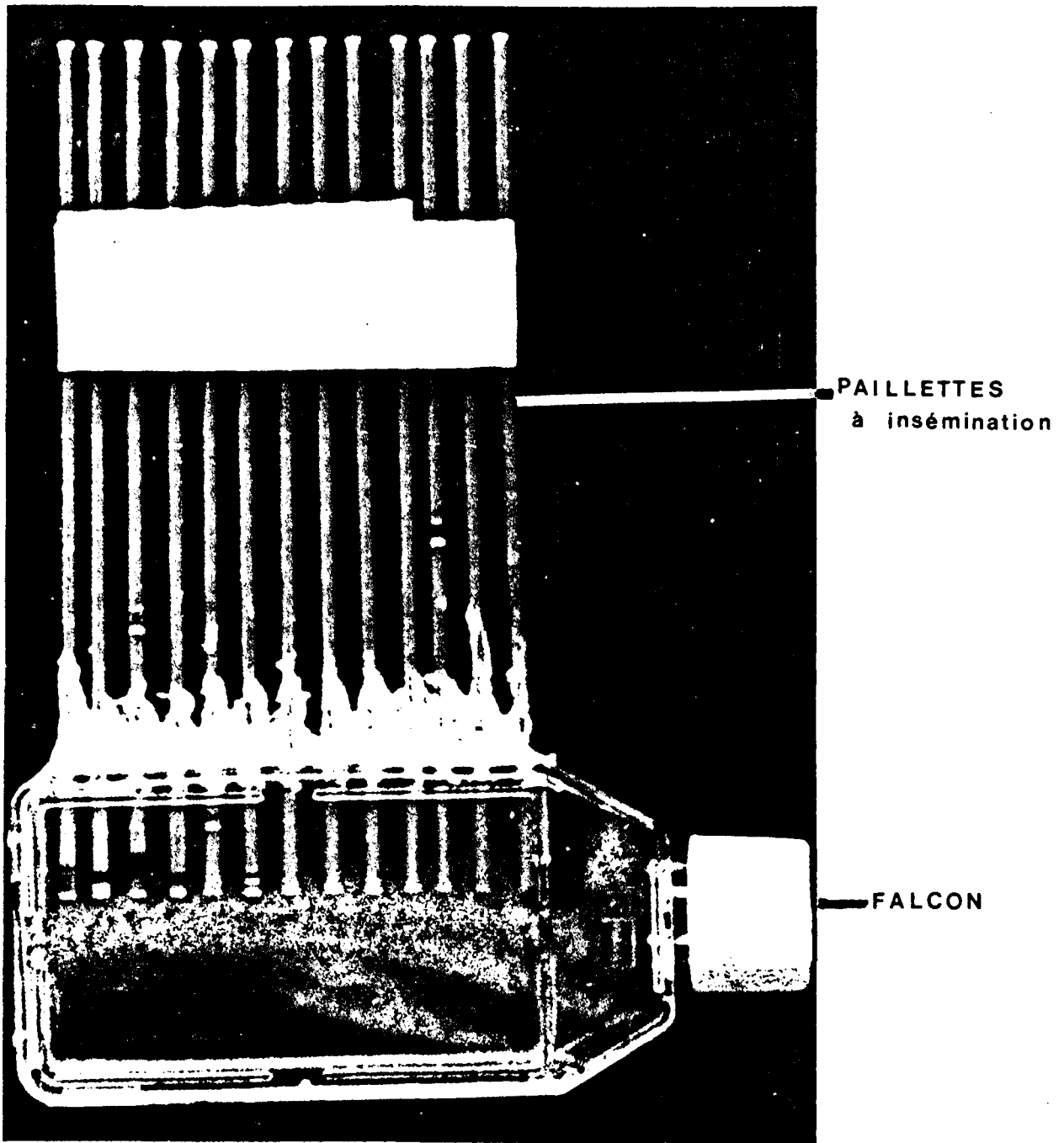


figure 3: Chambre de migration

1.1.2.- Agglutination des hématies

Le sang riche en microfilaires est recueilli sur EDTA stérilement par ponction au pli du coude (tube Venoject Terumo réf. T 206 Q). Après comptage initial des microfilaires, à raison de cinq comptages de 50 μ l de sang total homogénéisé examiné directement entre lame et lamelle au microscope (objectif 10 ; oculaires 10), le sang est déposé délicatement sur une solution de FICOLL - EDTA en tube de verre stérile (100 x 16) à raison de 5 ml de sang total pour 3,5 ml de solution de FICOLL-EDTA.

Les tubes sont placés verticalement à la température ambiante. Au contact du Ficoll, les hématies s'agglutinent spontanément et sédimentent au fond du tube. Après un temps variable pour chaque sang, mais situé entre 45 et 90 mn, les tubes présentent trois phases qui sont de haut en bas (Fig. 4) :

- 1) une phase plasma contenant : la majorité des thrombocytes, des leucocytes, quelques hématies et des microfilaires ;
- 2) une phase Ficoll contenant : quelques hématies, quelques leucocytes, quelques thrombocytes et des microfilaires ;
- 3) une phase contenant la majeure partie des hématies.

Les phases contenant les microfilaires (phases 1 et 2) sont reprises stérilement à la pipette Pasteur. Elles sont transférées en tubes plastique de 5 ml et centrifugées pendant 15 mn (accélération = 500 g). 300 à 500 μ l de surnageant sont conservés.

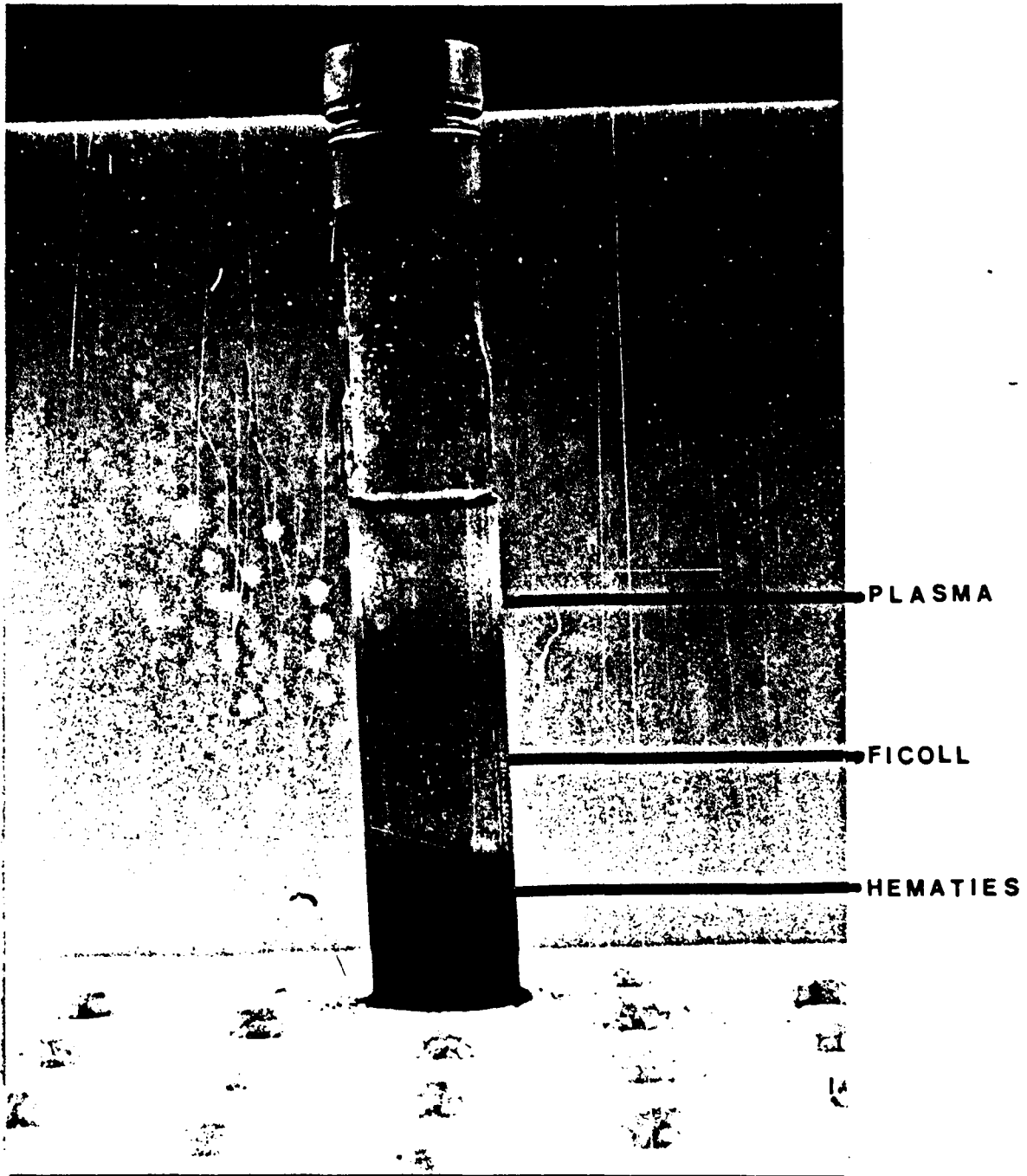


figure 4: Sédimentation sur ficoll

1.1.3.- Isolement

Les "chambres de migration" sont remplies par 15 ml de RPMI-HEPES-EDTA. Le remplissage des paillettes se fait par capillarité ; si nécessaire, il est assuré par aspiration. Les chambres de migration sont maintenues en position parfaitement horizontale.

- 70 μ l de culot riche en microfilaires, remises en suspension par passage sur vortex pendant 30 à 45 secondes, sont introduits dans chaque paillette à l'aide d'une pipette automatique type GILSON pipetman. L'ensemble est porté en chambre humide à la température ambiante durant 18 à 24 h.

- La migration complète des microfilaires est vérifiée sous une loupe binoculaire par leur totale disparition des paillettes.

- Le RPMI-HEPES-EDTA est prélevé stérilement à la pipette Pasteur avec une remise en suspension douce pour décrocher les microfilaires adhérant au plastique.

- Une centrifugation de 500 g en fond de tube permet la récolte de la totalité des microfilaires présentes dans le RPMI-HEPES-EDTA. Le surnageant est conservé. Il servira à la préparation de l'antigène métabolique. Pour leur utilisation ultérieure, les microfilaires sont lavées dans les milieux adéquats par centrifugation à 300 g en fond de tubes pour éliminer les quelques thrombocytes présents ; 3 lavages successifs sont en général suffisants pour obtenir une suspension de microfilaires parfaitement pure.

1.2.- Préparation des antigènes somatiques

Pour préparer les antigènes somatiques, nous avons utilisé la méthode par broyage à froid au mortier avec congélation et décongélation successives. Cette technique présente l'avantage, d'une part d'être d'exécution facile sans emploi de matériel lourd et, d'autre part, de s'effectuer en totalité à basse température, ce qui préserve au maximum l'intégrité des protéines.

Les microfilaires recueillies après migration sont "lavées" en tampon phosphate à pH 7,2 par centrifugation à 300 g en fond de tubes pour éliminer les thrombocytes restants. La pureté du produit est vérifiée au microscope inversé.*

Après parfaite pureté de la suspension de microfilaires, le culot est repris dans 5 à 6 ml de tampon phosphate et déposé dans un mortier. Le tout est porté au congélateur à - 80°C durant 1 h.

Le broyage au pilon commence dès la sortie du congélateur et se poursuit jusqu'à décongélation complète, mais sans que le broyat atteigne une température supérieure à 4°C.

Les congélations, décongélation et broyages sont poursuivis jusqu'à obtention d'un fractionnement complet des microfilaires (aucune fraction de microfilaire ne doit excéder 2 à 3 μ).

Le mélange est porté à + 4° C pendant 24 h pour parfaire l'extraction. Le surnageant est ensuite recueilli par ultracentrifugation à

* *Microscope BIOVERT - REICHERT Constructeur - objectif 25 X, contraste de phase, oculaire 10 X.*

37 000 g en fond de tube à 4°C* durant 1 h. Le surnageant est ensuite stocké à - 80°C jusqu'au moment de l'emploi. Il constitue l'antigène somatique brut (Ag S1).

1.3. - Préparation des antigènes métaboliques

Au cours de l'isolement des microfilaires, nous avons pu mettre en évidence des variations de pH et une augmentation de la concentration en protéines du milieu de migration. Ces remarques nous firent supposer que des produits auraient été sécrétés ou excrétés par les microfilaires durant leur migration. C'est ainsi que nous avons pu isoler des antigènes métaboliques microfilariens.

Le RPMI-HEPES-EDTA est recueilli par centrifugation. Les protéines présentes sont ramenées en tampon phosphate, pH 7,2, par filtration sur gel (colonne Séphadex G 25). Après ultracentrifugation à 37 000 g à 4°C durant 1 h, le surnageant est décanté. Il est conservé à - 80°C jusqu'à l'emploi. Il constitue notre antigène métabolique brut (Ag M1).

1.4. - Dosage des protéines

Pour doser les protéines des produits, la méthode d'estimation directe en ultraviolet à 280 nm a été choisie. Cette méthode présente, vis-à-vis de toutes les autres, l'énorme avantage de ne pas détruire l'échantillon.

* Centrifugeuse BECKMAN J2-21, Rotor JA 21, 18 000 rpm.

Les protéines ont un spectre d'absorption présentant un pic dans l'ultraviolet à 280 nm. Ce pic est principalement dû à la présence de la tyrosine et du tryptophane (111). La technique issue de cette constatation est très simple et très rapide. Elle consiste à estimer la concentration en protéine d'une solution en comparant sa densité optique (Do) à celle d'une gamme étalon (5)*.

Les gammes étalons ont été réalisées à partir de BSA (Albumine bovine)**. Le solvant de la BSA est le même que celui de la solution de protéines à doser. Pour chaque dosage, un blanc sur le solvant et au minimum cinq points de courbe sont établis.

1.5.- Purification des antigènes

Pour purifier les antigènes, nous avons utilisé des techniques de chromatographie d'affinité utilisant des immunoadsorbants.

1.5.1.- Réactifs

. TAMPON DE LAVAGE

- . Acide chlorhydrique pur..... 100 µl (0,001 M)
- . Eau distillée.....QSP 1 000 ml

. TAMPON DE COUPLAGE

- . Hydrogénocarbonate de Sodium..... 0,84 g (0,1 M)
- . Chlorure de Sodium..... 2,92 g (0,5 M)
- . Eau distillée.....QSP 100 ml

* Nous avons utilisé un spectrophotomètre BECKMAN modèle 26, muni d'une lampe à deuterium (Réf. 585699).

** BSA Fraction V, produit Sigma N° 8022.

. TAMPON ACETATE

- . Acetate de Sodium cristallisé..... 2,720 g (0,02 M)
- . Acide acétique pur..... 4,7 ml
- . Chlorure de Sodium..... 58,4 g (1 M)
- . Eau distillée.....QSP 1 000 ml

Ajuster à pH 4 avec l'acide acétique ou la soude.

. TAMPON BORATE

- . Acide borique..... 6,20 g (0,1 M)
- . Chlorure de Sodium..... 58,4 g (1 M)
- . Eau distillée.....QSP 1 000 ml

Ajuster à pH 8 avec la soude.

. TAMPON HCl-Glycine pH 2,8

- . A 100 ml d'acide chlorhydrique 2 N, ajouter la quantité suffisante de glycine 2 N (150 g/l) pour amener le pH à 2,8
- . Compléter à 1 000 ml avec l'eau distillée.

. TAMPON HCl-Glycine pH 2,2

- . A 100 ml d'acide chlorhydrique 2 N, ajouter la quantité suffisante de glycine 2 N pour amener le pH à 2,2
- . Compléter à 1 000 ml avec l'eau distillée.

. SOLUTION DE NEUTRALISATION

- . Phosphate mono acide de potassium..... 174 g (1 M)
- . Eau distillée.....QSP 1 000 ml.

. SOLUTION PHYSIOLOGIQUE

- . Chlorure de Sodium..... 9 g
- . Eau distillée.....QSP 1 000 ml.

1.5.2.- Préparation du Sépharose

Pour les chromatographies d'affinité, nous avons utilisé un Sépharose 4B déjà activé*. Son emploi est très aisé, puisqu'il suffit de réhydrater l'agarose pour amorcer le couplage avec le ligand.

Le gel est dispersé pendant une demi heure à la température ambiante dans le tampon de lavage (15 ml)**. Il est lavé sur filtre en verre frité de porosité 1 ou 2, branché sur trompe à vide, avec 30 ml de tampon.

1.5.3.- Couplage du gel

Les protéines à coupler (cf. p. 52 "préparation des ligands") sont mélangées au gel en présence de tampon de couplage (30 mg de protéines dans 15 ml de tampon). Le gel est agité doucement, en tube fermé, pendant 4 h à 4°C sur un agitateur à rouleaux. Durant cette période, les liaisons covalentes se forment entre la matrice et le ligand.

L'immunoabsorbant est lavé sur verre frité par le tampon de lavage afin d'éliminer les protéines non fixées (30 ml). Il est incubé

* *Sépharose 4B CN Br activated produit Pharmacia N° 17 - 0430 - 01*

** *Tous les volumes et poids indiqués sont pour 1 g de gel sec.*

pendant 2 h à + 4°C, sous agitation douce avec l'éthanolamine (15 ml). Cette phase a pour but de saturer les sites non utilisés (éthanolamine 6,1 ml eau distillée qsp 100 ml).

Le gel est lavé successivement par le tampon Acétate et le tampon Borate (3 fois 15 ml de chaque solution). Le gel est alors prêt à l'emploi. Pour une utilisation différée, il est conservé en tampon Borate additionné de 0,01 % de merthiolate. Au moment de l'emploi, le merthiolate est éliminé par trois lavages successifs en tampon Borate et tampon Acétate.

1.5.4.- Chromatographie

Pour effectuer les chromatographies, nous avons utilisé une méthode par filtration (126) : les protéines à purifier sont mises en contact avec l'immunoabsorbant et agitées pendant 1 h à la température ambiante (2 mg de protéines à purifier dans 2,5 ml de tampon Borate). Le gel est filtré sur verre fritté ; l'éluat recueilli contient la majorité des protéines non liées au ligand. L'éluotion est parachevée par lavages successifs du gel par la solution physiologique jusqu'à obtention d'une densité optique de l'éluat inférieure à 0,005 à 280 nm (en général, quatre à cinq lavages par 2 ml sont suffisants).

Les phases suivantes de la chromatographie s'effectuent en chambre froide + 4°C : l'immunoabsorbant est mis en contact pendant 15 mn sous agitation douce avec le tampon Glycine 2,8 (2,5 ml). Il est filtré et l'éluat est immédiatement neutralisé (contrôle au pH mètre). Les

étapes agitation, filtration et neutralisation sont répétées avec le tampon Glycine 2,2. Les éluats des deux tampons contiennent les protéines purifiées. Ils sont concentrés et dialysés contre un tampon qui dépend de leurs utilisations ultérieures*.

1.5.5.- Préparation des ligands

1.5.5.1.- Sérum de lapin anti-protéines humaines

La contamination la plus importante de Ag M1 et Ag S1 devait être due aux protéines du sang d'où sont extraites les microfilaires donc des protéines humaines. Pour éliminer ces impuretés, nous avons effectué une chromatographie d'affinité, en utilisant comme ligand un sérum de lapin anti-protéines humaines totales (SL α HWS)**. Ce sérum est préparé par fractionnement salé, dialysé contre un tampon phosphate pH 7,4 et lyophilisation.

Après reconstitution du lyophilisat par l'eau distillée, nous avons passé le SL α HWS sur colonne de Séphadex G 25 pour le ramener en tampon de couplage. Le SL α HWS est ensuite couplé au Sépharose 4B suivant le protocole décrit plus haut.

Ag M1 et Ag S1 subissent une première purification sur l'immuno-adsorbant ainsi formé. Les éluats du tampon Borate et du soluté physiologique renferment les antigènes partiellement purifiés Ag M2 et Ag S2. Ils sont concentrés et dialysés.

* Nous avons utilisé un concentrateur-dialyseur à pression négative : MICRO-PRODICON. Fabricant : BIO-MOLECULAR DYNAMICS, réf. 809-791214. Membrane de perméabilité 10 000 MW.

** Produit SIGMA N° H 3383.

1.5.5.2.- Sérum de lapins hyperimmuns

Ag M2 et Ag S2 sont utilisés comme immunogènes pour la production d'anticorps spécifiques chez le lapin. Nous décrivons le protocole avec Ag M2 ; un protocole identique a été mené avec Ag S2.

1.5.5.2.1.- Immunisation

Nous avons utilisé des lapins Néozélandais d'environ 1 an, pesant 2 à 4 kg*. Comme protocole d'immunisation, nous avons choisi une méthode d'injections intradermiques en multiples points (166) : 200 µg d'Ag M2, contenus dans 2 ml de soluté physiologique, sont émulsionnés à 2 ml d'adjuvant complet de Freund** et 5 mg de *Mycobacterium butyricum****. L'émulsion est injectée par voie intradermique, à l'aide d'aiguilles 30 G 1/2, en 20 à 30 points d'inoculation sur le dos rasé de l'animal. Après 10 jours, une injection de rappel est effectuée par voie sous cutanée (aiguilles 22 G 1 1/2), dans la région sous claviculaire. Le produit d'injection est une émulsion de 100 µg d'Ag M2 dans 2 ml d'adjuvant complet de Freund avec 5 mg de *Mycobacterium butyricum*. Un mois après la première vaccination, les lapins sont rappelés, toujours par voie sous cutanée, par 100 µg d'Ag M2 émulsionné avec 2 ml d'adjuvant incomplet de Freund**** et 5 mg de *mycobacterium*. 2 à 3 ml de sang sont prélevés par ponction veineuse à l'oreille. Après décantation, le serum est analysé pour contrôler l'immunisation (cf. p. 54 "Contrôle de l'Immunisation"). Des injections de rappels sont effectuées, suivant le même protocole, toutes les trois semaines, jusqu'à obtention d'une

* Fournisseur : IFFA-CREDO, B.P. 109, L'Abresle, France.

** Produit DIFCO N° 0638-60.

*** Produit DIFCO N° 0640-33.

**** Produit DIFCO N° 0639-60.

réponse immunologique satisfaisante, soit 120 jours environ après la première stimulation.

1.5.5.2.2.- Contrôle de l'immunisation

La réponse immunologique des lapins aux vaccinations est testée par une méthode de précipitation en gel. Historiquement, la première technique d'immunoprécipitation en gel a été décrite par OUDIN en 1946 (15). Depuis les techniques se sont simplifiées, surtout avec les méthodes en plaques dérivées de celle décrite par OUCHTERLONY (135). Nous avons testé les sérums de lapins par double immunodiffusion (Fig. 5).

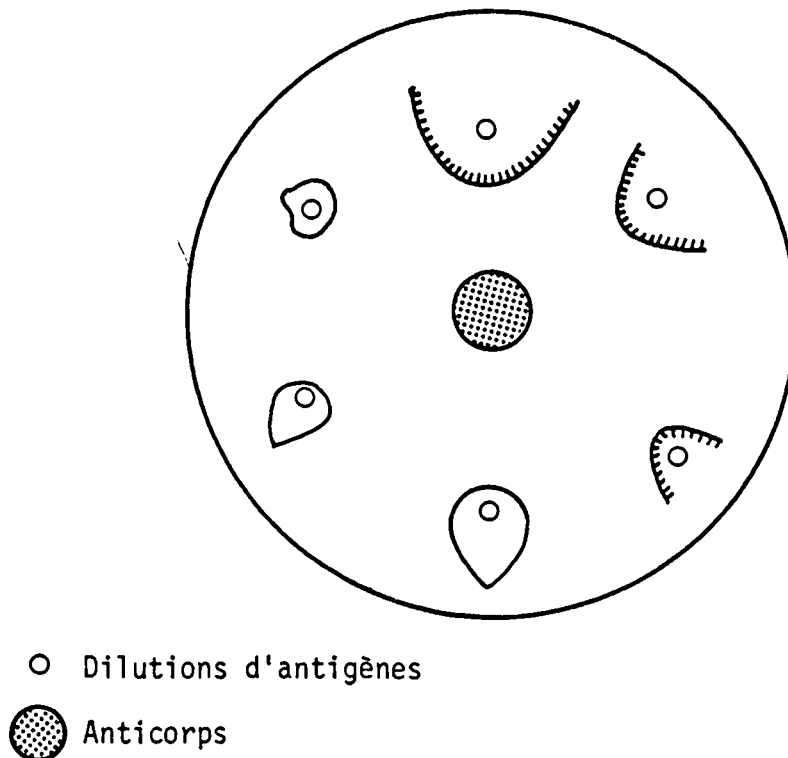


FIGURE 5 - DOUBLE IMMUNODIFFUSION
d'après OUCHTERLONY (136)

Des solutions d'antigènes et d'anticorps, placées dans des puits pratiqués dans une gélose, diffusent librement dans le gel. Au point d'équivalence, les réactions antigènes-anticorps se matérialisent par un front de précipitation.

Des lames (76 x 26) parfaitement dégraissées à l'alcool éther, et séchées, sont recouvertes à l'aide d'un pinceau par un film adhésif de composition :

- glycérine..... II gouttes
- Agar*..... 0,1 g
- Azide de Sodium..... 0,1 g
- Eau distillée QSP... 100 ml.

Les lames sont mises à sécher au four à 80°C. Elles sont recouvertes par 3 ml de solution gélosée liquéfiée au bain-marie à 60°C. La composition de la gélose est la suivante :

- Agar*..... 1 g
- Chlorure de Sodium.. 1 g
- Azide de Sodium..... 0,1 g
- Eau distillée QSP... 100 ml.

Après solidification de la gélose à la température ambiante, les lames sont conservées en chambre humide. Des puits de 3 mm de diamètre sont percés à l'emporte-pièce. 10 µl de produits à analyser sont déposés par puits, et les lames sont mises en chambre humide à la température ambiante. La diffusion s'effectue pendant 48 à 72 heures. Durant cette période, les lames sont surveillées régulièrement car

* Agar noble, produit DIFCO N° 0142-02.

certaines arcs de précipitation peuvent se re-dissoudre. Les lames sont soumises à 2 lavages de 12 h chacun, en chlorure de Sodium (1 % dans l'eau distillée) afin d'éliminer les protéines non précipitées. Un dernier lavage de 3 h dans l'eau distillée est effectué.

Les gels sont recouverts d'une feuille de papier filtre humide et mis à sécher à la température ambiante. Un séchage trop rapide abîme le gel et rend la lecture impossible. La coloration des arcs de précipitation est faite pendant 5 mn dans le mélange suivant :

- Amidoschwartz*..... 1 g
- Alcool méthylique..... 450 ml
- Acide acétique..... 100 ml
- Eau distillée..... 450 ml.

Les lames sont rincées pour éliminer l'excès de colorant dans trois bains de 10 mn chacun avec le mélange alcool méthylique, acide acétique, eau distillée comme solution de rinçage.

1.5.5.2.3.- Isolement des IgG de lapin

Lorsque la réponse immunitaire est satisfaisante, les lapins sont anesthésiés à la kétamine** à la dose de 25 mg de kétamine base par kilo de poids. L'injection du produit se fait par voie intramusculaire. La kétamine a été choisie pour son pouvoir anesthésique important et ses réactions sur le système cardio-vasculaire : accroissement de la pression artérielle, accélération du rythme cardiaque.

* *Produit MERCK N° 1167.*

** *Lab. IFFA-MERIEUX : Imalgène 1000.*

Le prélèvement de sang est réalisé par ponction cardiaque. Chaque animal permet de recueillir 150 à 200 ml de sang total. Le sérum est décanté à la température ambiante. Il est exudé du caillot par centrifugation à 800 g en fond de tube. Le surnageant constitue le sérum de lapin hyperimmun (SLM).

Les anticorps produits lors d'une immunisation induite par voie parentérale sont, dans un premier temps, de type IgM, puis de type IgG. La concentration en anticorps de type IgG est croissante avec les injections de rappel, alors que la concentration en anticorps de type IgM décroît rapidement (14). Dans SLM, les immunoglobulines de type IgG renferment à elles seules la majorité des anticorps dirigés contre Ag M2.

Après avoir séparé l'ensemble des immunoglobulines par précipitation au sulfate d'Ammonium, nous avons isolé les gammaglobulines de type IgG par chromatographie sur gel échangeur d'ions.

- Précipitation au sulfate d'ammonium

Les gammaglobulines précipitent avec une solution de sulfate d'ammonium à 30 % de saturation (88).

Un volume d'une solution aqueuse de sulfate d'ammonium saturé, ajustée à pH 7,8 par de la soude 2 N (les solutions doivent être préparées extemporanément) est ajouté, goutte à goutte, à 2 volumes de sérum à fractionner de manière à obtenir une concentration finale de sulfate d'ammonium égale à 30 % de saturation. Le mélange est fait

pendant 2 à 3 h, sous agitation magnétique. Puis, la suspension est centrifugée pendant 30 mn à 1 400 g. Le premier précipité ainsi formé contient toutes les gammaglobulines, d'autres globulines et des traces d'albumine. Le précipité est re-dissout par une solution aqueuse de chlorure de sodium à 9 g/l ; le volume final de la solution doit égaler le volume de sérum traité.

L'isolement des gammaglobulines est complet après 3 précipitations successives par le sulfate d'ammonium. Durant les manipulations, il faut veiller à ce que les réactifs soient bien à la température ambiante, la saturation du sulfate d'ammonium étant très influencée par la température.

Le dernier culot est repris par du tampon phosphate pH 8 (cf. Infra "Chromatographie sur DEAE - cellulose"). Il est dialysé pendant 48 h à + 4°C contre du tampon phosphate pH 8. Cette dialyse a pour effet d'éliminer le sulfate d'ammonium. Le tampon de contre-dialyse est changé toutes les 12 h de manière à éviter une acidification du milieu qui entraînerait une dénaturation des protéines.

La solution finale est légèrement opalescente. Elle est centrifugée pendant 30 mn à + 4°C sous une accélération de 1 400 g. Eventuellement, les gammaglobulines sont concentrées par dialyse sous pression négative.

- Chromatographie sur DEAE-cellulose

Il existe plusieurs méthodes pour obtenir des préparations relativement pures d'immunoglobulines. La plus utilisée pour l'isolement

des IgG est la chromatographie sur DEAE-cellulose, après fractionnement des gammaglobulines par le sulfate d'ammonium (110).

La séparation des protéines par chromatographie sur gel échangeur d'ions est due à la formation entre le gel et les acides aminés des protéines de liaisons ioniques faibles. Les liaisons peuvent être rompues par changement de tampon. Nous avons utilisé une DEAE-cellulose pré-traitée*.

Réactif et matériel

- Tampon phosphate 0,01 M

Solution A

- | | |
|---|--------|
| - Di-sodium hydrogénophosphate $12 \text{ H}_2\text{O}$ | 3,58 g |
| - Eau distillée.....QSP | 1 l |

Solution B

- | | |
|--|---------|
| - Sodium dihydrogénophosphate H_2O | 0,138 g |
| - Eau distillée.....QSP | 100 ml |

A 1 l de solution A, nous ajoutons, sous contrôle d'un pH mètre, la quantité nécessaire de solution B pour obtenir un pH de 8,0.

- Tampon phosphate 0,02 M

Solution A

- | | |
|---|--------|
| - Di-sodium hydrogénophosphate $12 \text{ H}_2\text{O}$ | 7,16 g |
| - Eau distillée.....QSP | 100 ml |

* WHATMAN DE 52.

Solution B

- Sodium dihydrogénophosphate H_2O 0,276 g
- Eau distillée.....QSP 100 ml

A 1 l de solution A, nous ajoutons, sous contrôle d'un pH mètre, la quantité nécessaire de solution B pour obtenir un pH de 8,0.

- Colonne à chromatographie
 - Colone Pharmacia K 26
 - . Hauteur 40 cm,
 - . Diamètre 2,6 cm.
- Pompe péristaltique (LKB 2115 multiperpex).
- Collecteur de fractions (LKB 2212 Redirac).

60 g de DEAE-cellulose sont dispersés dans environ 300 ml de tampon phosphate 0,01 M, sous agitation magnétique. Plusieurs lavages sont effectués dans le même volume de tampon jusqu'à obtenir un pH et une résistivité constants et identiques à ceux du tampon initial. Le gel est mis à dégazer sous vide. Il est coulé dans la colonne, en évitant la formation de bulles, et l'élution est commencée immédiatement avec le tampon phosphate 0,01 M. La pompe est réglée de manière à obtenir un débit de 240 ml/h. L'élution est poursuivie durant 24 h, de manière à ce que la colonne soit bien équilibrée.

Un volume de 5 ml, à une concentration correspondant à 50 mg de protéines par gramme de cellulose, peut être séparé en un seul passage. La colonne est chargée à l'aide de l'adaptateur, la pompe étant réglée

de manière à obtenir un débit égal au tiers de celui utilisé pour le coulage du gel (80 ml/h). La première élution est effectuée avec le tampon phosphate 0,01 M. Les fractions sont recueillies par volume de 4 ml. Les densités optiques sont mesurées à 280 nm. Le premier pic d'exclusion contient les IgG (en général, ce pic représente les 20 premières fractions éluées). On fait passer sur la colonne du tampon phosphate 0,02 M afin d'éluer les protéines restantes (en général, un volume de 500 ml suffit à éluer les autres gammaglobulines).

Dans notre système, le premier pic d'exclusion contient les anticorps spécifiques de Ag M2 (SL M1), SL M1 est concentré et dialysé contre le tampon borate (cf. p. 51 "chromatographie".)

La colonne de DEAE-cellulose est régénérée par le tampon phosphate 0,01 M jusqu'à obtenir un pH et une résistivité constante et égale à ceux du tampon initial. Pour une conservation de longue durée, la colonne est rincée par 2 fois son volume de tampon phosphate 0,01 M contenant 0,03 % de Toluène. Avant une nouvelle utilisation, la colonne est rincée par 5 fois son volume de tampon phosphate seul.

1.5.5.2.4.- Chromatographie d'affinité contre du sérum humain

SL M1, en plus des anticorps spécifiques de Loa loa, contient des anticorps anti-protéines humaines, induits par les protéines humaines encore présentes dans Ag M2 à l'issue de la chromatographie contre SL α HWS. Pour éliminer ces anti-protéines, nous avons effectué une chromatographie d'affinité de SL M1, en utilisant du sérum humain

normal (SHN)* comme ligand couplé au sépharose 4B.

1.5.5.3.- Deuxième chromatographie de l'antigène

L'éluat du tampon borate contient maintenant les anticorps anti-microfilaires (SL M2). SL M2 est concentré et dialysé contre le tampon de couplage. Il est ensuite utilisé comme ligand pour une chromatographie d'affinité de Ag M2.

Lors de cette chromatographie, les éluats des tampons glycine 2,2 et glycine 2,8 contiennent les antigènes purifiés (Ag M3).

1.5.6.- Contrôle des produits

Les produits que nous avons obtenus ont été analysés sur deux plans :

- 1) d'un point de vue quantitatif, par estimation de la concentration des protéines, avant et après chaque manipulation ;
- 2) d'un point de vue qualitatif, par immunodiffusion : pour juger de la purification de l'antigène, nous avons opposé Ag M2 et Ag M3 à des dilutions de SL α HWS. Pour juger de l'efficacité de l'immunisation, nous avons opposé Ag M2 à des dilutions de SLM.

1.5.7.- Résumé

Les différentes étapes de la purification des antigènes sont représentées par la figure 6.

* BIOMERIEUX : Lyotrol "N" produit N° 62371.

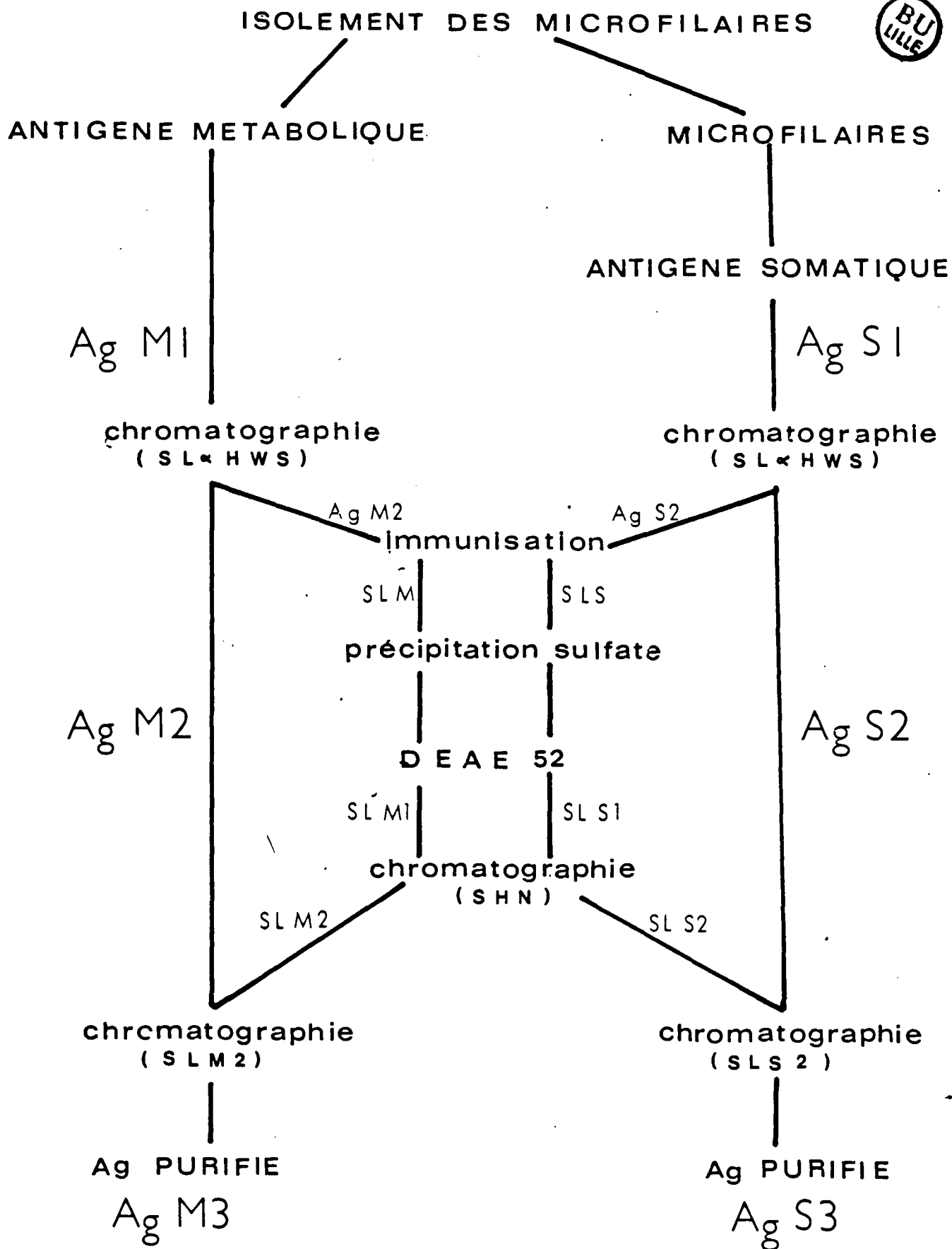


fig.6: Préparation des antigènes

1.6.- Méthodes d'analyses statistiques

L'ensemble des résultats est analysé statistiquement en se référant aux ouvrages de SCHWARTZ (157) et de LAZAR et SCHWARTZ (108). Nous rappelons les principales formules utilisées :

- Comparaison des répartitions - test de KHI²

$$\chi^2 = \frac{\sum (O - C)^2}{C^2}$$

où : O = Effectif observé

C = Effectif calculé

(Applicable si tous les effectifs calculés sont supérieurs à 5)

- Moyenne

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

- Variance

$$s^2 = \frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2/n}{(n - 1)}$$

- Ecart type

$$s = \sqrt{s^2}$$

où : x_i = valeur de chacune des données

n = nombre des valeurs

- Comparaison des moyennes

. Les effectifs sont supérieurs à 30 : test Epsilon

$$\epsilon = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{\frac{s_A^2}{n_A} + \frac{s_B^2}{n_B}}$$

. un des effectifs est inférieur à 30 : test de Student

$$t = \frac{\bar{x}_A - \bar{x}_B}{\sqrt{\frac{s^2}{n_A} + \frac{s^2}{n_B}}} \quad \text{avec } s^2 = \frac{[s_A^2 (n_A - 1) + s_B^2 (n_B - 1)]}{n_A + n_B - 2}$$

où : \bar{x}_A = moyenne des x de la population A
 s_A^2 = variance de la population A
 n_A = effectif de la population A
 \bar{x}_B = moyenne des x de la population B
 s_B^2 = variance de la population B
 n_B = effectif de la population B

- Comparaison des moyennes de deux séries appariées

$$\epsilon = \frac{m}{s / n}$$

où : m et s désignent la moyenne et l'écart type estimés sur les n différences.

(Applicable si les effectifs sont supérieurs à 30)

- Plans à plusieurs facteurs : Analyse de variance

ORIGINE (1)	SOMME DES CARRÉS DES ECARTS (2)	DEGRE DE LIBERTE (3)	VARIANCE = (2) / (3)
Entre colonne (A)	$T_i^2/n_i - TG^2/N$	$C - 1$	
Entre ligne (B)	$T_j^2/n_j - TG^2/N$	$L - 1$	
Résiduelle	$(T) - (A) - (B)$	$N - C - L$	
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>			
TOTAL (T)	$\sum x^2 - TG^2/N$	$N - 1$	

T_i = somme des mesures dans la ligne i

T_j = somme des mesures dans la ligne j

n_i = nombre de mesures dans la ligne i

n_j = nombre de mesures dans la ligne j

C = nombre de colonnes

L = nombre de lignes

N = nombre total de mesures ($N = \sum n_i = \sum n_j$)

TG : total général des mesures

($TG = \sum T_i = \sum T_j$)

- Régression corrélation

$$y = ax + b$$

avec

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}$$

$$a = \frac{\sum y_i}{n} - b \frac{\sum x_i}{n}$$

Le coefficient de corrélation est :

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{(\sum x_i)(\sum y_i)}{n}}{\sqrt{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}}}$$

et le test de student correspondant :

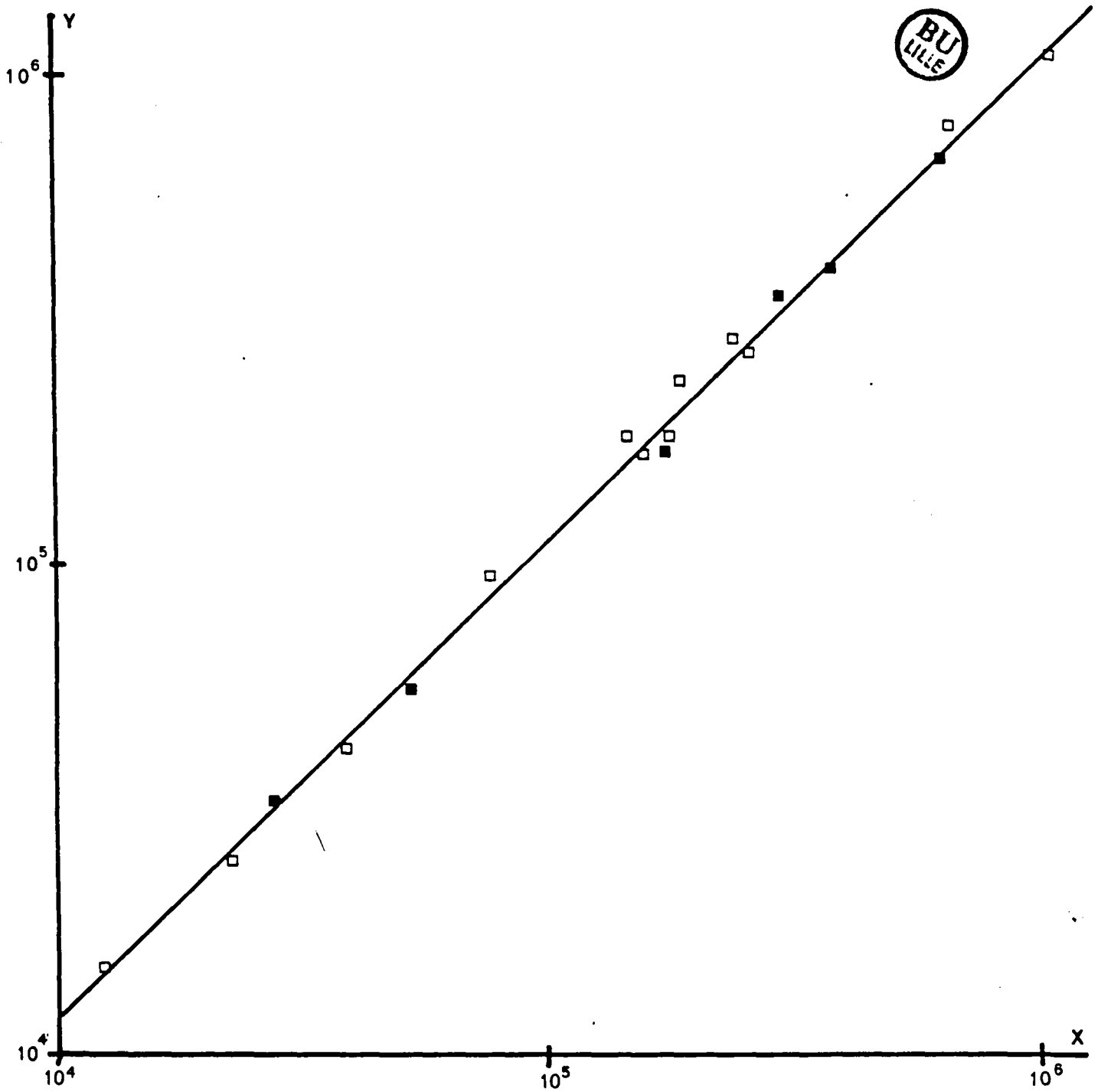
$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

Tous les calculs ont été effectués à l'aide d'un microordinateur SHARP PC 1500.

2.- RESULTATS

2.1.- Isolement des microfilaires

Nous présentons à la figure 7 les résultats des divers isolements auxquels nous avons procédé. Ainsi, à partir de $3,7045 \cdot 10^6$ microfilaires Loa loa prélevées, nous avons, en 12 manipulations, isolé $3,332 \cdot 10^6$ microfilaires, soit un rendement moyen de 89,94 %. De même,



X = Nombre de microfilaries isolées
Y = Nombre de microfilaries prélevées
□ Loa-loa
■ Dipetalonema perstans

fig.7: Isolement de microfilaries

avec Dipetalonema perstans, à partir de $1,685.10^6$ microfilaires, nous avons isolé $1,529.10^6$ microfilaires, soit un rendement moyen de 90,71 %. Les écarts type du rendement sont respectivement 7,56 % pour Loa loa et 3,06 % pour Dipetalonema perstans.

2.2. Dosage des protéines

Pour vérifier l'absence de points aberrants, nous avons visualisé sur papier millimétré les courbes de dosage. Les densités optiques sont portées en abscisses (X) et les concentrations correspondantes de la courbe étalon sont portées en ordonnées (Y). La pente et l'ordonnée à l'origine sont déterminées par calcul. Le coefficient de corrélation de Y en X est également calculé. Toute courbe présentant un coefficient inférieur à 0,90 est éliminée et le dosage correspondant est recommencé. Nous montrons à la figure 8 un exemple de courbe obtenue.

2.3.- Antigènes bruts

Dans le tableau V, nous présentons les quantités totales de protéines récupérées dans le réactif ayant servi à la migration des microfilaires (Ag M1). Dans le chapitre de la discussion, nous indiquerons les hypothèses concernant la composition de ces protéines. Dans ce même tableau, nous avons noté la quantité totale de protéines extraites du traitement des microfilaires (Ag S1). Au total, avec 4 350 000 microfilaires de Loa loa, nous avons récupéré 217 mg de

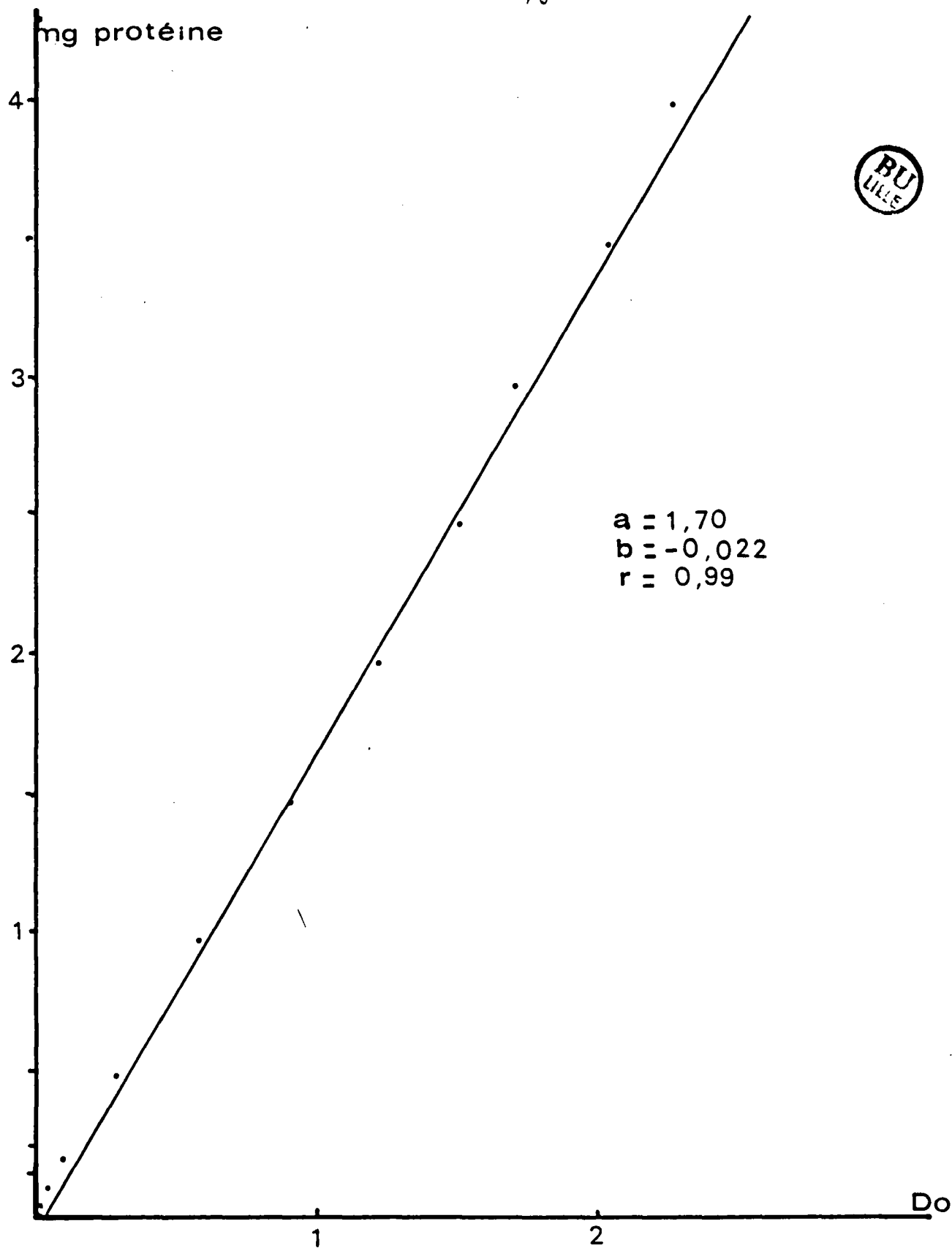


fig.8 : Dosage des protéines

protéines Ag M1 alors que le même nombre de microfilaires nous a permis de récolter seulement 43,3 mg de protéines Ag S1.

Nombre de microfilaires Loa loa	Ag M1 (mg)	Ag S1 (mg)
150 000	20,3	
300 000	28,5	1,7
650 000	35,2	7,6
1 150 000	64,5	14,4
2 250 000	88,2	19,6

TABLEAU V : QUANTITE D'ANTIGENES BRUTS PRODUITS
(mg équivalent BSA)

2.4.- Purification des antigènes

2.4.1.- Couplage au sépharose

Nous avons effectué nos chromatographies à partir de 10 g de gel sec. D'après les fabricants, la quantité de protéines capables de se fixer à ce poids est de 300 mg. Pour vérifier la fixation des protéines au gel, nous avons dosé les protéines présentes dans les liquides de lavage. Par différence, nous obtenons les protéines fixées au Sépharose.

Ces résultats sont présentés au Tableau VI.

PROTEINES MISES EN REACTION	QUANTITES MISES EN REACTION (mg)	QUANTITES COUPLEES (mg)
SL α HWS	300	260
SHN	300	255
SL M2	300	275
SL M3	300	280

TABLEAU VI : COUPLAGE DES PROTEINES
AU BROMURE DE CYANOGENE
(mg équivalent BSA)

2.4.2.- Isolement des IgG de lapin

Après immunisation, les sérums de lapin titrent respectivement en protéines totales :

- 98 g par l pour le lapin immunisé avec l'Ag M2,
- 87 g par l pour le lapin immunisé avec l'Ag S2.

16 ml de chaque sérum ont été traités. Après précipitation au sulfate d'ammonium et chromatographie sur DEAE cellulose, nous avons récolté respectivement :

- 640 mg de SL M1 pour le lapin immunisé avec l' Ag M2,
- 510 mg de SL S1 pour le lapin immunisé avec l' Ag S2.

2.4.3.- Eluats des chromatographies d'affinité

Nous avons collationné tous les résultats. Chacune des chromatographies est faite sur un volume correspondant au maximum à 20 mg de protéines. Nous présentons au Tableau VII les résultats obtenus.

PROTEINES A PURIFIER	LIGANDS	QUANTITE EN REACTION (mg)	QUANTITE PURIFIEE (mg)
Ag M1	SL α HWS	150	46,3
Ag M2	SL M2	30	23,8
Ag S1	SL α HWS	38	11,5
Ag S2	SL S2	10	7,8

TABLEAU VII : ELUATS DE CHROMATOGRAPHIES D'AFFINITE
(mg équivalent BSA)

2.4.4.- Immunodiffusion

Les photos présentées (Fig. 8 à Fig. 17) montrent les résultats des immunodiffusions. Elles ont toutes été réalisées de manière à avoir 1 mg de protéines dans le puits central.

Les figures 8, 9 et 10 montrent l'antigène métabolique aux divers stades de sa purification. Dans les puits périphériques, ont été déposés des dilutions de raison 2 de SL α HWS. A la figure 8, on note des arcs de précipitation d'Ag M1 visible jusqu'à la dilution 1/4. Après une première chromatographie (Fig. 9), seul le SL α HWS pur

montre un arc de précipitation quant il est opposé à Ag M2. Enfin, après la chromatographie avec SL M3, Ag M3 ne montre plus d'arcs de précipitation visible contre SL α HWS.

Avec l'antigène somatique (Fig. 11, 12 et 13), l'immunodiffusion d'Ag S1 montre des arcs visibles au 1/16 ; Ag S2 montre des arcs au 1/2 et Ag S3 ne montre plus d'arcs décelables.

La réponse immunitaire des lapins aux antigènes (respectivement Ag M2 et Ag S2) est également testée par immunodiffusion (Fig. 14 à 17). L'antigène est déposé dans le puits central et il est opposé à des dilutions de raison 2 de sérums des lapins immunisés (respectivement SLM et SLS). Nous avons effectué ces immunodiffusions à partir du 2ème rappel (J 45) et ensuite après chaque nouveau rappel. Nous ne présentons que les résultats à J 45 et après le 4ème rappel (J 120) où la réponse immunitaire est suffisante pour envisager le sacrifice des animaux. Nous pouvons noter que la réponse à Ag S2 semble moins forte que celle obtenue avec Ag M2.

BU
LLE



FIGURE 8 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag M1

Puits périphérique : Dilution de SL α HWS

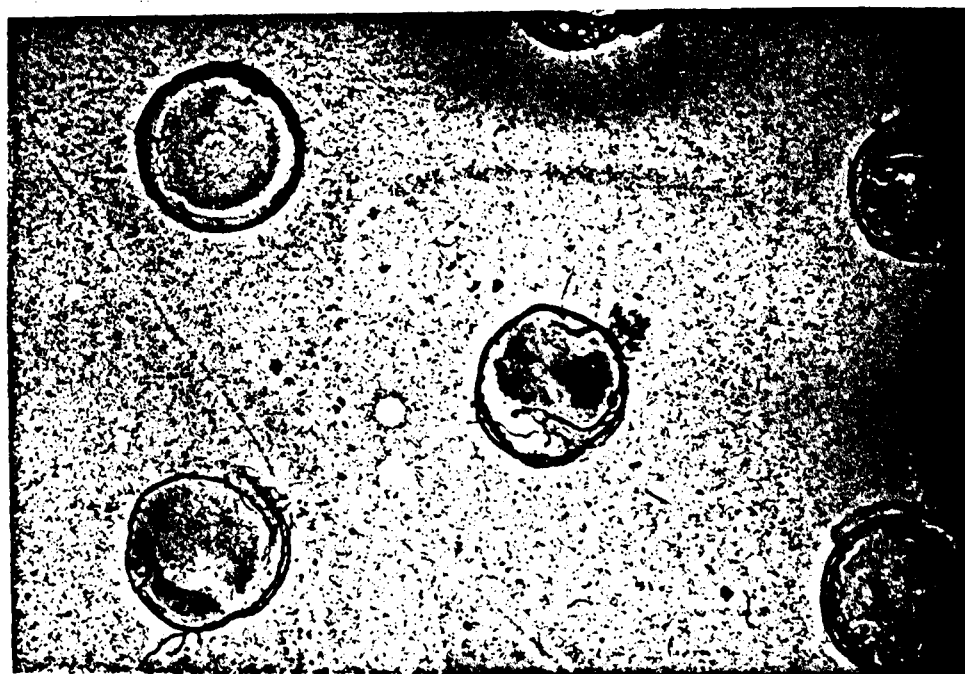


FIGURE 9 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag M2

Puits périphérique : dilution de SL α HWS

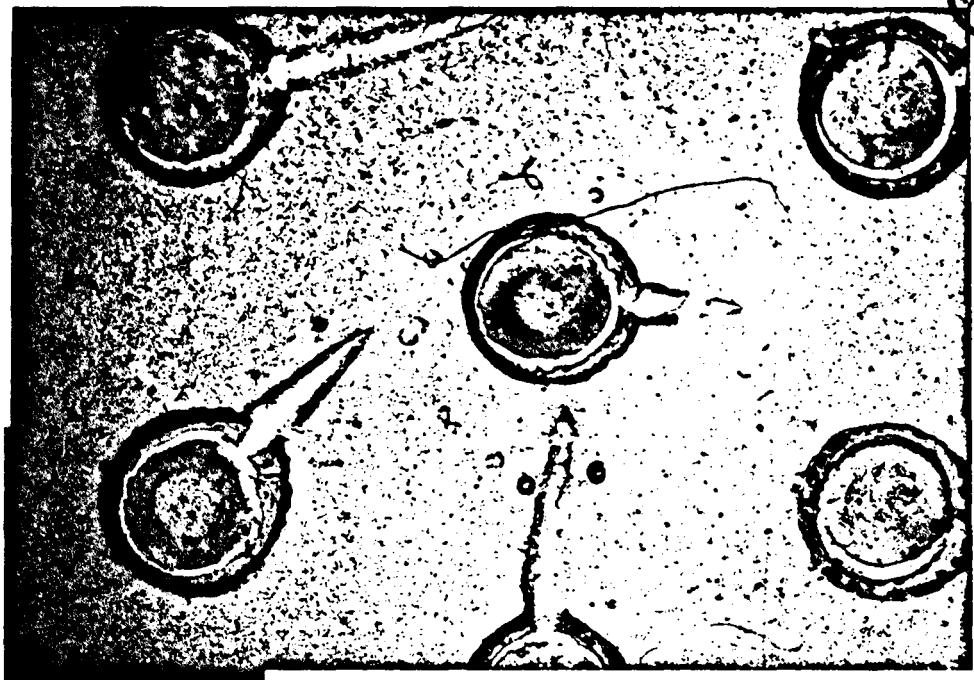


FIGURE 10 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag M3

Puits périphérique : Dilution de SL α HWS



FIGURE 11 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag S1

Puits périphérique : Dilution de SL α HWS

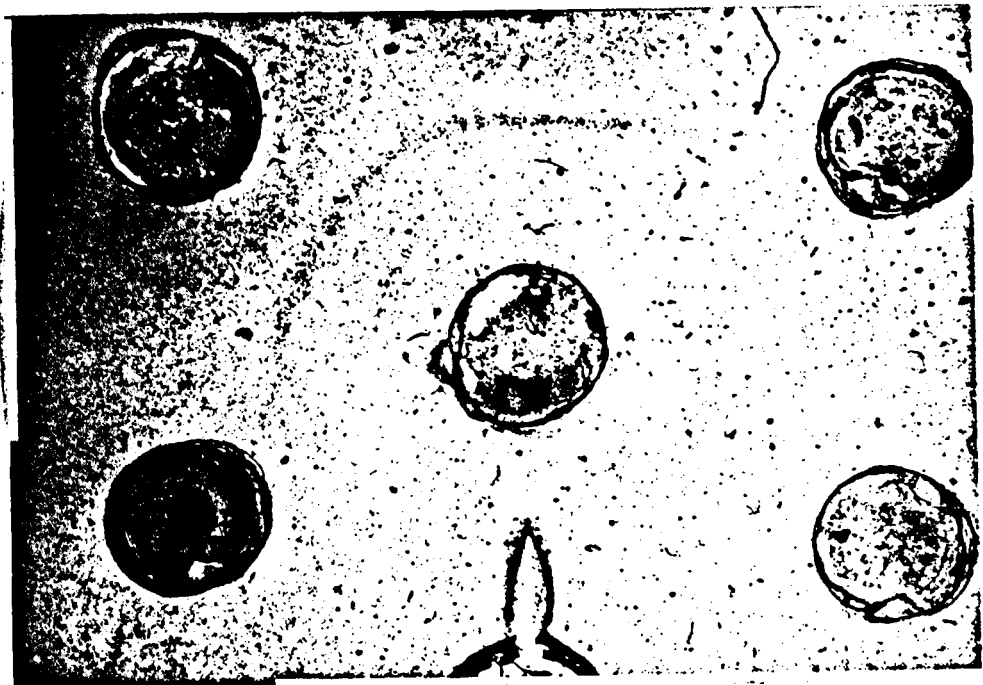


FIGURE 12 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag S2

Puits périphérique : Dilution de SL α HWS

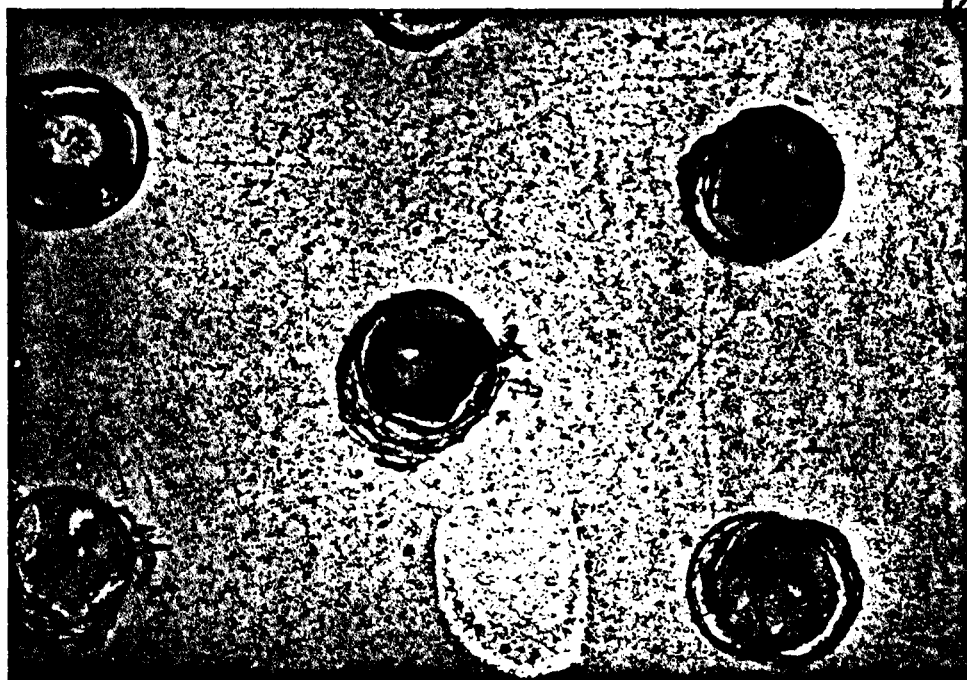


FIGURE 13 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag S3

Puits périphérique : Dilution de SL α HWS

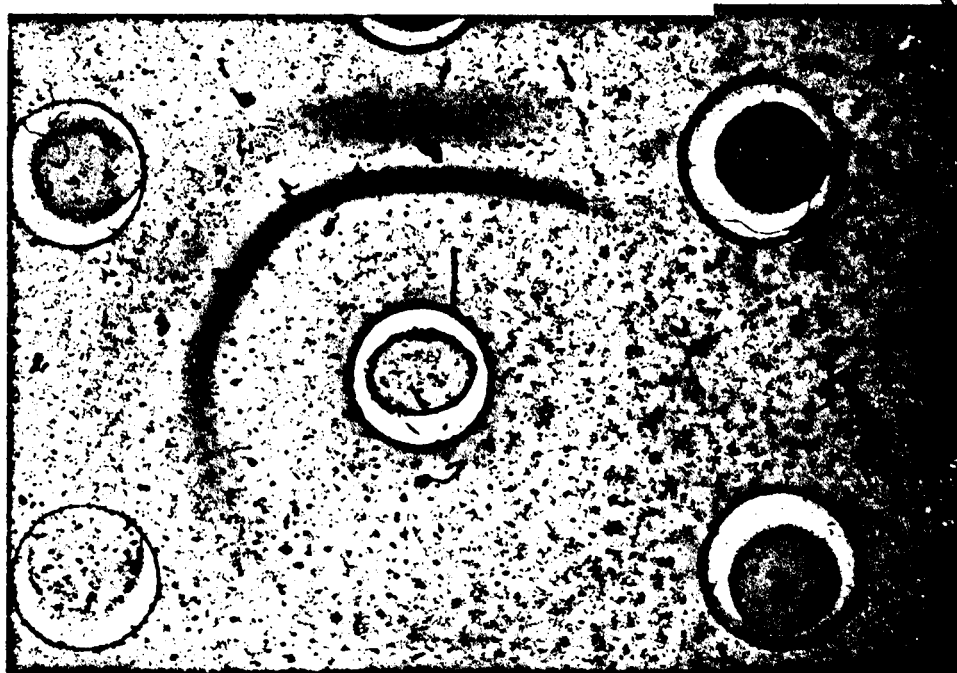


FIGURE 14 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag M2

Puits périphérique : SLM à J 45



FIGURE 15 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag M2

Puits périphérique : SLM à J 120

BU
LILLE

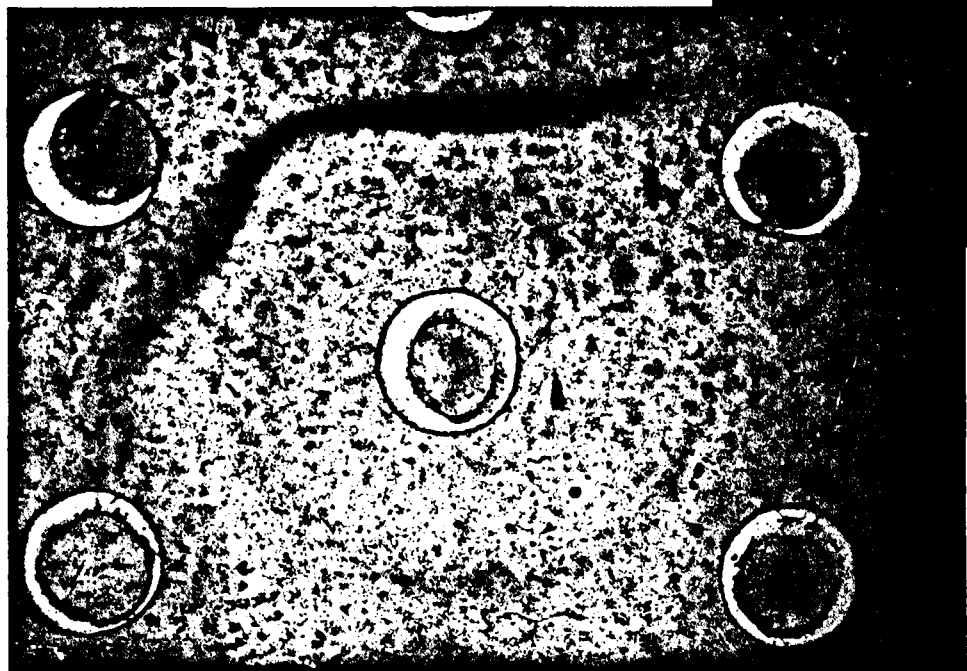


FIGURE 16 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag S2

Puits périphérique : SLS à J 45

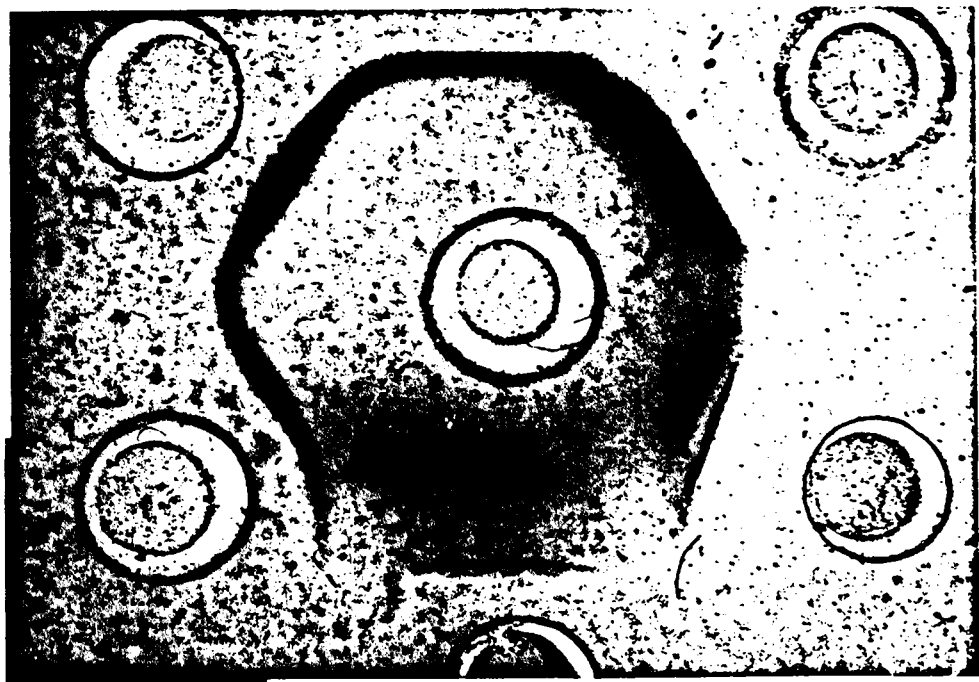


FIGURE 17 : IMMUNODIFFUSION

Puits central : Ag S2

Puits périphériques : SLS à J 120

3.- DISCUSSION

Parmi les techniques utilisées pour isoler les microfilaires, les méthodes utilisant la filtration sur membrane ont un rendement faible. En effet, les microfilaires insérées dans les pores des membranes ne se détachent que très partiellement. Les méthodes utilisant un agent de lyse se prêtent mal à la purification. En effet, le coefficient de gravitation des microfilaires est très proche de celui des éléments figurés du sang, et, après lyse des globules rouges, il est quasi impossible de séparer par centrifugation les microfilaires des leucocytes. Ces méthodes sont parfaitement adaptées au diagnostic des microfilarémies, mais conviennent mal à la production d'antigènes microfilariens. Les méthodes utilisant un gradient de densité, utilisées avec Wuchereria bancrofti, ont permis de récupérer jusqu'à 80 % des microfilaires (99), mais, là encore, il apparaît très difficile de séparer les microfilaires des leucocytes. Cette difficulté est confirmée par les essais de KALIRAJ (101) qui utilise une sédimentation sur DEXTRAN, suivie d'une hémolyse. Il retrouve dans leurs antigènes des produits issus du stroma des leucocytes.

Par rapport à la technique mise au point par GARIN (75), l'adjonction de EDTA dans tous les milieux évite la formation d'un réseau de fibrine qui gêne la migration et le recueil des microfilaires. De plus, dans notre système, les microfilaires migrent en totalité dans la boîte de culture cellulaire, ce qui facilite énormément leur récolte. Nous ne connaissons pas la raison de ce phénomène migratoire. Toutefois,

nous pouvons noter qu'il s'observe également avec d'autres milieux que le RPMI (sérum physiologique, tampon phosphate...), et qu'il ne se produit que si les microfilaires sont vivantes. Le RPMI a été choisi car c'est le seul qui permette une survie aussi longue des microfilaires.

Mais, le principal intérêt de cette méthode reste la production, en quantité importante, d'antigène métabolique, et l'on sait l'intérêt des produits de sécrétion et d'excrétion en immunologie parasitaire (133, 177, 51).

Pour le dosage des protéines, deux remarques s'imposent au choix de la technique utilisée, surtout par rapport à la méthode utilisant le réactif de FOLIN (116) qui reste une des méthodes de référence en immunologie.

1) Les protéines isolées doivent servir soit à une immunisation, soit à une technique E.L.I.S.A. Pour une immunisation, la dose de protéines injectées n'est pas, dans le cas présent, nécessairement exacte ; seule une réponse qualitative à l'immunogène nous intéresse. La technique E.L.I.S.A. nécessite une étude préalable pour déterminer les meilleures concentrations relatives d'antigènes et d'anticorps. Là encore, les quantités absolues de protéines entrant en réaction ne doivent pas être nécessairement connues avec précision.

2) La méthode d'estimation directe du taux de protéines en ultraviolet possède, par rapport à toutes les autres, l'énorme avantage de ne pas détruire l'échantillon.

Le but de notre étude n'est pas d'aboutir, dans un premier temps, à une parfaite connaissance biochimique et immunologique des antigènes isolés, mais seulement d'étudier leur capacité à s'appliquer à la technique E.L.I.S.A. Aussi, le contrôle des produits finis simplement par estimation des protéines et immunodiffusion radiale permet une analyse quantitative et qualitative suffisante.

Pour purifier des antigènes parasitaires, les techniques de chromatographie d'affinité sont indiscutablement les plus adaptées. Par ces méthodes, les protéines ne subissent que très peu, voire pas du tout, de modifications. De plus, par le choix du ligand, l'immunologiste connaît exactement la nature des protéines isolées ou exclues.

Au début de notre étude, nous avons utilisé une méthode de chromatographie en colonne, en suivant les éluions à l'aide d'un enregistreur continu. Cette méthode aboutit à un fractionnement plus précis des protéines à isoler (63). La situation du C.I.R.M.F. en zone équatoriale sujette à de fréquents orages, donc à de nombreuses coupures de courant, nous faisait perdre tout l'intérêt d'une telle méthode. De plus, les techniques utilisant les colonnes sont plus délicates et plus longues que les méthodes par filtration.

L'analyse des résultats obtenus montre, d'un point de vue quantitatif, que les antigènes métaboliques sont proportionnellement plus importants que les antigènes somatiques. En calculant la moyenne des résultats du Tableau V, on voit qu'à partir de 100 000 microfilaires Loa-loa, nous pouvons isoler environ 5 mg d'Ag M1 contre environ 1 mg seulement d'Ag S1. Les différents stades de purification aboutissent aux mêmes rendements avec les deux types d'antigènes (environ 30 % à l'issue de la première chromatographie et 78 % à l'issue de la deuxième). La survie de 18 à 24 heures des microfilaires permet d'isoler 5 fois plus de matériel antigénique que de protéines solubles isolées à partir de la même quantité de microfilaires.

Nous émettons plusieurs hypothèses concernant la composition d'Ag M1. Tout d'abord, une partie des protéines présentes est composée de protéines humaines que nous avons introduites dans le milieu, et qui ont diffusé dans le réactif de migration. Une étude que nous avons effectuée à l'aide de sang de sujets non infestés nous a permis de montrer qu'environ 40 % des protéines humaines introduites sont retrouvées dans le milieu de migration. Une deuxième fraction des protéines doit être représentée par les protéines de l'hôte, tapissant la surface des microfilaires, qui sont relarguées dans le milieu durant la survie. Il est également pensable que, durant leur survie, les microfilaires utilisent des acides aminés contenus dans le RPMI et que nous notons une modification du milieu de base. Enfin, une partie de ces protéines est représentée par les produits de sécrétion et d'excrétion des microfilaires.

4.- CONCLUSION

Les travaux préliminaires mettent en évidence que les produits de sécrétion et d'excrétion, obtenus par survie de 18 à 24 h des microfilaires de Loa loa, sont parfaitement adaptés, après purification, à la production d'anticorps spécifiques chez le lapin. Ceci peut s'appliquer également aux antigènes somatiques issus des parasites eux-mêmes, bien que la quantité de produits antigéniques venant des microfilaires soit inférieure à la quantité de produits récupérés dans le milieu de survie.

Cette étude confirme la valeur des techniques de chromatographie d'affinité tant sur le plan de la qualité des résultats que sur la facilité de leur mise en oeuvre.

CHAPITRE DEUXIEME

UTILISATION DES ANTIGENES SOMATIQUES ET METABOLIQUES

A L'APPLICATION DE LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

DANS LE DOSAGE DES ANTICORPS DE LOA LOA

1.- MATERIEL ET METHODE

1.1.- Matériel et réactifs

- Plaques à microtitration contrôlées optiquement (Absorption ne variant pas de plus ou moins 0,005 Do)* ;
- Micropipettes Gilson (TM) : 5 µl, 200 µl, 1000 µl ;
- Titertek (TM) 8 canaux, volume réglable** ;
- Lecteur vertical***.

- Tampon carbonate pH 9,6 (Dilution des antigènes)

. Sodium Carbonate	1,59 g (0,015 M)
. Sodium Hydrogencarbonate	2,94 g (0,035 M)
. Sodium azide.....	0,2 g
. Eau distillée.....	QSP 1 l

* Réf. NUNC 2-39454.

** 50 à 200 µl - Réf. 77-889-00

*** LOV 1 (BIOMERIEUX), filtre 405 nm, fente étroite.

- Tampon phosphate (PBS) pH 7,2 (tampon de lavage)

. Sodium Chlorure.....	29 g (0,5 M)
. Di Sodium Hydrogénophosphate.....	3,58 g (0,01 M)
. Sodium Dihydrogénophosphate.....	1,38 g (0,01 M)
. Eau distillée.....	QSP 1 l

- Tampon PBS, Tween, Gélatine (dilution des sérums et conjugués)

. Gélatine.....	0,5 g
. Polysorbate (Tween 20).....	1 ml
. Tampon PBS, pH 7,2.....	100 ml

- Tampon substrat

. Diethanolamine.....	97 ml (1 M)
. Sodium azide.....	0,2 g
. Magnésium chlorure.....	0,2 g (0,001 M)
. Eau distillée, environ.....	800 ml
Ajuster à pH 9,8 avec HCl normal	
. Eau distillée.....	QSP 1 l

Se conserve à 4°C 8 jours

- Réactif de coloration

. Paranitrophenylphosphate disodique.....	100 mg
. Tampon substrat.....	100 mg

- Réactif d'arrêt

. Sodium Hydroxyde.....	12 g (3 N)
. Eau distillée.....	QSP 100 ml

1.2.- Exécution de la réaction

- Fixation de l'antigène

- . Diluer l'antigène dans le tampon carbonate aux dilutions déterminées par dosage en palier (Cf : infra) ;
- . Répartir 200 μ l de dilution par puits ;
- . Recouvrir d'un film adhésif et porter 2 h à 37°C, puis une nuit à 4°C.
- . Prévoir un blanc de plaques (puits contenant 200 μ l de tampon sans antigène).

- Lavage

- . 3 fois 5 mn avec 300 μ l de tampon PBS pH 7,2 par puits.

- Incubation des sérums

- . Dilution des sérums au 1/200 dans le tampon PBS, Tween et Gélatine ;
- . Après lavage, les plaques sont soigneusement égouttées, puis mises à sécher dans un dessiccateur à vide ;
- . Répartir 200 μ l de dilution dans chaque puits ;
- . Recouvrir d'un film adhésif et porter 3 h à 37°C.

- Lavage

- . 5 fois 5 mn par 300 μ l de tampon PBS pH 7,2 par puits.

- Incubation des conjugués

La dilution des conjugués se fait en tampon PBS, Tween, Gélatine à la concentration indiquée par le fabricant (1/1000)

- . Répartir 200 μ l de dilution par puits ;
- . Recouvrir d'un film adhésif et porter 3 h à 37°C.

- Lavage

- . 5 fois 5 mn par 300 μ l de tampon PBS.

- Révélation

- . Répartir 200 μ l de réactif de coloration par puits ;
- . Porter 1/2 h à la température ambiante.

- Arrêt

- . Arrêt de la coloration par 100 μ l de soude 3 N.

- Lecture

- . Les plaques sont lues à 405 nm de longueur d'ondes.

REMARQUES

Il est nécessaire de vérifier la température des réactifs avant leur utilisation.

Dans la mesure du possible, il est préférable de préparer les tampons le jour même de leur utilisation - condition impérative pour le tampon PBS, Tween, Gélatine. La conservation éventuelle des autres tampons se fait à 4°C. Toutes les dilutions se font extemporanément.

Une meilleure lecture est faite si le fond des plaques est lavé à l'alcool puis essuyé juste avant la lecture.

Les plaques ne sont pas réutilisables.

Nous pouvons résumer la réaction E.L.I.S.A. par la figure 18.

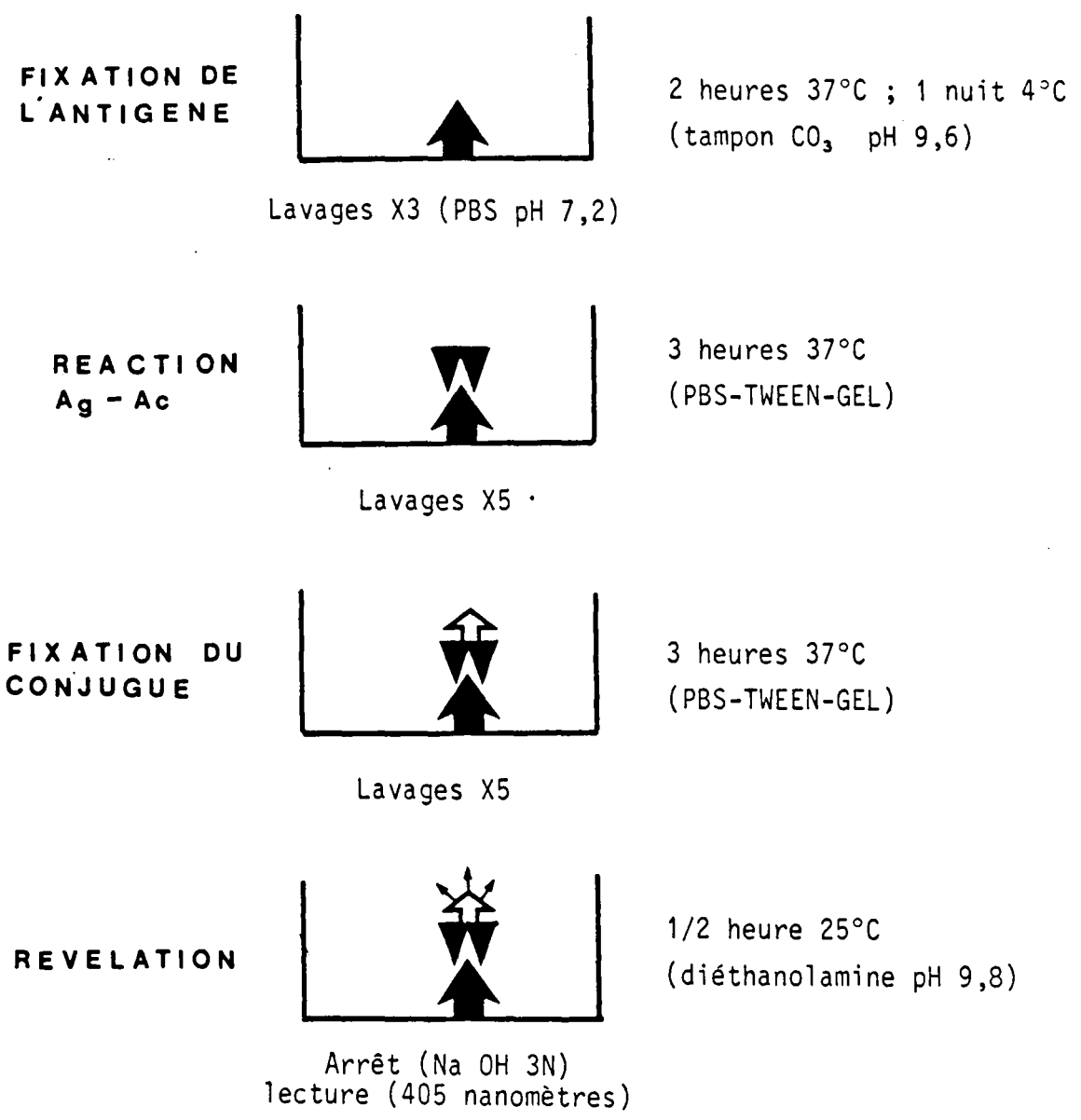
1.3.- Etude des tampons





Nous avons étudié l'influence de divers adjuvants dans les tampons d'incubations des sérums et des conjugués, dans les tampons de lavage en utilisant des plaques incubées avec l'antigène et des plaques sans antigènes.

Les adjuvants testés sont :

- le Tween 20 à 0,5 et 1 %,
- la Gélatine à 0,5 et 1 %
- la BSA à 0,5 et 1 %
- un sérum humain normal à 0,5 et 1 %.

Nous avons utilisé, pour cet essai, 3 sérums négatifs (Européens nouvellement arrivés en zone d'endémie) et 3 sérums positifs (porteurs de microfilaires Loa loa).



-  ANTIGENE
-  ANTICORPS
-  CONJUGUE
-  REVELATEUR

**fig. 18: Technique E.L.I.S.A.
anticorps anti Loa**

1.4.- Détermination des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps

Pour déterminer les dilutions appropriées à notre système E.L.I.S.A., nous avons effectué des dosages en palier. Nous avons utilisé deux sérums positifs :

- Positif_I : Constitué par un pool de sérums provenant d'Africains présentant une microfilarémie supérieure ou égale à 500 microfilaires par ml de sang total ;
- Positif_II : Sérum d'un Africain prélevé lors du passage conjonctival d'une macrofilarie Loa loa. La microfilarémie de cette personne est négative.

Ces deux sérums servent de contrôle positif pour tous les dosages que nous avons effectués. Ils ont été utilisés systématiquement sur toutes les plaques.

Nous avons également utilisé deux sérums négatifs provenant de deux Européens nouvellement arrivés en zone d'endémie filarienne, n'ayant jamais auparavant séjourné dans de telles zones. Les sujets ne présentent aucun signe clinique ou biologique laissant supposer une parasitose. Comme les témoins positifs, ces deux sérums sont inclus systématiquement dans toutes les réactions.

Le positif I a été décongelé lors de sa constitution, réparti en aliquots et conservé à - 80° jusqu'au jour de son utilisation.

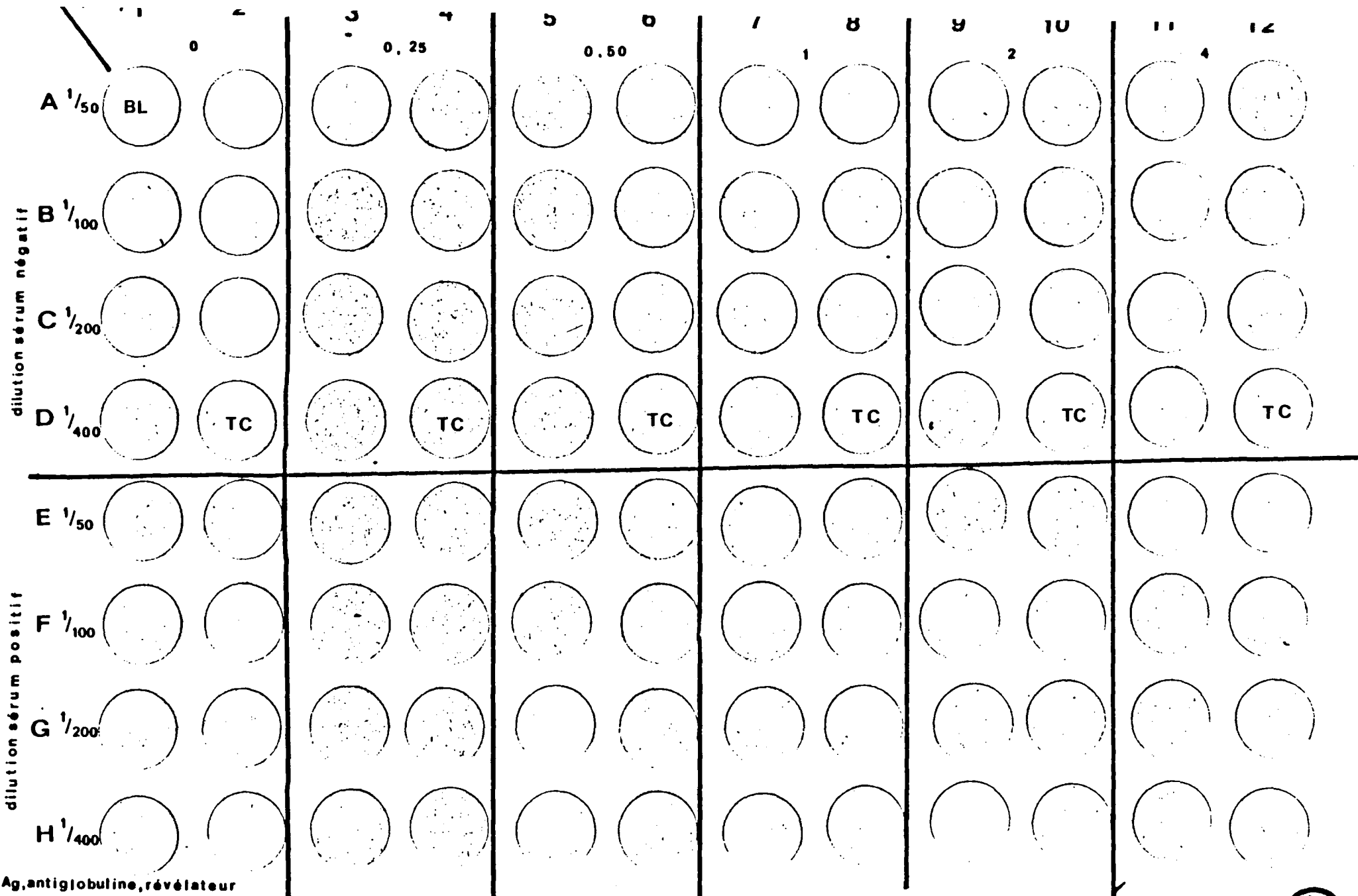
Le positif II et les deux sérums négatifs ont été séparés le jour du prélèvement, répartis en aliquots et conservés à - 80°.

Pour chaque antigène (Ag M3 et Ag S3), deux plaques à microtitration sont compartimentées suivant le plan présenté à la figure 19. Sur cette figure, les concentrations indiquées sont celles qui ont été utilisées avec Ag M3. Les plaques avec Ag S3 ont des concentrations doubles. Pour chaque antigène, une plaque est testée avec le positif I et le négatif I, et une autre avec le positif II et le négatif II.

1.5.- Etude de la reproductibilité de la technique

Cette étude est faite avec l'antigène métabolique. 35 sérums ont été dosés :

- 10 porteurs de microfilaires Loa loa, dont le positif I ;
- le positif II ;
- 8 porteurs de microfilaires Dipetalonema perstans sans association avec Loa loa ;
- 8 Gabonais de la région de Franceville, ne présentant pas de microfilaires après leuco-concentration sur 5 ml de sang total (154) et ne présentant pas de signes de filariose ;
- 8 Européens récemment arrivés en zone d'endémie filarienne, et ne présentant aucun signe de parasitose. Les négatifs I et II sont inclus dans cette série.



TC= Ag,antiglobuline,révéléateur
 BL= Blanc

figure 19 : Détermination des concentrations optimales



Nous avons décongelé tous les sérums au jour J0 et effectué le dosage n° 1. Le dosage n° 2 a été effectué le lendemain (J0 + 1), après conservation à la température ambiante, et le dosage n° 3 au jour J0 + 6, après conservation à + 4°C. Les tampons nécessaires à ces dosages n'ont pas été modifiés et ils ont été conservés au réfrigérateur à + 4°C sans adjonction de conservateur.

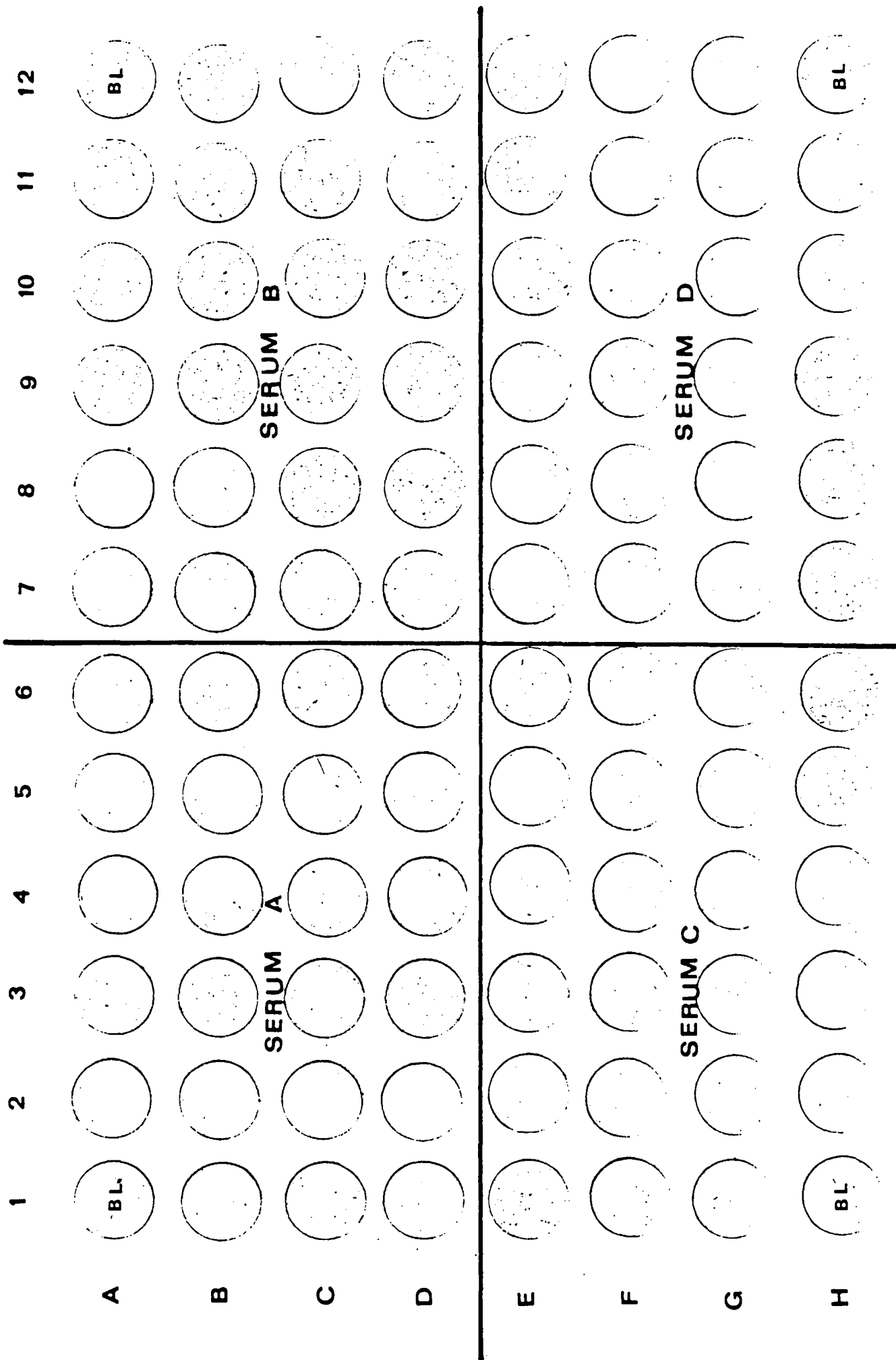
Tous les sérums ont été dosés en deux exemplaires.

Pour étudier la reproductibilité de la technique sur un laps de temps plus long, et pour vérifier l'absence d'effet de bord (24), nous avons prélevé quatre sujets (sérum A, B, C et D) et réparti chaque sérum en deux lots :

- Lot n° I : conservation à + 4°C ;
- Lot n° II : conservation à + 4°C avec 0,02 % d'azide de sodium.

Une microplaque est compartimentée suivant la figure 20. Chaque sérum est testé 23 fois, et nous avons répété 12 fois cette manipulation suivant le diagramme :

	MANIPULATIONS											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
JOUR J	0	0	8	8	8	8	15	15	15	15	21	21
LOT SERUM	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	II	II
TAMPON AU JOUR J	0	0	8	8	0	0	15	15	0	0	21	0



BL puits sans sérum



figure 20: Etude de la reproductibilité

1.6.- Etude de la spécificité de la technique

604 sérums ont été dosés en IgG et IgM avec les antigènes métaboliques et somatiques. Ces sérums ont été choisis de la manière suivante :

- 108 sujets Gabonais porteurs de microfilaires Loa loa ;
- 46 sujets Gabonais porteurs de microfilaires Loa loa associées à des microfilaires Dipetalonema perstans ;
- 192 sujets Gabonais ne présentant pas de microfilaires sanguicoles ;
- 108 sujets Gabonais porteurs de microfilaires Dipetalonema perstans ;
- 30 sujets Européens n'ayant jamais séjourné en zone d'endémie filarienne et ne présentant aucun signe de parasitose ;
- 64 sujets Européens atteints de diverses affections (cirrhoses, collagénoses, leucémies)* ;
- 24 sujets atteints d'onchocercose prouvée parasitologiquement et/ou immunologiquement** ;
- 10 sujets atteints d'hydatidose** ;
- 15 sujets Nord-Africains* ;
- 7 sujets originaires du Sud-Est Asiatique*.

* Nous remercions le Docteur J.M. CARTRON du Centre National de Transfusion Sanguine, de Paris, qui nous a procuré ces sérums.

** Nous remercions le Professeur A. VERNES qui nous a procuré ces sérums.

2.- RESULTATS

Dans cette partie, nous présentons l'ensemble des résultats d'une manière brute, le plus souvent sous forme de tableau ou de figure. Les résultats ne posant pas de difficultés d'interprétation sont présentés avec une courte conclusion. Les résultats les plus intéressants seront repris dans la discussion.

2.1.- Choix des tampons

Une première étude a été faite sur des plaques n'ayant pas reçu d'antigène. Le but était de voir si le choix des tampons avait une influence sur la fixation non spécifique des sérums. Pour cette étude, nous avons utilisé un pool de sérums humains Africains et Européens. Ces sérums ont été utilisés à une dilution 1/200. Au Tableau VI, sont présentées les densités optiques obtenues.

Pour confirmer cette étude, nous avons procédé à une analyse avec 3 sérums positifs (présence de microfilaires Loa loa) et 3 sérums négatifs (sang d'Européens) sur des plaques non traitées et des plaques traitées avec Ag M3 à 2 µg/ml (200 µl/puits). Les densités optiques obtenues sont présentées au Tableau VII.



Tampons de Lavage Tampons d'incubation PBS + TWEEN 1 % +	PBS		PBS + TWEEN 1 %	
	Réaction	Témoin*	Réaction	Témoin*
0	1,904	1,073	1,806	0,121
Gélatine 1 %	0,901	0	1,785	0
Gélatine 0,5 %	0,082	0	1,556	0
Albumine bovine 1 %	0,554	0	1,338	0,024
Albumine bovine 0,5 %	0,415	0	0,465	0
Sérum humain 1 %	0,080	0,023	0	0
Sérum humain 0,5 %	0,144	0,023	0	0

TABLEAU VI : CHOIX DES TAMPONS

* Le témoin est composé de tous les réactifs sans sérum test.

CONCLUSION :

- *Tampon lavage : PBS seul*
- *Tampon incubation : PBS + TWEEN 1 % + GELATINE 0,5 %
ou PBS + TWEEN 1 % + SERUM HUMAIN 1 %.*

	1				2			
	SANS ANTIGENE		ANTIGENE		SANS ANTIGENE		ANTIGENE	
	Réaction	Témoïn	Réaction	Témoïn	Réaction	Témoïn	Réaction	Témoïn
Négatif 1	0,069	0,012	0,106	0,007	0,208	0,190	0,317	0,280
Négatif 2	0,045	0,006	0,129	0,017	0,081	0,037	0,241	0,224
Négatif 3	0,030	0,001	0,090	0,002	0,137	0,023	0,160	0,142
Positif 1	0,184	0,026	0,814	0,039	0,291	0,194	0,903	0,471
Positif 2	0,056	0,010	0,511	0	0,177	0,169	0,692	0,338
Positif 3	0,118	0,03	0,677	0,001	0,108	0,038	0,760	0,428

TABLEAU VII : CHOIX DES TAMPONS ANALYSES AVEC ANTIGENES

Tampon de lavage : PBS seul pour 1 et 2

Tampon sérums : PBS + Tween 1 % + Gélatine 0,5 % pour 1

: PBS + Tween 1 % + Sérum humain 1 % pour 2

Tampon conjugué : PBS + Tween 1 % + Gélatine 0,5 % pour 1 et 2.

CONCLUSION : Les tampons adéquats pour notre système E.L.I.S.A. sont : - Le PBS seul pour les lavages,
- Le PBS + Tween 1 % + Gélatine 0,5 % pour l'incubation des sérums et des conjugués.



2.2.- Détermination des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps

2.2.1.- Antigènes somatiques

La figure 21 montre les densités optiques obtenues à chaque dilution de sérums en fonction des concentrations d'Ag S3 utilisées pour une antiglobuline anti-IgG. Identiquement, la figure 22 montre les densités optiques avec une antiglobuline anti-IgM.

2.2.2.- Antigènes métaboliques

Pour l'antigène Ag M3, nous présentons les résultats à la figure 23 pour l'antiglobuline anti-IgG, et à la figure 24 pour l'antiglobuline anti-IgM.

L'interprétation de ces courbes sera explicité au Chapitre de la Discussion. Nous indiquons simplement, ici, nos conclusions :

	CONCENTRATION ANTIGENE	DILUTION SERIQUE
Ag S3	4 μ l/ml	1/200
Ag M3	2 μ l/ml	1/200

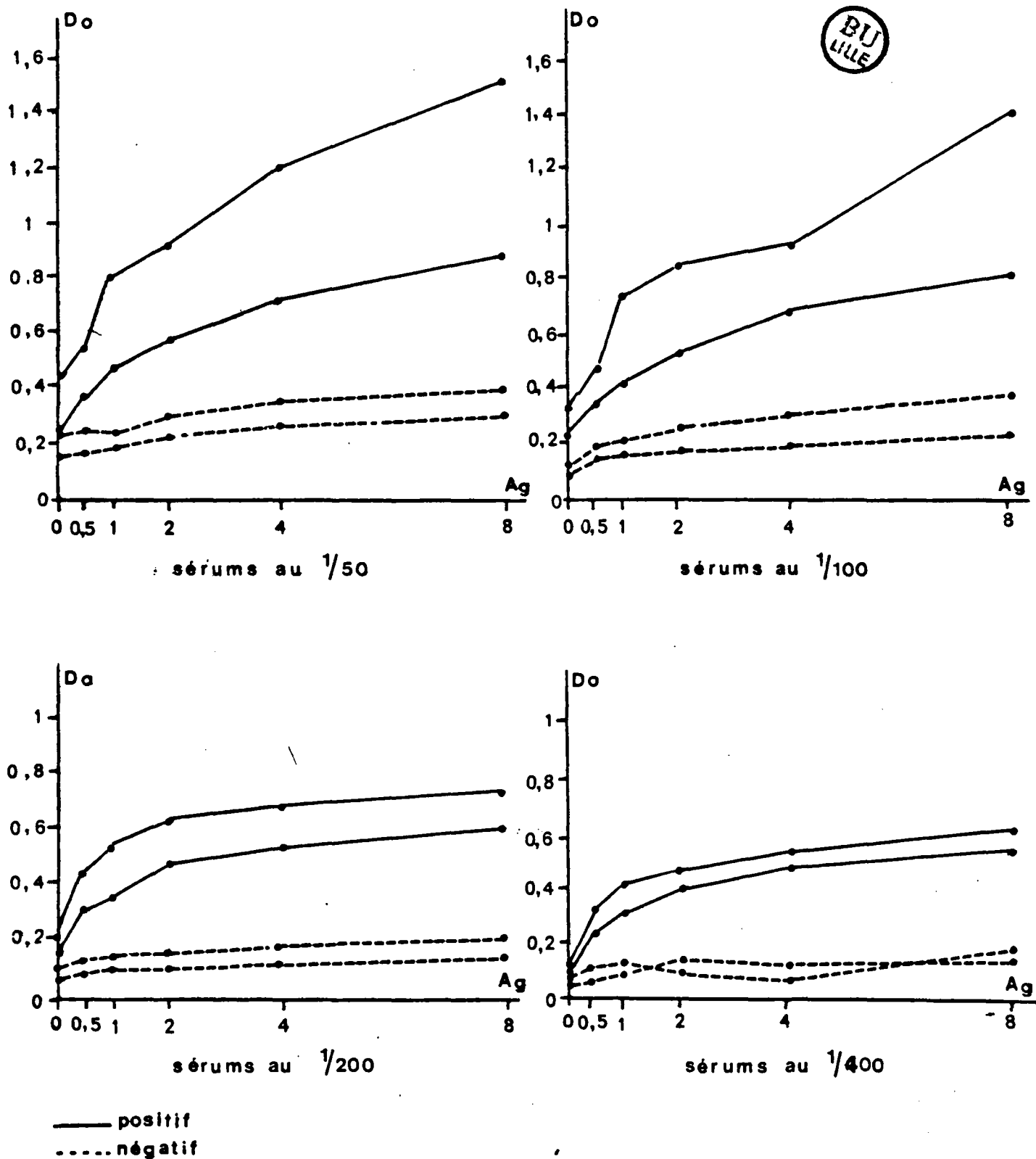


fig 21: Dosage en palier-antigène Ag S3-
immunoglobuline anti IgG

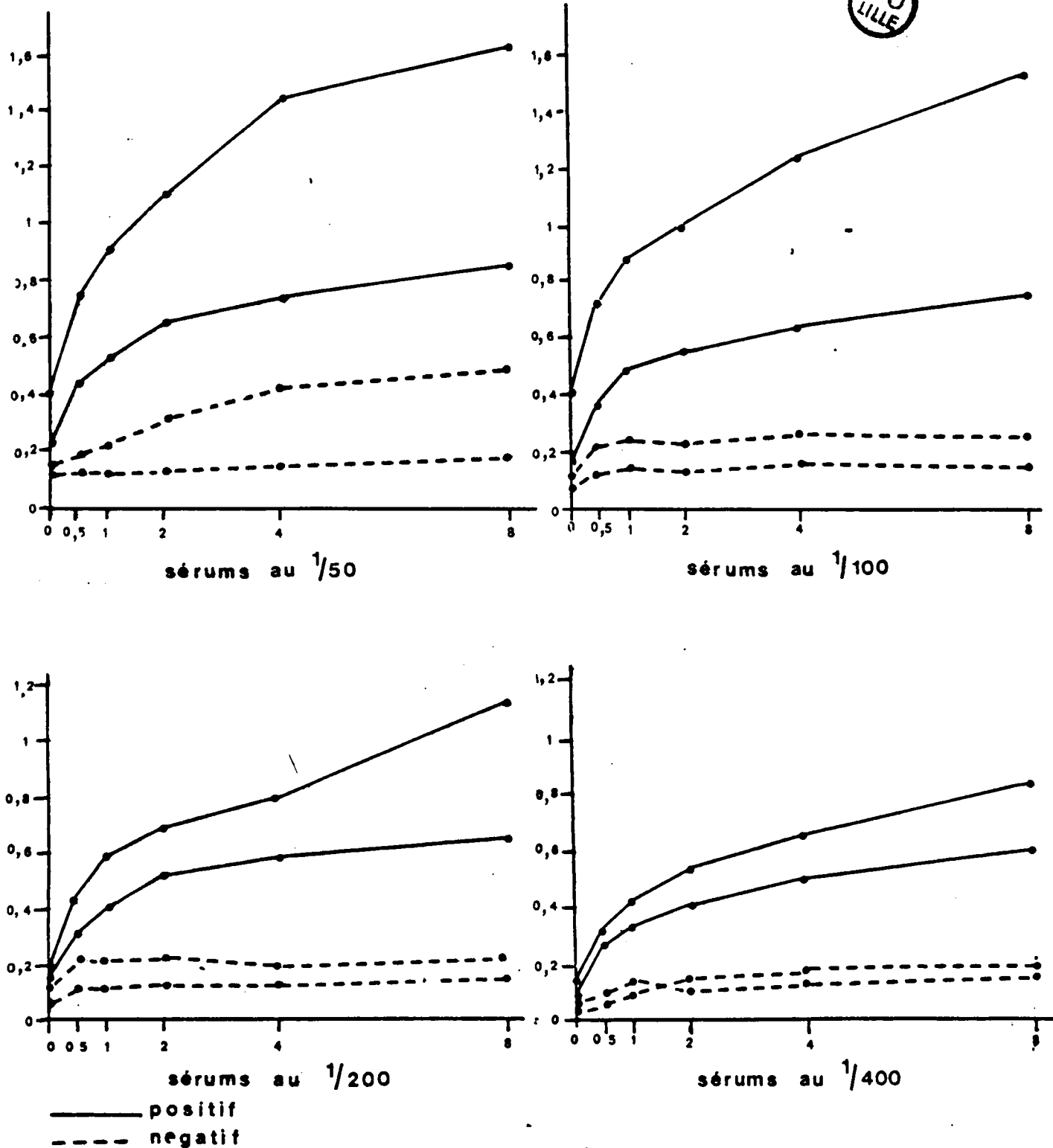
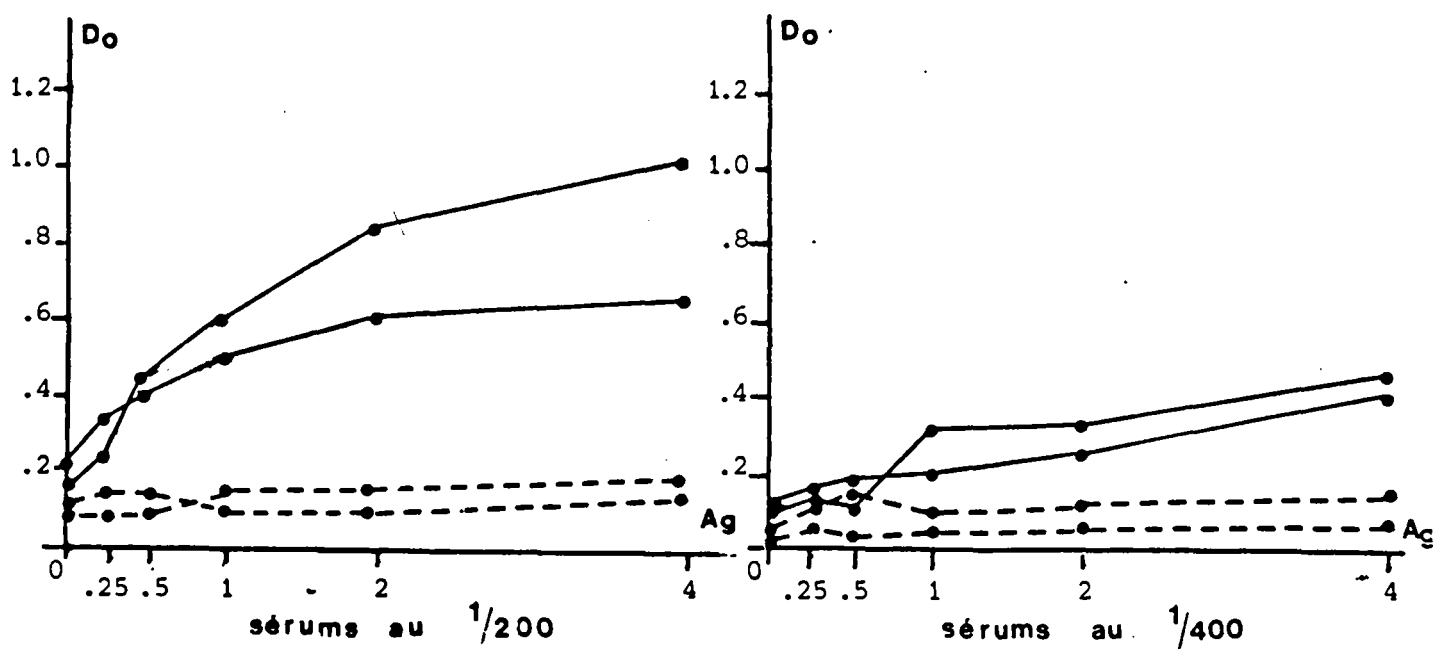
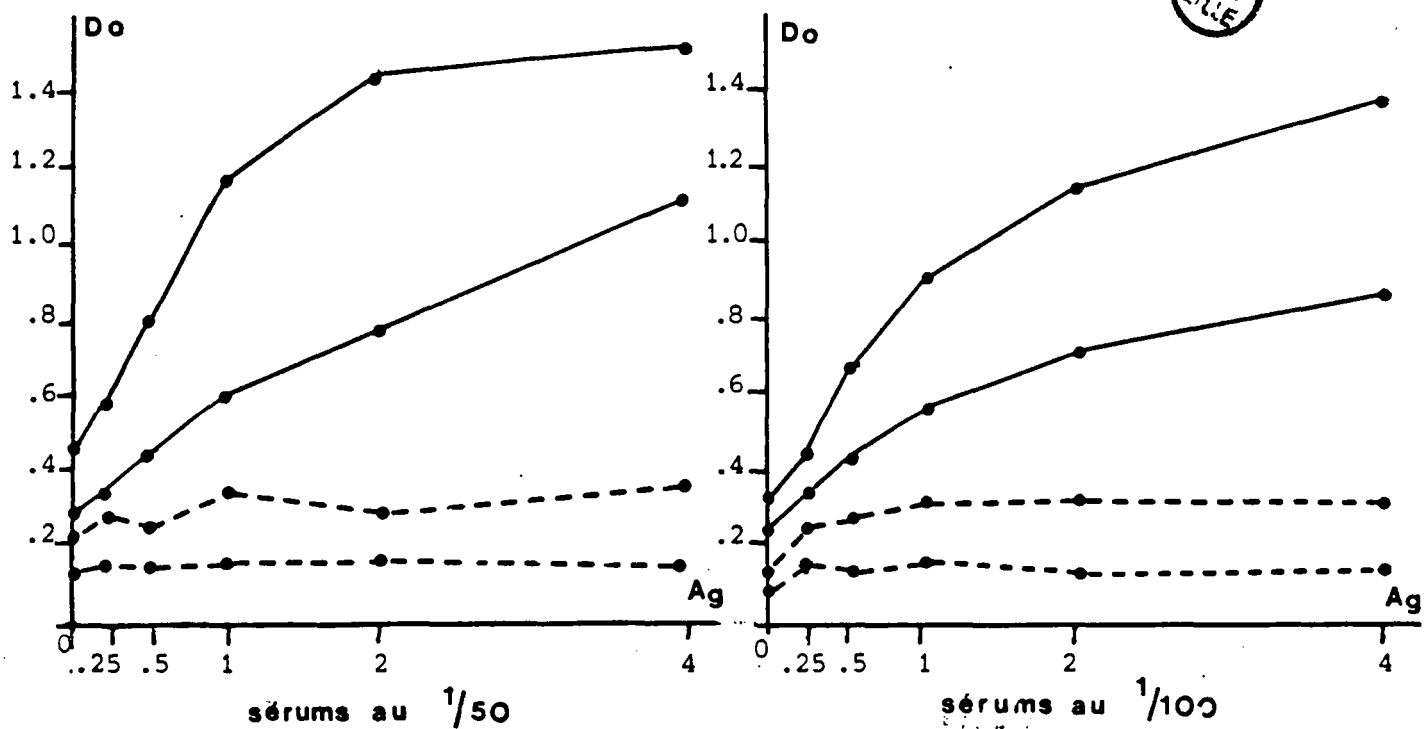


fig.22 : Dosage en palier- antigène Ag S3 - immunoglobuline anti Ig M



— positif
- - - négatif

fig. 23 : Dosage en palier - antigène Ag M3 - immunoglobuline anti Ig G

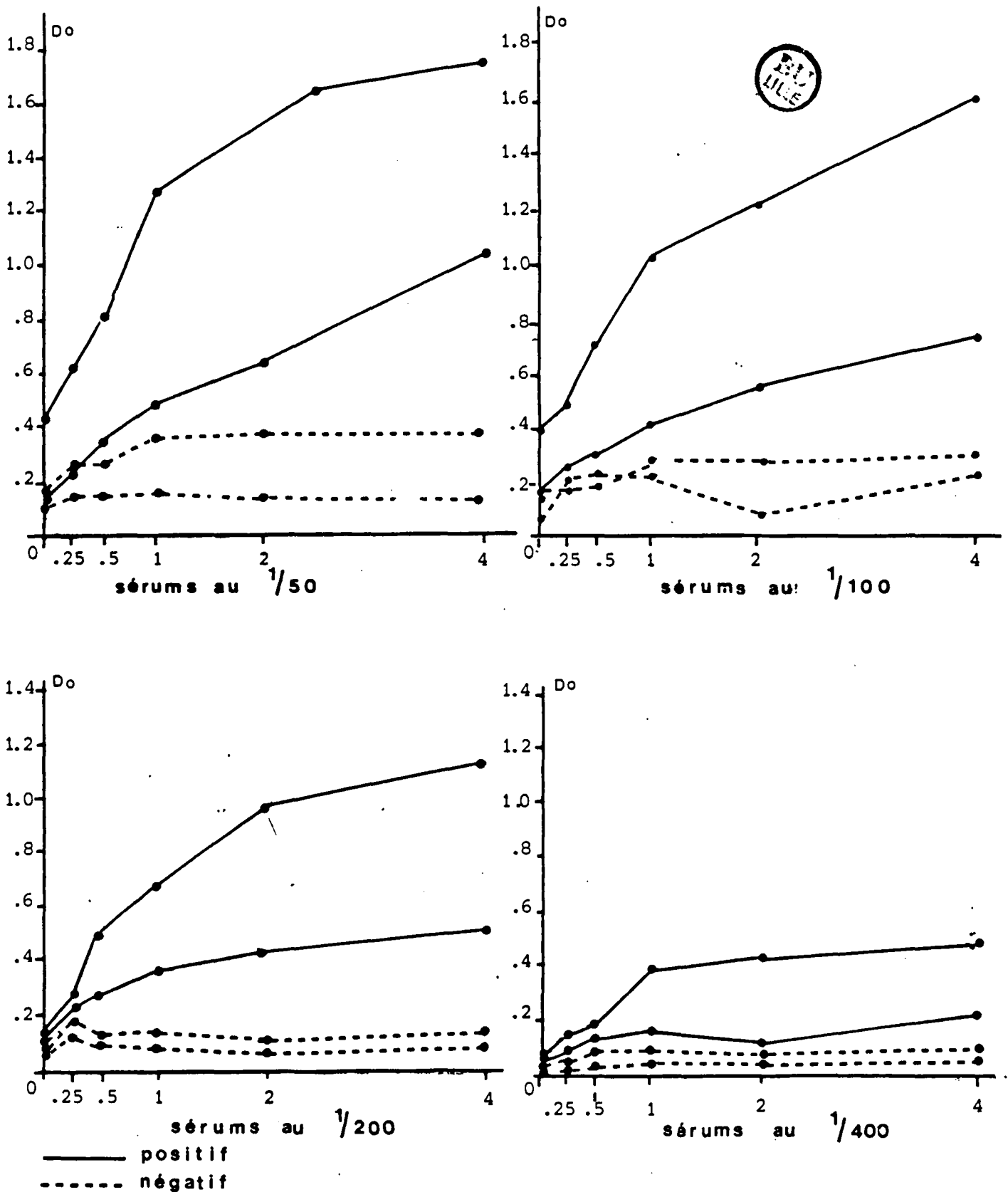


fig. 24: Dosage en palier-antigène Ag M3
immunoglobuline anti Ig M

2.3.- Etude de la reproductibilité de la technique

Dans le Tableau VIII sont indiquées les densités optiques lues pour chaque sérum testé lors du dosage n° 1 à J0, le Tableau IX indique les résultats au jour J0 + 1 (dosage n° 2), et le Tableau X au jour J0 + 6 (dosage n° 3). Ces tableaux indiquent les valeurs nécessaires aux calculs statistiques que nous avons effectués (analyses inter et intra essais). Dans les deux premières colonnes sont indiquées les valeurs observées sur chacun des puits, et la moyenne est portée dans la troisième colonne. Les analyses ont été faites avec l'antiglobuline anti-IgG et l'antiglobuline anti-IgM. Les plaques sont traitées par l'antigène Ag M3.



	IgG			IgM		
	Puits 1	Puits 2	Moyenne	Puits 1	Puits 2	Moyenne
<i>Loa loa</i> +	0,534	0,520	0,527	0,522	0,514	0,518
	1,002	1,014	1,008	0,967	1,021	0,994
	0,841	0,773	0,807	0,705	0,759	0,732
	0,396	0,360	0,378	0,529	0,567	0,548
	0,737	0,726	0,7315	0,594	0,664	0,629
	0,512	0,510	0,511	0,549	0,547	0,548
	0,945	1,023	0,984	0,893	0,965	0,929
	0,538	0,514	0,526	0,666	0,630	0,648
	0,784	0,708	0,746	0,434	0,420	0,427
	0,714	0,671	0,6925	0,721	0,707	0,714
	0,688	0,720	0,704	0,500	0,498	0,499
<i>D. perstans</i> +	0,514	0,514	0,514	0,983	1,041	1,012
	0,227	0,199	0,213	0,248	0,190	0,219
	0,381	0,307	0,344	0,233	0,336	0,284
	0,545	0,551	0,548	0,142	0,131	0,1365
	0,345	0,285	0,315	0,079	0,116	0,0975
	0,134	0,120	0,127	0,022	0,091	0,0565
	0,147	0,173	0,160	0,069	0,044	0,565
	0,244	0,206	0,225	0,906	0,962	0,934
	Africains -	0,398	0,392	0,395	0,485	0,483
0,317		0,306	0,3115	0,229	0,220	0,2245
0,286		0,358	0,322	0,321	0,315	0,318
0,373		0,313	0,343	0,253	0,244	0,2495
0,421		0,399	0,410	0,709	0,687	0,698
0,749		0,797	0,773	0,758	0,719	0,7385
0,394		0,444	0,419	0,181	0,116	0,1485
0,229		0,207	0,218	0,201	0,187	0,194
Européens		0,122	0,150	0,136	0,099	0,085
	0,121	0,131	0,126	0,102	0,096	0,099
	0,063	0,135	0,099	0,095	0,077	0,086
	0,134	0,090	0,112	0,089	0,047	0,0685
	0,108	0,064	0,086	0,054	0,124	0,089
	0,089	0,139	0,114	0,042	0,109	0,0755
	0,133	0,123	0,128	0,050	0,016	0,038
	0,094	0,080	0,087	0,021	0,027	0,003

TABLEAU VIII : ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITE

DOSAGE N° 1 - JOUR J0



	IgG			IgM			
	Puits 1	Puits 2	Moyenne	Puits 1	Puits 2	Moyenne	
<i>Loa loa</i> +	0,617	0,619	0,618	0,506	0,446	0,476	
	1,058	1,002	1,030	1,139	1,207	1,168	
	0,820	0,760	0,790	0,723	0,741	0,732	
	0,403	0,331	0,367	0,546	0,510	0,528	
	0,632	0,668	0,650	0,524	0,544	0,534	
	0,502	0,546	0,524	0,678	0,740	0,709	
	1,125	1,080	1,103	0,667	0,722	0,6945	
	0,532	0,500	0,516	0,599	0,522	0,588	
	0,740	0,752	0,746	0,443	0,420	0,4315	
	0,623	0,685	0,654	0,594	0,656	0,625	
	0,688	0,629	0,6585	0,490	0,495	0,4925	
	<i>D. perstans</i> +	0,517	0,518	0,5175	0,974	0,902	0,938
		0,270	0,350	0,310	0,239	0,257	0,248
0,367		0,311	0,339	0,386	0,432	0,409	
0,547		0,543	0,545	0,165	0,151	0,158	
0,261		0,317	0,294	0,077	0,115	0,096	
0,125		0,103	0,114	0,159	0,084	0,1215	
0,132		0,180	0,156	0,135	0,111	0,128	
0,245		0,199	0,222	0,889	0,829	0,859	
Africains -		0,424	0,344	0,384	0,602	0,674	0,638
		0,291	0,337	0,314	0,160	0,136	0,148
		0,308	0,308	0,308	0,244	0,261	0,2525
	0,329	0,327	0,328	0,283	0,275	0,279	
	0,421	0,469	0,445	0,666	0,630	0,648	
	0,705	0,661	0,683	0,833	0,821	0,827	
	0,381	0,442	0,413	0,078	0,114	0,096	
	0,211	0,203	0,207	0,123	0,173	0,148	
	Européens	0,152	0,106	0,129	0,097	0,075	0,086
0,134		0,160	0,147	0,123	0,101	0,112	
0,130		0,096	0,118	0,073	0,103	0,088	
0,155		0,099	0,127	0,010	0,063	0,0365	
0,127		0,141	0,134	0,023	0,074	0,0485	
0,144		0,064	0,104	0,009	0,027	0,018	
0,065		0,113	0,089	0,020	0,029	0,0245	
0,008		0,048	0,028	0,099	0,094	0,0965	

TABLEAU IX : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE

DOSAGE N° 2 - JOUR JO + 1

	IgG			IgM			
	Puits 1	Puits 2	Moyenne	Puits 1	Puits 2	Moyenne	
<i>Loa loa</i> +	0,477	0,463	0,470	0,485	0,499	0,492	
	0,928	0,944	0,936	1,041	1,021	1,036	
	0,700	0,730	0,715	0,850	0,798	0,824	
	0,356	0,312	0,334	0,403	0,467	0,435	
	0,633	0,631	0,631	0,533	0,523	0,528	
	0,462	0,468	0,465	0,622	0,614	0,618	
	0,879	0,897	0,888	0,842	0,808	0,825	
	0,460	0,468	0,464	0,568	0,624	0,596	
	0,648	0,649	0,6485	0,419	0,437	0,428	
	0,639	0,635	0,637	0,603	0,623	0,613	
	0,596	0,620	0,608	0,622	0,557	0,590	
	<i>D. perstans</i> +	0,478	0,466	0,472	0,989	0,955	0,972
0,194		0,371	0,2825	0,215	0,162	0,1885	
0,300		0,310	0,305	0,291	0,329	0,310	
0,469		0,494	0,4815	0,079	0,147	0,118	
0,251		0,264	0,2575	0,094	0,168	0,132	
0,073		0,103	0,088	0,072	0,121	0,0965	
0,146		0,138	0,142	0,105	0,037	0,071	
0,127		0,119	0,123	0,799	0,847	0,823	
Africains -		0,340	0,358	0,349	0,619	0,574	0,5965
		0,285	0,285	0,285	0,182	0,173	0,1835
	0,267	0,269	0,2685	0,306	0,238	0,272	
	0,296	0,256	0,276	0,191	0,183	0,187	
	0,391	0,451	0,421	0,763	0,733	0,748	
	0,633	0,634	0,6335	0,673	0,611	0,642	
	0,363	0,351	0,357	0,107	0,149	0,128	
	0,153	0,139	0,147	0,241	0,230	0,2355	
	Européens	0,070	0,118	0,094	0,088	0,108	0,098
0,157		0,113	0,135	0,136	0,061	0,097	
0,108		0,081	0,097	0,071	0,105	0,088	
0,088		0,080	0,084	0,032	0,104	0,068	
0,014		0,036	0,025	0,034	0,026	0,004	
0,088		0,002	0,035	0,015	0,015	0,015	
0,000		0,012	0,006	0,072	0,040	0,056	
0,003		0,021	0,012	0,124	0,144	0,134	

TABLEAU X : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE

DOSAGE N° 3 - JOUR JO + 6

2.3.1.- Analyse de la variation inter-essai

Nous avons effectué une analyse de variance sur les trois dosages en les considérant comme un plan à plusieurs facteurs. Pour plus de précision, les calculs ont été faits sur la somme des 2 puits.

Analyse avec l'immunoglobuline anti-IgG sur les dosages 1, 2 et 3

ORIGINES	SOMME DES CARRES	d.d.l.	VARIANCE	F
Sérum	28,0612	34	0,825	242,64
Manip.	0,2937	2	0,147	43,18
Résiduelle	0,231	68	0,0034	
<hr/>				
TOTAL	28,586	104		

d.d.l. = Degré de liberté

Conclusion : Sérum et Manip. différents.

Analyse avec l'immunoglobuline anti-IgM sur les dosages 1, 2 et 3

ORIGINES	SOMME DES CARRES	d.d.l.	VARIANCE	F
Sérum	38,6911	34	1,138	106,20
Manip.	0,0069	2	0,0034	0,322
Résiduelle	0,7286	68	0,0107	
<hr/>				
TOTAL	39,427	104		

Conclusion : Sérums différents ; manip. non significatif.

2.3.2.- Analyse de la variation intra-essai

Nous avons considéré les 35 valeurs de chacun des puits comme des séries appariées et nous les avons comparées entre elles.

	DOSAGE N° 1		DOSAGE N° 2		DOSAGE N° 3	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
Moyenne des différences	$6,77.10^3$	$8,69.10^3$	$5,11.10^3$	$4,51.10^3$	$6,17.10^3$	$1,57.10^3$
Somme des différences	0,237	0,304	0,179	0,158	0,216	0,055
Somme des différences au carré	0,0613	0,0660	0,0775	0,0656	0,0569	0,0689
Variance	$1,76.10^3$	$1,86.10^3$	$2,25.10^3$	$1,91.10^3$	$1,64.10^3$	$2,02.10^3$
Ecart-type	$4,19.10^2$	$4,32.10^2$	$4,75.10^2$	$4,37.10^2$	$4,04.10^2$	$4,50.10^2$
Test Epsilon	0,96	1,19	0,64	0,61	0,90	0,207
Signification	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Nous concluons qu'il n'existe pas de différence significative entre les puits, ce qui entraîne qu'un dosage unique est suffisant.

2.3.3.- Validité de la technique

Cette première étude a été faite sur le dosage n° 1. Nous voulons déterminer si en moyenne les résultats de chacun des groupes diffèrent significativement du groupe porteur de microfilaries Loa loa. Le

Tableau XI indique les calculs statistiques effectués. Nous pouvons conclure de cette étude qu'avec l'antiglobuline anti-IgG, la validité de la technique est bonne, même vis-à-vis des sujets vivant en zone d'endémie. Avec l'antiglobuline IgM, cette validité est limitée. L'analyse d'un effectif plus important nous donnera des résultats complémentaires (Cf. p.131 "Analyse de la population vivant en zone d'endémie").

		<i>Loa loa</i> +	<i>D. perstans</i> +	Africains -	Européens
IgG	N	11	8	8	8
	Moyenne	0,692	0,306	0,399	0,113
	Somme des X	7,615	2,446	3,191	0,908
	Somme des X ²	5,6607	0,9198	1,4628	0,1065
	Variance	0,0389	0,0246	0,0271	0,0005
	Ecart type	0,1972	0,1567	0,1647	0,0222
	Test t		4,57	3,42	8,20
	Signification		< 1 %	< 1 %	< 1 %
IgM	N	11	8	8	8
	Moyenne	0,653	0,349	0,369	0,069
	Somme des X	7,186	2,796	2,955	0,551
	Somme des X ²	5,0125	2,0596	1,5004	0,04543
	Variance	0,0318	0,1546	0,0584	0,0011
	Ecart type	0,1783	0,3932	0,2417	0,0327
	Test t		2,28	2,96	9,08
	Signification		< 5 %	< 1 %	< 1 %

TABLEAU XI : VALIDITE DE LA TECHNIQUE - Analyses statistiques

2.4.- Reproductibilité de la technique dans le temps

Dans le tableau XII, nous indiquons les résultats obtenus et les valeurs nécessaires aux calculs avec les sérums A, B, C et D. Dans ces tableaux, la somme des X est égale à la somme des 23 densités optiques observées pour chaque sérum.

SERUM A	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
Manip. 1	15,480	10,428	0,986	0,0004	0,0205
Manip. 2	15,619	10,614	0,679	0,0003	0,0179
Manip. 3	15,471	10,416	0,673	0,0004	0,0209
Manip. 4	15,686	10,706	0,682	0,0004	0,0195
Manip. 5	15,549	10,519	0,676	0,0003	0,0185
Manip. 6	15,608	10,600	0,679	0,0004	0,0189
Manip. 7	13,301	7,700	0,578	0,0004	0,0193
Manip. 8	15,491	10,444	0,674	0,0005	0,0214
Manip. 9	13,318	7,719	0,579	0,0003	0,0186
Manip. 10	15,525	10,494	0,675	0,0007	0,0256
Manip. 11	14,148	9,049	0,615	0,0157	0,1254
Manip. 12	14,343	8,952	0,624	0,0004	0,0189



SERUM B	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
Manip. 1	22,668	22,350	0,985	0,0004	0,0205
Manip. 2	22,682	22,376	0,986	0,0003	0,0180
Manip. 3	22,565	22,148	0,981	0,0004	0,0211
Manip. 4	22,731	22,478	0,988	0,0006	0,0238
Manip. 5	22,720	22,450	0,988	0,0003	0,0174
Manip. 6	22,728	22,467	0,988	0,0003	0,0182
Manip. 7	19,559	16,641	0,850	0,0004	0,0189
Manip. 8	22,685	22,384	0,986	0,0004	0,0206
Manip. 9	19,495	16,530	0,848	0,0003	0,0165
Manip. 10	22,494	22,007	0,978	0,0004	0,0192
Manip. 11	20,939	19,068	0,910	0,0002	0,0156
Manip. 12	21,099	19,364	0,917	0,0004	0,0206

SERUM C	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
Manip. 1	6,044	1,599	0,263	0,0005	0,0221
Manip. 2	6,166	1,659	0,268	0,0003	0,0159
Manip. 3	5,957	1,552	0,259	0,0004	0,0208
Manip. 4	6,057	1,607	0,263	0,0005	0,0229
Manip. 5	5,916	1,530	0,257	0,0004	0,0195
Manip. 6	6,049	1,600	0,263	0,0004	0,0202
Manip. 7	5,351	1,252	0,233	0,0003	0,0184
Manip. 8	5,967	1,557	0,259	0,0004	0,0197
Manip. 9	5,234	1,200	0,228	0,0004	0,0196
Manip. 10	5,973	1,561	0,260	0,0005	0,0212
Manip. 11	5,677	1,408	0,247	0,0003	0,0181
Manip. 12	5,688	1,413	0,247	0,0003	0,0166

SERUM D	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
Manip. 1	0,802	0,038	0,035	0,0004	0,0209
Manip. 2	0,983	0,054	0,043	0,0005	0,0233
Manip. 3	0,926	0,049	0,040	0,0005	0,0232
Manip. 4	0,731	0,032	0,032	0,0004	0,0204
Manip. 5	0,935	0,049	0,041	0,0005	0,0225
Manip. 6	0,922	0,048	0,040	0,0005	0,0222
Manip. 7	0,863	0,039	0,038	0,0003	0,0167
Manip. 8	0,958	0,048	0,042	0,0004	0,0190
Manip. 9	0,804	0,037	0,035	0,0004	0,0204
Manip. 10	0,937	0,046	0,041	0,0003	0,0183
Manip. 11	0,822	0,038	0,036	0,0004	0,0193
Manip. 12	0,792	0,038	0,034	0,0005	0,0216

TABLEAU XII : ETUDE DE LA REPRODUCTIBILITE DANS LE TEMPS

2.4.1.- Comparaison inter-manipulation

Nous avons considéré comme valeur de base la manipulation n° 1 pour chaque sérum, et comparé les moyennes par rapport à cette valeur par un test de Student (t). La signification du test est indiquée en "p" ; le degré de liberté est de 21 (23 répétitions).

N° MANIP.	SERUM A		SERUM B		SERUM C		SERUM D	
	t	p	t	p	t	p	t	p
2	1,05	NS	0	NS	0,86	NS	1,21	NS
3	0	NS	0,82	NS	0,64	NS	0,76	NS
4	1,53	NS	0,31	NS	0	NS	0,49	NS
5	0,53	NS	0,36	NS	0,98	NS	0,93	NS
6	1,02	NS	0,35	NS	0	NS	0,77	NS
7	16,27	<0,001	23,19	<0,001	5,06	<0,001	0,53	NS
8	0,16	NS	0	NS	0,64	NS	1,17	NS
9	16,42	<0,001	25,28	<0,001	5,61	<0,001	0	NS
10	0,29	NS	1,38	NS	0,47	NS	1	NS
11	2,19	0,05	14,18	<0,001	2,72	0,02	0,16	NS
12	8,49	<0,01	11,54	<0,001	2,75	0,02	0,11	NS

Globalement, nous concluons que si les sérums sont conservés à + 4°C, avec de l'azide de sodium, et, si les tampons sont également conservés à + 4°C, les valeurs ne diffèrent pas significativement après 15 jours de conservation.

2.4.2.- Recherche d'un effet de bord

Nous avons effectué une analyse de variance en considérant la position de chaque puits sur la plaque (plan à 23 facteurs et 12 répétitions).



SERUM A

ORIGINES	Somme des carrés des écarts	d.d.l.	Variance	F
Entre colonnes (position des sérums)	$9,41 \cdot 10^{-3}$	22	$4,278 \cdot 10^{-4}$	0,221
Résiduelle	$4,897 \cdot 10^{-1}$	253	$1,936 \cdot 10^{-3}$	
TOTAL	$4,991 \cdot 10^{-1}$	275		

Conclusion : non significatif

SERUM B

ORIGINES	Somme des carrés des écarts	d.d.l.	Variance	F
Entre colonnes (position des sérums)	$9,26 \cdot 10^{-3}$	22	$4,211 \cdot 10^{-4}$	0,126
Résiduelle	$8,438 \cdot 10^{-1}$	253	$3,335 \cdot 10^{-3}$	
TOTAL	$8,530 \cdot 10^{-1}$	275		

Conclusion : non significatif

SERUM C

ORIGINES	Somme des carrés des écarts	d.d.l.	Variance	F
Entre colonnes (position des sérums)	$1,52 \cdot 10^{-2}$	22	$6,903 \cdot 10^{-4}$	1,356
Résiduelle	$1,288 \cdot 10^{-1}$	253	$5,090 \cdot 10^{-4}$	
TOTAL	$1,440 \cdot 10^{-1}$	275		

Conclusion : non significatif

SERUM D

ORIGINES	Somme des carrés des écarts	d.d.l.	Variance	F
Entre colonnes (position des sérums)	$5,26 \cdot 10^{-3}$	22	$2,393 \cdot 10^{-4}$	0,543
Résiduelle	$1,114 \cdot 10^{-1}$	253	$4,403 \cdot 10^{-4}$	
TOTAL	$1,167 \cdot 10^{-1}$	275		

Conclusion : non significatif

En conclusion, il n'existe aucune différence significative quelle que soit la position du sérum sur une plaque. Cette conclusion est valable quelle que soit la valeur du sérum.

2.5.- Etude de la validité et de la spécificité de la technique

Les résultats de chaque groupe de sujets sont présentés au Tableau XIII (a), (b) et (c). Nous indiquons, dans ce tableau, les éléments nécessaires aux calculs statistiques. Chaque sérum a été testé avec Ag M3 et Ag S3 et avec des immunoglobulines anti-IgG et anti-IgM.

Pour visualiser ces résultats, nous présentons, sous forme de diagramme, les moyennes et l'intervalle de confiance à la Figure 25 pour Ag S3 et à la Figure 26 pour Ag M3. Sur ces deux figures, les sujets vivant en zone d'endémie sont en clair et les sujets témoin sont en foncé.

2.5.1.- Etude de la validité

Une méthode de diagnostic est valable si les sujets atteints de la maladie ont une réponse positive, et si les sujets vivant dans la même région et indemnes de la maladie ont une réponse négative. Pour les parasitoses à Loa loa, le problème est plus complexe car nous savons que les sujets présentant une parasitose décelable à l'examen direct ne représentent pas la totalité des sujets infestés. De plus, nous ne connaissons pas la cinétique de synthèse des anticorps. Nous

Antigène	Immuno-Globuline	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
----------	------------------	-------------	--------------------------	---------	----------	------------



Sang Loa loa positif. Effectif = 108

Ag M3	IgG	58,633	35,697	0,543	0,036	0,19
Ag M3	IgM	52,691	36,609	0,488	0,102	0,319
Ag S3	IgG	55,799	32,158	0,517	0,031	0,176
Ag S3	IgM	42,789	22,195	0,396	0,049	0,221

Sang Loa loa et D. perstans positif. Effectif = 46

Ag M3	IgG	25,055	15,638	0,545	0,044	0,210
Ag M3	IgM	16,224	7,176	0,353	0,032	0,179
Ag 3	IgG	26,950	18,275	0,586	0,055	0,235
Ag S3	IgM	16,318	8,249	0,355	0,055	0,234

Sang D. perstans positif. Effectif = 108

Ag M3	IgG	35,286	15,787	0,327	0,040	0,199
Ag M3	IgM	40,697	28,053	0,377	0,119	0,345
Ag S3	IgG	51,632	29,631	0,478	0,046	0,215
Ag S3	IgM	42,418	25,131	0,393	0,079	0,281

Sang Africains négatifs. Effectif = 192

Ag M3	IgG	48,176	18,177	0,251	0,032	0,178
Ag M3	IgM	65,391	42,166	0,341	0,104	0,323
Ag S3	IgG	50,917	20,081	0,265	0,034	0,186
Ag S3	IgM	58,899	34,046	0,307	0,084	0,289

TABLEAU XIII (a) - E.L.I.S.A. : RESULTATS GLOBAUX AFRICAINS

Antigène	Immuno-Globuline	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
----------	------------------	-------------	--------------------------	---------	----------	------------



Sang Européens normaux. Effectif = 30

Ag M3	IgG	2,631	0,265	0,088	0,001	0,035
Ag M3	IgM	2,454	0,249	0,082	0,002	0,041
Ag S3	IgG	2,653	0,294	0,088	0,002	0,045
Ag S3	IgM	1,800	0,182	0,060	0,003	0,050

Sang Européens pathologiques. Effectif = 64

Ag M3	IgG	7,814	1,107	0,122	0,002	0,049
Ag M3	IgM	4,861	0,620	0,076	0,004	0,063
Ag S3	IgG	6,597	0,870	0,103	0,003	0,055
Ag S3	IgM	4,478	0,469	0,070	0,002	0,050

TABLEAU XIII (b) - E.L.I.S.A. : RESULTATS EUROPEENS



Antigène	Immuno-Globuline	Somme des X	Somme des X ²	Moyenne	Variance	Ecart type
----------	------------------	-------------	--------------------------	---------	----------	------------

Sang Sud-Est Asiatiques. Effectif = 7

Ag M3	IgG	1,024	0,159	0,146	0,002	0,040
Ag M3	IgM	1,158	0,199	0,165	0,001	0,034
Ag S3	IgG	1,070	0,202	0,153	0,006	0,080
Ag S3	IgM	1,038	0,203	0,148	0,008	0,091

Sang Nord-Africains. Effectif = 15

Ag M3	IgG	1,379	0,152	0,092	0,002	0,043
Ag M3	IgM	1,110	0,147	0,074	0,005	0,068
Ag S3	IgG	1,297	0,129	0,086	0,001	0,035
Ag S3	IgM	1,075	0,102	0,072	0,002	0,042

Sang Onchocercose. Effectif = 24

Ag M3	IgG	3,289	0,476	0,137	0,001	0,033
Ag M3	IgM	2,699	0,355	0,112	0,002	0,047
Ag S3	IgG	6,425	1,738	0,268	0,001	0,028
Ag S3	IgM	4,653	1,093	0,194	0,008	0,091

Sang Hydatidose. Effectif = 10

Ag M3	IgG	1,194	0,148	0,119	0,001	0,026
Ag M3	IgM	0,920	0,127	0,092	0,005	0,069
Ag S3	IgG	0,816	0,071	0,082	0,001	0,022
Ag S3	IgM	0,491	0,037	0,049	0,001	0,038

TABLEAU XIII (c) - E.L.I.S.A. : RESULTATS GLOBAUX SANGS DE CONTROLE

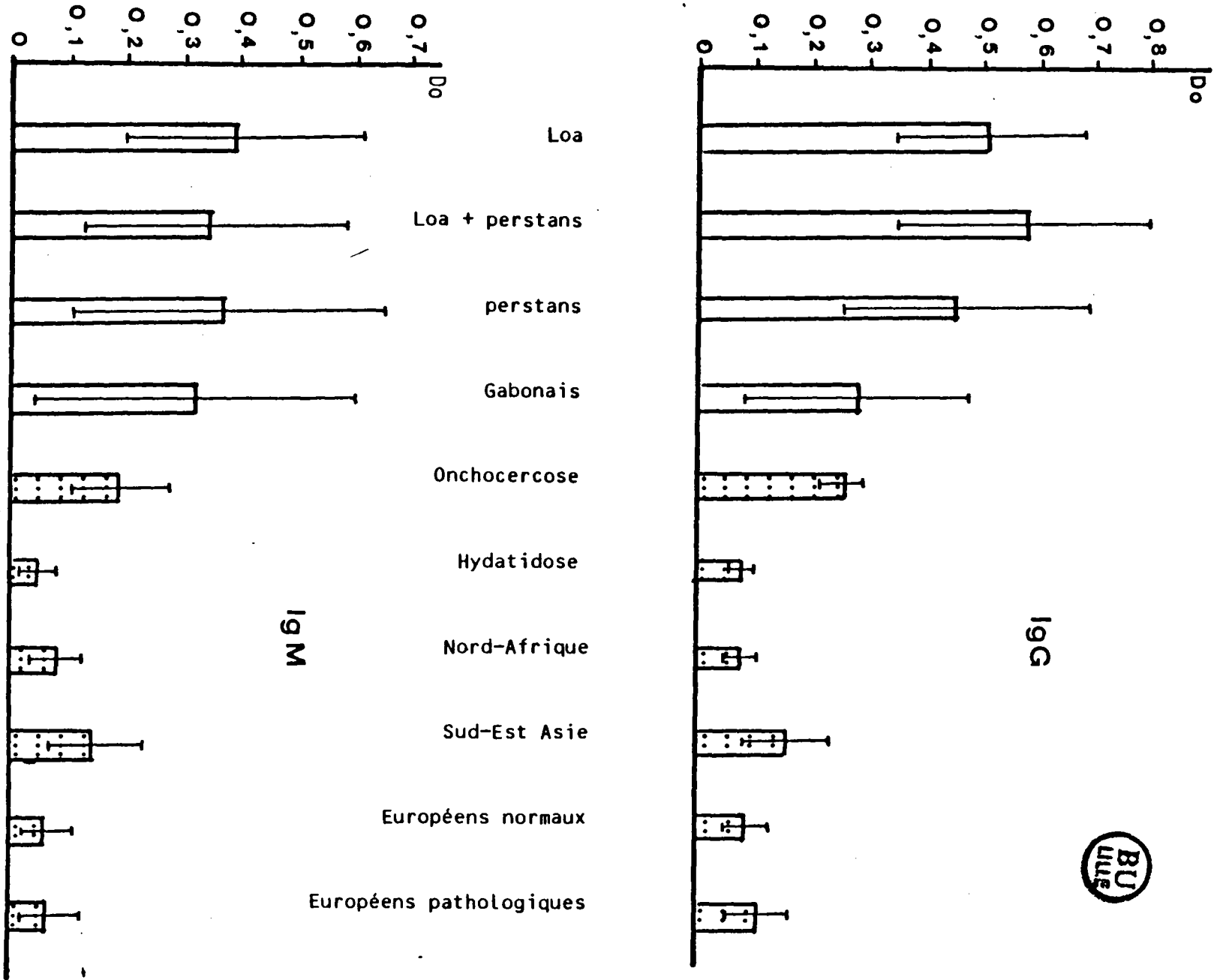


fig. 25 : Résultats globaux Ag S3

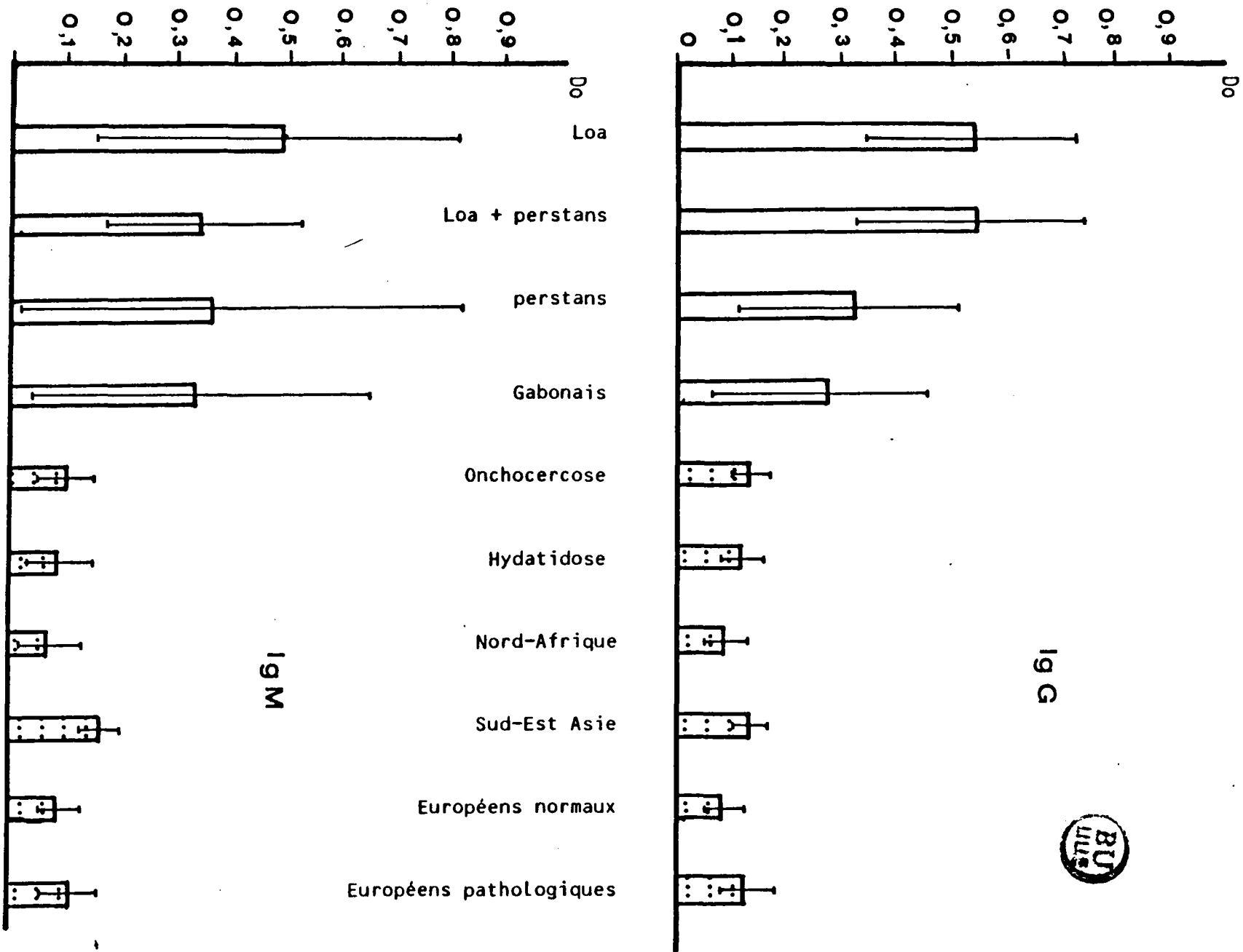


fig. 26: Résultats globaux Ag M3

sommes partis de l'hypothèse que tous les sujets ayant une microfilarémie décelable à l'examen direct devaient posséder des anticorps de nature IgG, car nous savons que les microfilarémies ne sont décelables que 1 an à 1 an et demi après l'infestation (77), et ce temps est largement suffisant à la production d'anticorps de nature IgG. Pour les anticorps IgM, nous ne connaissons pas la durée de synthèse de ce type d'anticorps. Aussi, avons nous pris comme critère de base le même que pour les anticorps IgG. Un examen rapide des résultats nous a permis d'exclure de la série "sujets positifs" deux sérums qui titraient respectivement 0,151 et 0,142 en IgG, 0,148 et 0,128 en IgM. Le bien fondé de cette exclusion sera développé au niveau de la discussion.

2.5.1.1- Antigènes métaboliques

Au Tableau XIV, nous présentons les résultats obtenus pour l'ensemble des sujets vivant en zone d'endémie filarienne avec Ag M3. La colonne "extrême" indique les densités optiques les plus fortes et les plus faibles observées. La colonne " \bar{x} " indique la moyenne de N valeurs observées. La colonne "t" représente le calcul de comparaison des moyennes par rapport aux sujets ayant une microfilarémie à Loa loa décelable à l'examen direct et la colonne "p" indique la signification du test t.

SERUMS	N	IgG				IgM			
		EXTREMES	\bar{X}	t	p	EXTREMES	\bar{X}	t	p
LOA	106	0,310 - 1,820	0,543	—		0,114 - 1,369	0,488		
LOA PERSTANS	46	0,302 - 1,758	0,545			0,123 - 0,825	0,353		
PERSTANS	108	0,090 - 0,935	0,318	9,7	1.10^{-7}	0,050 - 1,832	0,369	2,45	0,02
GABONAIS	192	0,071 - 1,169	2,68	13,06	1.10^{-9}	0,004 - 1,392	0,348	3,81	$1,10^{-4}$

TABLEAU XIV - VALIDITE Ag METABOLIQUE

Extrêmes : valeur la plus faible et la plus forte de chaque groupe

\bar{x} = moyenne

t = Test de comparaison des moyennes par rapport aux porteurs de microfilaires Loa loa

p = signification

SERUMS	N	IgG				IgM			
		EXTREMES	\bar{X}	t	p	EXTREMES	\bar{X}	t	p
LOA	106	0,235 - 1,018	0,517	—		0,023 - 0,948	0,396		
LOA PERSTANS	46	0,312 - 1,147	0,586			0,036 - 1,232	0,355		
PERSTANS	108	0,112 - 0,903	0,468	1,46	NS	0,002 - 1,580	0,384	0,087	NS
GABONAIS	192	0,048 - 1,096	0,281	11,69	1.10^{-9}	0,009 - 1,209	0,324	2,98	0,01

TABLEAU XV - VALIDITE Ag SOMATIQUE

Extrêmes = valeur la plus faible et la plus forte de chaque groupe

\bar{X} = moyenne

t = test de comparaison des moyennes par rapport aux porteurs de microfilaries Loa loa

p = signification

2.5.1.2.- Antigènes somatiques

Identiquement, nous avons présenté au Tableau XV les résultats obtenus avec Ag S3. Les deux mêmes sérums ont été exclus de la série des sujets porteurs de microfilaires Loa loa. Ces sérums titrent respectivement 0,128 et 0,128 avec l'antiglobuline anti-IgG, et 0,096 et 0,198 avec l'antiglobuline anti-IgM.

2.5.2.- Etude de la spécificité

2.5.2.1.- Etude avec des sérums de contrôle négatif

2.5.2.1.1.- Antigènes métaboliques

SERUMS ETUDIES	EFFECTIF	IgG		IgM	
		VALEURS EXTREMES	MOYENNE	VALEURS EXTREMES	MOYENNE
Onchocercose	24	0,055 - 0 178	0,137	0,04 - 0,195	0,112
Hydatidoses	10	0,098 - 0,170	0,119	0,000 - 0,198	0,092
Nord-Africains	15	0,045 - 0,176	0,092	0,001 - 0,165	0,074
Asie du Sud-Est	7	0,133 - 0,199	0,146	0,095 - 0,205	0,165
Européens normaux	30	0,018 - 0,139	0,088	0,024 - 0,141	0,081
Européens pathologiques	64	0,049 - 0,334	0,122	0,002 - 0,309	0,076

TABLEAU XVI - SERUMS DE CONTROLE Ag M3

2.5.2.1.2.- Antigènes somatiques

SERUMS ETUDIES	EFFECTIF	IgG		IgM	
		VALEURS EXTREMES	MOYENNE	VALEUR EXTREMES	MOYENNE
Onchocercoses	24	0,203 - 0,321	0,268	0,92 - 0,432	0,194
Hydatidoses	10	0,052 - 0,099	0,082	0,028 - 0,121	0,049
Nord-Africains	15	0,046 - 0,176	0,0865	0,001 - 0,148	0,072
Asie du Sud-Est	7	0,079 - 0,279	0,153	0,071 - 0,288	0,148
Européens normaux	30	0,001 - 0,151	0,088	0,002 - 0,171	0,060
Européens pathologiques	64	0,021 - 0,418	0,103	0,012 - 0,259	0,070

TABLEAU XVII - SERUM DE CONTROLE Ag S3

2.5.2.2.- Recherche d'une réaction croisée avec Dipetalonema perstans

A partir de ce paragraphe, et jusqu'à celui s'intéressant aux corrélations entre les différents antigènes et les différentes immunoglobulines, nous exploitons uniquement les résultats obtenus avec Ag M3. En effet, ces résultats sont bien supérieurs à ceux obtenus avec Ag S3 (Cf. "Discussion").

La population vivant en zone d'endémie peut être classée en quatre catégories vis-à-vis de Loa loa :

- 1) Microfilarémie positive - anticorps positif
- 2) Microfilarémie positive - anticorps négatif
- 3) Microfilarémie négative - anticorps positif
- 4) Microfilarémie négative - anticorps négatif.

Cette même population peut être classée en deux groupes vis-à-vis de Dipetalonema perstans :

- 1) Microfilarémie positive
- 2) Microfilarémie négative.

En partant de l'hypothèse qu'il n'existe pas de réaction croisée de Ag M3 vis-à-vis de Dipetalonema perstans, les deux populations de Dipetalonema perstans doivent se répartir identiquement dans les quatre populations de Loa loa.

L'examen des résultats obtenus avec l'antiglobuline anti-IgG montre que tous les porteurs de microfilaires Loa loa ont des valeurs supérieures à 0,302 (exception faite des deux "faux négatifs" déjà mentionnés (Cf. p.118 "Validité de la technique"). Nous pouvons, dans un premier temps, fixer le seuil de positivité à la valeur la plus faible des témoins positifs, soit 0,302. De même, en examinant les résultats obtenus à partir des sérums de contrôle, nous notons deux sujets Européens ayant respectivement 0,318 et 0,334 de Do, alors que la valeur la plus forte venant après est à 0,205. Nous

considérons ces deux sérums comme étant de "faux positifs". Nous montrerons le bien fondé de cette exclusion au chapitre de la Discussion. Ainsi, en considérant les témoins négatifs, nous pouvons fixer le seuil de positivité à 0,199.

Une analyse de KHI^2 des populations avec et sans microfilaires Dipetalonema perstans par rapport à leur appartenance aux 4 groupes Loa loa, effectuée en fixant le seuil de positivité à 0,199, montre une différence significative (Tableau XIX) entre les deux populations. La même analyse, effectuée en fixant le seuil à 0,302, montre une différence non significative. Cela veut dire que le seuil doit être fixé à la valeur la plus faible des témoins positifs pour avoir un diagnostic étiologique sûr, et, cela signifie également qu'il existe une faible réaction croisée de Ag M3 avec Dipetalonema perstans.

	μf <i>Loa loa</i> + Anticorps +	μf <i>Loa loa</i> - Anticorps +	μf <i>Loa loa</i> - Anticorps -
μf <i>perstans</i> +	46	60	48
μf <i>perstans</i> -	106	74	118

Seuil de positivité = valeur la plus forte des négatifs.

$$\chi^2 = 9,27 \quad ; \quad p = 0,01$$

μf = microfilaires

μf <i>perstans</i> +	46	38	70
μf <i>perstans</i> -	106	71	119

Seuil de positivité = valeur la plus faible des positifs.

$$\chi^2 = 2,71 \quad ; \quad NS$$

μf = microfilaires

TABLEAU XIX - REACTION CROISEE AVEC D. PERSTANS
(Antiglobuline Anti-IgG)

Avec l'antiglobuline anti-IgM, le seul seuil de positivité possible est la valeur la plus forte des témoins négatifs, soit 0,205 (les deux "faux témoins" déjà cités sont exclus). En faisant le test de KHI², comme précédemment, nous obtenons une valeur de 2,71 avec un degré de liberté égal à 3, ce qui montre que les populations ne diffèrent pas significativement, et nous concluons que la réaction croisée avec Dipetalonema perstans n'est pas décelable avec l'antiglobuline anti-IgM. Ceci nous indique la faiblesse de cette réaction croisée.

2.5.2.3.- Analyse globale de la population vivant en zone d'endémie

En partant des seuils de positivité définis au paragraphe précédent, nous présentons, au Tableau XX, les effectifs de la population vivant en zone d'endémie filarienne à Loa loa.

Nous tirons de ce tableau quelques conclusions :

- 98,7 % des porteurs de microfilaries Loa loa ont des anticorps de nature IgG.
- 79,8 % de cette même population ont des anticorps de nature IgM.
- 44,3 % de la population n'ayant pas de microfilaries ont des anticorps de nature IgG.
- 52,3 % de cette population ont des anticorps de nature IgM.
- 24,1 % de la population n'ayant pas de microfilaries et n'ayant pas d'anticorps de nature IgG ont des anticorps de nature IgM.

Les interprétations de ces données sont faites au chapitre de la Discussion.

Anticorps Microfilaires	IgG +		IgG -		Total
	IgM +	IgM -	IgM +	IgM -	
<i>Loa loa</i> +	87	19	0	2	108
<i>Loa loa</i> + <i>D. perstans</i> +	36	10	0	0	46
Loa-loa +	123	29	0	2	154
Négatif	67	7	30	88	192
<i>D. perstans</i> +	51	9	10	38	108
Loa-loa -	118	16	40	126	300

TABLEAU XX : RESULTATS GLOBAUX DE LA POPULATION
VIVANT EN ZONE D'ENDEMIE

2.5.2.4.- Corrélations

Il nous a paru intéressant d'étudier cas par cas les résultats observés à partir des différents antigènes utilisés et des différentes immunoglobulines employées, ceci dans le but de voir s'il existe une relation entre les anticorps de nature IgG et les anticorps de nature IgM d'une part, et de voir si les antigènes métaboliques et les antigènes somatiques analysent le même phénomène. Ces résultats sont présentés au Tableau XXI.

	Effectif	Métabolique IgG Métabolique IgM			Somatique IgG Somatique IgM			Métabolique IgG Somatique IgG			Métabolique IgM Somatique IgM		
		R	t	p	R	t	p	R	t	p	R	t	p
<i>Loa loa</i> +	108	0,156	1,63	NS	0,185	1,94	NS	0,914	23,19	< 0,001	0,889	19,99	< 0,001
<i>Loa</i> + <i>D. perstans</i> +	46	0,134	0,89	NS	0,258	1,77	NS	0,818	9,43	< 0,001	0,888	12,81	< 0,001
<i>D. perstans</i> +	108	0,151	1,58	NS	0,184	1,93	NS	0,769	12,38	< 0,001	0,819	14,69	< 0,001
Gabonais -	102	0,132	1,83	NS	0,133	1,85	NS	0,930	34,88	< 0,001	0,891	27,05	< 0,001
Onchocercose	24	0,363	1,82	NS	0,276	1,34	NS	0,204	0,98	NS	0,325	1,61	NS
Hydatidose	10	0,489	1,59	NS	0,458	1,46	NS	0,435	1,37	NS	0,381	1,16	NS
Nord-Africains	15	0,221	0,82	NS	0,312	1,18	NS	0,334	1,27	NS	0,318	1,21	NS
Asie du Sud-Est	7	0,410	1,00	NS	0,384	0,92	NS	0,521	1,36	NS	0,492	1,26	NS
Européens normaux	30	0,287	1,58	NS	0,282	1,56	NS	0,262	1,44	NS	0,277	1,52	NS
Européens pathologiques	64	0,215	1,65	NS	0,191	1,53	NS	0,217	1,74	NS	0,188	1,51	NS

TABLEAU XXI : CORRELATIONS

r = coefficient de corrélation

t = test de Student

p = signification

Nous concluons qu'il n'existe aucune relation significative entre les anticorps de nature IgG et les anticorps de nature IgM. Par contre, les antigènes somatiques et métaboliques analysent le même phénomène. En effet, les analyses de corrélation faites sur la population vivant en zone d'endémie montrent une relation étroite ($p < 0,001$) alors que les populations témoins montrent un indice non significatif.

2.5.2.5.- Limites de la réaction

Au cours de toute notre étude, nous avons dosé systématiquement les positifs I et II, et les négatifs I et II. Ainsi, nous avons effectué 16 fois le dosage de chacun de ces sérums, avec des antigènes issus de trois prélèvements différents. Au Tableau XXII, sont indiquées les moyennes et les écarts types de chacun des sérums.

Antigène	Immuno-globuline	POSITIF I		POSITIF II		NEGATIF I		NEGATIF II	
		\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
Ag M3	IgG	0,628	0,031	0,087	0,029	0,103	0,025	0,097	0,023
Ag M3	IgM	0,499	0,032	1,021	0,036	0,102	0,023	0,087	0,021
Ag S3	IgG	0,591	0,053	0,703	0,053	0,156	0,031	0,179	0,043
Ag S3	IgM	0,569	0,028	0,768	0,035	0,141	0,029	0,183	0,038

TABLEAU XXII : LIMITES DE LA REACTION E.L.I.S.A.

\bar{X} = moyenne des 16 dosages effectués

s = écart type

Nous pouvons dire, à l'issue de cette étude, que quelle que soit la source d'antigène (après contrôle des concentrations optimales d'antigènes et d'anticorps), et quel que soit le sérum étudié, la déviation standard de notre système E.L.I.S.A. est, au maximum, de 0,053 en valeur absolue de Do.

3.- DISCUSSION

Le choix des adjuvants aux tampons nous posait, en début d'étude, quelques difficultés. En effet, nous n'arrivions pas à obtenir un blanc sérum (incubation des sérums positifs et négatifs en l'absence d'antigène) correct en utilisant systématiquement du tween 20 dans tous les tampons, comme préconisé par beaucoup d'auteurs. Dans notre première étude, les tampons d'incubation des sérums et des conjugués ont été supplémentés par le tween 20 à une concentration finale de 1 %. Il ressort que les tampons de lavage ne doivent pas contenir de tween et que le "bruit de fond" est considérablement diminué si les tampons d'incubation contiennent de la gélatine à la concentration finale de 0,5 % ou du sérum humain normal à la concentration finale de 1 % (Tableau VI).

En analysant comparativement des sérums négatifs et positifs, en présence et en l'absence d'antigène, les meilleurs résultats sont obtenus en incorporant, dans les tampons d'incubation, de la gélatine (0,5 % en concentration finale) et du Tween 20 (1 % en concentration

finale), et en utilisant les tampons de rinçage sans adjuvant (Tableau VII).

La méthode utilisée pour déterminer les concentrations optimales d'anticorps et d'antigènes est une méthode classique de dosage en palier utilisée pour beaucoup de réactions immunologiques.

A la lecture des courbes (Fig. 21 à Fig. 24), nous déterminons, pour les deux types d'antigènes, le 1/200 comme étant la dilution de sérum à utiliser. En effet, quel que soit le sérum utilisé, la valeur obtenue en l'absence d'antigène (blanc sérum) est faible partout ($D_0 < 0,150$). En présence d'antigène, les différences entre les témoins positifs et négatifs sont significatives, avec des valeurs des témoins négatifs toujours inférieures à 0,250.

Le choix de la concentration d'antigènes répond à plusieurs critères. Tout d'abord, les quantités d'antigènes recueillis ne peuvent être que minimes, et il faut choisir les concentrations les plus faibles ayant une réponse significative, mais il faut que cette concentration soit suffisante pour donner un écart notable entre les témoins positifs et les témoins négatifs. Pour Ag M3, la concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$ apparaît à la dilution choisie comme donnant une réponse suffisante. De plus, on note à cette concentration une linéarisation de la courbe, ce qui indique qu'une concentration plus forte

en antigènes n'amène pas proportionnellement un résultat meilleur (Fig. 23 et 24). Pour l'antigène Ag S3, ce phénomène n'apparaît qu'à 4 µg/ml (Fig. 21 et 22).

Dans la littérature, les concentrations d'antigènes et les dilutions sériques utilisées en technique E.L.I.S.A. varient énormément d'un auteur à un autre ; chaque système demande une étude préalable pour déterminer les rapports adéquats. Toutefois, nous notons que les concentrations d'antigènes sont toujours inférieures à celles utilisées pour les autres réactions immunologiques (exception faite de la radioimmunologie où les doses sont comparables). Cette constatation confirme la sensibilité de la technique.

Chaque fois que nous avons changé de source d'antigène, le même dosage en palier a été effectué, et nous sommes toujours arrivés aux mêmes conclusions.

Pour analyser les sérums, nous avons utilisé une méthode de lecture en point terminal sur une dilution de sérum. Bien que la révélation de la réaction E.L.I.S.A. soit une réaction enzymatique, la lecture de la cinétique de la réaction n'apporte aucun résultat complémentaire (6). Il est évident que pour une analyse précise d'un sérum, il est préférable d'utiliser plusieurs dilutions (54). En effet, c'est suivant une sinusoïde et non sur une droite que se répartissent les Do obtenues à partir de dilutions sériques successives (24). Toutefois,

dans une étude comme la nôtre, où le but recherché est purement qualitatif, la lecture sur une dilution est suffisante.

A la vue des résultats obtenus, nous confirmons que les variations entre sérums et entre manipulations ne sont pas proportionnelles à la valeur de chaque sérum, mais constantes en densité optique. Nous pouvons conclure qu'en moyenne la précision de la technique est de 0,030 en Do. Après analyse de l'ensemble des valeurs trouvées sur les témoins dosés systématiquement (Tableau XXII), nous avons vu que l'écart maximum d'une valeur pour un sérum donné est de 0,053 en Do. Cette conclusion est confirmée par un autre calcul portant sur l'ensemble des sérums de contrôle négatif. Le calcul des déviations standards sur ces 150 sérums donne respectivement 0,025 et 0,029 pour les IgG et les IgM avec l'antigène A gM3, et les moyennes des résultats sont respectivement 0,120 et 0,090. Nous pouvons alors calculer l'intervalle de confiance au risque 99 % soit $\pm 0,075$, et l'intervalle de confiance au risque 99 % pour les sérums positifs I et II et négatifs I et II est de $\pm 0,078$ (déviations standard = 0,030). Nous pouvons affirmer qu'au risque 99 %, les valeurs observées ne s'écartent pas de $\pm 0,08$ des valeurs réelles.

Ce calcul nous permet aussi de conclure qu'au risque 99 % les sérums de contrôle négatifs doivent avoir une valeur inférieure à 0,250 et que les positifs doivent avoir une valeur supérieure à 0,325. Cette simple analyse confirme le bien fondé de l'exclusion

dans le calcul des seuils des deux "faux positifs", et des deux "faux négatifs". En outre, pour plus de précision, nous pouvons considérer que toute valeur supérieure à 0,325 est considérée comme positive, toute valeur inférieure à 0,250 comme négative, et toute valeur comprise entre 0,250 et 0,325 comme douteuse ou faiblement positive.

Pour les contrôles de validité et de spécificité de notre méthode, une remarque préliminaire s'impose concernant l'échantillonnage. Les sérums des sujets vivant en zone d'endémie proviennent pour leur grande majorité de consultations prénatales effectuées à la maternité de l'Hôpital Général de Franceville (80 %). Pour 5 % des sujets, il s'agit d'adultes hommes ou femmes venus consulter pour divers symptômes évoquant ou n'évoquant pas une parasitose. Pour les 15 % restants, il s'agit de prélèvements effectués au cours d'une visite systématique pour la médecine du travail. Cet échantillon n'est absolument pas représentatif de la population vivant en zone d'endémie à Loa loa (100 % des sujets sont des adultes et plus de 80 % sont des femmes). Il est donc impossible, à partir de cette étude, de dresser un bilan immunologique de la population Gabonaise vis-à-vis de Loa loa.

Les 192 patients amicrofilaréniques et les 108 patients porteurs de microfilaires D. perstans ne présentent pas de signes cliniques de filariose à Loa loa, mais il est prouvé que chez Loa loa, comme dans

beaucoup de filarioses, la présence de microfilaires et les signes cliniques ne reflètent qu'imparfaitement le taux d'infestation de la population globale (65, 66, 68, 64, 49, 62, 77).

Les 30 sujets Européens normaux sont des personnes arrivées depuis moins de 15 jours au C.I.R.M.F., n'ayant jamais auparavant quitté l'Europe occidentale. Pour la totalité, il s'agit d'adultes des deux sexes.

Les autres sérums de contrôle proviennent du C.N.T.S. de Paris et de l'Unité 42 de l'INSERM (Lille). Ils sont arrivés à Franceville conservés congelés dans la carboglace.

Le choix de ces sérums repose sur le potentiel qu'ils ont à présenter des réactions immunologiques croisées avec Loa loa. Nous n'avons pas pu obtenir des sérums de sujets atteints de Wuchereria bancrofti et cette catégorie manque à notre étude. Toutefois, nous pouvons dire que dans les zones endémiques à Loa loa, les foyers de Wuchereriose sont rares et bien délimités, et donc les risques de confusion entre les deux filarioses sont minimes (42).

Avec l'immunoglobuline anti-IgG et l'Ag M3, nous ne notons aucune différence significative entre les groupes Loa + et Loa-perstans + (moyennes respectivement égales à 0,543 et 0,545). Il n'existe également

aucune différence significative entre le groupe porteur de D. perstans et le Gabonais amicrofilarénique (respectivement 0,369 et 0,348). Par contre, les différences entre le groupe porteur de microfilaires Loa loa avec ou sans association avec D. perstans et le groupe non porteur de microfilaires Loa loa sont très significatives ($\epsilon = 13,805$; $p < 10^{-7}$). Nous montrons ainsi, en première approximation, que la réaction est spécifique de Loa loa, même vis-à-vis d'autres filaires.

En étudiant ces groupes comparativement aux sérums de contrôle, nous constatons que deux sérums ne présentent pas de réponse à l'immunoglobuline anti-IgG, soit un pourcentage de 1,4 % de faux négatifs. De même, nous avons deux sérums de sujets négatifs (1,4 %) qui présentent une réponse aux immunoglobulines IgG. Nous constatons que ces deux sujets sont atteints de leucémie myéloïde chronique.

En utilisant des antigènes hétérologues (Litomosoides carinii et Ascaris suum) dans une réaction E.L.I.S.A., RICHARD-LENOBLE (141) ne retrouve, chez les porteurs de microfilaires Loa loa, seulement 60 % des sujets répondant immunologiquement à une immunoglobuline anti-Ig totale ; le taux de réponse est de 85,7 % chez les sujets atteints cliniquement de Loase. Nos résultats (98,6 % de positifs chez les porteurs de microfilaires Loa loa avec ou sans signes cliniques) montrent l'intérêt à utiliser, dans une réaction E.L.I.S.A., des antigènes homologues.

A l'intérieur du groupe non porteur de microfilaires Loa loa, 134 sérums (44,6 %) possèdent des anticorps de type IgG. Les résultats confirment l'idée reçue que la présence de microfilaires ne reflète que très imparfaitement la prévalence de l'infestation Loa loa. Toutefois, nous ne pouvons pas conclure que ces 44,6 % de sujets amicrofilarémiques ont une loase évolutive car nous ne savons rien de la durée de vie des anticorps antifilariens chez l'hôte infesté. Nous pouvons seulement dire que dans notre échantillon 63 % des individus sont porteurs d'anticorps anti-Loa loa de type IgG.

Avec l'immunoglobuline anti-IgM et l'Ag M3, nous notons que 79,8 % des sujets ayant des anticorps de type IgG ont également des anticorps de type IgM dans le groupe ayant des microfilaires Loa loa, ce qui laisse supposer que la présence des anticorps de type IgM est décelable pendant un temps plus court que la présence des microfilaires. Nous constatons également que dans le groupe ne présentant pas de microfilaires Loa loa, mais ayant un taux d'anticorps de type IgG élevé, 89,5 % ont un taux d'anticorps de type IgM élevé. Dans ce même groupe, nous notons que 24,2 % des sujets qui ne présentent pas d'anticorps de type IgG possèdent des anticorps de type IgM. Si nous admettons que l'apparition des antigènes de type IgM précède l'apparition des anticorps de type IgG, nous pouvons supposer que ces 24,2 % de sujets représentent une population infestée ou ré-infestée récemment.

Concernant l'étude de spécificité avec Ag M3, nous constatons qu'aucune valeur (exception faite des deux "faux positifs" déjà mentionnés) ne dépasse 0,199 de Do, alors que le plus faible des témoins positifs à une Do de 0,302, soit une différence de 49 % entre les deux sérums extrêmes de chaque groupe, ce qui indique une très bonne spécificité de la technique. Ceci est confirmé par le calcul des comparaisons de moyennes par rapport au groupe présentant des microfilaires Loa loa. Le test de student le plus faible concerne la comparaison avec les sangs du Sud-Est Asiatique ou $t = 14,078$ ($p < 0,001$), et ce avec un effectif de 7.

En fixant le seuil de positivité à 0,302 d'une part, et 0,199 d'autre part, et en comparant les effectifs positifs et négatifs chez les porteurs de microfilaires Dipetalonema perstans et chez les non-porteurs de microfilaires Dipetalonema perstans, nous pouvons noter une faible réaction croisée avec l'immunoglobuline IgG. Faisant le même raisonnement avec l'antiglobuline IgM (ici, le seuil de positivité possible est la valeur la plus élevée des témoins négatifs, 0,325), nous ne notons pas cette réaction croisée. Ceci nous permet, en fixant le seuil en IgG à la valeur la plus faible des témoins positifs, et en IgM à la valeur la plus forte des témoins négatifs, d'assurer un diagnostic étiologique spécifique de Loa loa même, où Loa loa et Dipetalonema perstans coexistent, et, de plus, nous prouvons l'hypothèse avancée par quelques auteurs (19) que Dipetalonema perstans produit des réactions immunologiques chez l'hôte infesté, bien que cette filaire soit considérée comme non pathogène.

Si nous appliquons comme valeurs limites celles définies par les déviations standards de l'ensemble des groupes de contrôle, nous obtenons pour le groupe porteur de microfilaires Loa loa, avec ou sans association de Dipetalonema perstans :

- pour l'antiglobuline anti-IgG : 2 négatifs (1,3 %), 9 faiblement positifs (5,8 %), et 143 positifs (92,3 %), et ,
- pour l'antiglobuline anti-IgM : 34 négatifs (22,1 %), 12 faiblement positifs (7,8 %), et 111 positifs (72,1 %).

Ces résultats sont comparables à ceux du tableau XX.

En ce qui concerne l'Ag S3, nous constatons que l'emploi de de telles substances répond aux données déjà acquises, à savoir que les communautés antigéniques des helminthes sont très étroites et ne permettent que difficilement le diagnostic étiologique précis des affections. Ces substances ne peuvent être employées que si Loa loa ne coexiste pas avec d'autres filaires pathogènes. En particulier, en fixant le seuil de positivité à la valeur la plus faible des témoins positifs (0,235), 91 % des sérums d'onchocerquiens et 29 % des sérums du Sud-Est Asiatique possèdent un taux élevé. Si nous fixons le seuil de positivité à la valeur la plus élevée des sérums de contrôle négatifs (0,321), nous avons 32 % des sujets porteurs de Loa loa qui seraient négatifs, soit un pourcentage de positivité à peine plus élevé que celui trouvé avec des antigènes hétérologues (141).

Les analyses de corrélations montrent que les deux types d'antigènes utilisés analysent le même phénomène (les analyses portant sur le même type d'immunoglobuline avec les deux antigènes montrent une liaison significative pour les témoins positifs). De plus, cette analyse montre qu'il n'existe aucune corrélation entre les anticorps de type IgG et de type IgM. Enfin, avec les sérums de contrôle, il n'existe aucune corrélation, ce qui prouve que les valeurs données par les sérums de contrôle ne dépendent pas du sérum mais de la précision de la technique.

CONCLUSION

A partir de notre étude, nous pouvons conclure que :

- Les antigènes isolés sont adaptables à la technique E.L.I.S.A. pour doser les anticorps anti-Loa loa, avec une spécificité très bonne pour les antigènes issus des produits d'excrétion et de sécrétion des microfilaires, et avec des antigènes somatiques une spécificité dépassant celle obtenue des antigènes hétérologues.*

- La technique mise au point possède une bonne reproductibilité à condition de conserver les sérums à + 4°C en présence d'azide de sodium.*

- Elle permet de faire un diagnostic étiologique précis de l'affec-
tion à Loa loa, même dans les zones où coexistent d'autres filarioses,
et les résultats sont interprétables sans difficultés.

TROISIEME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE

CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

L'importance du taux d'infestation à Loa-loa au Gabon (142) et son éventuelle incidence sur le taux de fécondité de ce pays (107) nous a amené à effectuer des études sur cette maladie et à chercher une méthode de diagnostic fiable pour cette parasitose dans le cadre des recherches épidémiologiques et de l'étude des relations immunes foeto-maternelles que nous menons au Centre International de Recherches Médicales de Franceville (C.I.R.M.F.).

Tous les auteurs insistent sur le fait que le diagnostic des maladies parasitaires et, en particulier, des filarioses ne sera vraiment fiable que lorsqu'il fera appel à des antigènes homologues spécifiques. Nous avons été ainsi amenés à rechercher, dans un premier temps, une technologie permettant de recueillir en grand nombre et avec un coefficient de pureté élevé des microfilaires dont les antigènes somatiques ou métaboliques serviraient à la mise au point d'une technique immuno-enzymatique de dosage des anticorps antimicrofilariens.

Le recueil des microfilaires peut se faire aisément à partir du sang des sujets infestés par Loa-loa alors que la récolte de macrofilaires ne peut être accidentelle puisque limitée pratiquement aux exérèses lors du passage du ver sous la conjonctive. De plus il est certain que les désordres immunologiques provoqués par les microfilaires sont plus importants que ceux dus aux macrofilaires. Les réactions brutales

observées lors de la lyse des microfilaires par le traitement à la diéthylcarbamazine en est une conséquence évidente (67, 68, 77).

Les techniques d'isolement des microfilaires utilisées couramment ont des rendements variables (1, 18, 19, 50, 99, 127, 130, 154, 156) et ne permettent pas d'obtenir les parasites dans des conditions de pureté satisfaisante. L'élimination des éléments figurés du sang pose, en effet, un grand problème et il est difficile de ne pas entraîner des antigènes issus du stroma des leucocytes (101).

Après concentration en gradient de Ficoll, la technique que nous utilisons pour l'isolement des microfilaires met à profit la migration naturelle des microfilaires en veine liquide, dans des tubes capillaires dont l'une des extrémités est reliée à une "chambre de migration" contenant un milieu nutritif.

Par rapport aux autres techniques d'isolement de microfilaires, notre méthode originale possède plusieurs avantages. Les microfilaires obtenues sont totalement débarassées des éléments figurés du sang ; seuls quelques thrombocytes restent présents dans le milieu mais leur élimination, par centrifugation différentielle, ne pose aucun problème. L'utilisation d'anticoagulant (E.D.T.A.) évite la formation d'un réseau de fibrine qui gêne la migration des microfilaires. L'emploi du RPMI comme milieu de migration permet une survie de 18 à 24 heures des microfilaires et cette survie permet d'isoler des produits excrétés ou sécrétés par les

microfilaires. Souvent au cours de cette étude nous avons appelé ces produits "antigènes métaboliques" pour raison de simplification, nous pensons que les termes excrétés et sécrétés conviendraient mieux car nous ne connaissons pas le métabolisme exact des microfilaires dans le RPMI. S'il est évident que les microfilaires utilisent les acides aminés contenus dans le milieu (seul le RPMI, riche en aminoacides, permet une survie aussi longue), nous ne connaissons pas, à l'heure actuelle, la nature des produits, libérés dans le milieu, par les microfilaires. Au cours de notre étude nous avons récupéré en moyenne 5 fois plus de matériel antigénique à partir des produits de sécrétion et d'excrétion par rapport au matériel antigénique obtenu à partir des parasites eux-mêmes ; ceci ne veut pas dire que les microfilaires métabolisent cinq fois leur propre poids pendant 24 heures. Nous appuyons ce raisonnement sur les constatations énoncées plus haut, concernant l'origine des produits de sécrétion et d'excrétion, de plus il est évident que la quantité de protéines structurales isolées à partir des parasites ne représente qu'une partie du poids des parasites (130).

L'utilisation de méthodes de diagnostic de plus en plus fines et la complexité des antigènes parasitaires font apparaître la nécessité d'une très bonne qualité des antigènes (21, 29, 132, 133). Les méthodes classiques de purification reposent sur des petites différences physico-chimiques des protéines. La similitude des

des antigènes parasitaires entre eux rend ces méthodes presque toujours imparfaites (29). Alors que les techniques de chromatographie d'affinité amènent toujours des résultats probants. En outre, par le choix du ligand, cette purification peut être parfaitement contrôlée à chaque étape (63).

L'estimation de la concentration en protéines par lecture en UV possède l'énorme avantage de ne pas détruire l'échantillon soumis à analyse. Devant la rareté du matériel antigénique que nous possédons, cette méthode s'est imposée par rapport à toutes les autres. Nous avons eu l'occasion de pratiquer, en parallèle, pour quelques dosages, cette méthode et la méthode de LOWRY (116) utilisant la méthode de Folin. Les résultats obtenus sont assez proches (LOWRY : 450 $\mu\text{g/ml}$; UV : 500 $\mu\text{g/ml}$) ce qui paraît logique puisque les deux techniques analysent le même phénomène (concentration en tyrosine et tryptophane). Tous nos dosages ont été faits comparativement à une gamme de BSA. Les chiffres que nous indiquons ne correspondent pas à un poids réel de protéines mais à une équivalence de DO par rapport à un poids de BSA. Cette façon de procéder est classique en immunologie et reste parfaitement valable si l'ensemble est homogène. De plus, dans notre étude, le but n'est pas d'aboutir, dans un premier temps, à une parfaite connaissance biochimique des protéines isolées et la technique que nous avons utilisée est suffisamment précise pour juger des concentrations à utiliser en

en technique E.L.I.S.A. et dans un protocole de vaccination.

Dès le début de notre travail, nous avons pensé utiliser une technique immunoenzymatique. Les critères de ce choix ont été définis par plusieurs paramètres propres à la technique E.L.I.S.A.

- Cette méthode est peu consommatrice d'antigène (de l'ordre de 0,5 µg par réaction) ce qui permet une purification du matériel antigénique plus grande.

- La technique est d'une faisabilité aisée, sans apport de matériel lourd.

- Les examens peuvent être facilement différés de quelques jours par rapport au prélèvement.

- Les prélèvements sanguins peuvent être minimes sans nécessiter, obligatoirement, une ponction veineuse (recueil sur papier filtre après piqûre au lobe de l'oreille).

Les trois derniers critères font de la technique E.L.I.S.A. une méthode de choix en zone d'endémie parasitaire.

- La technique E.L.I.S.A. est facilement adaptable au dosage des antigènes circulants ce qui semble intéressant en épidémiologie.

- Enfin, la méthode peut s'appliquer aux essais en grande série et donc répond parfaitement aux données de l'épidémiologie d'une part et d'autre part en fait une méthode de choix pour l'analyse des anticorps monoclonaux produits par hybridation des cellules de myélome et ainsi aboutir à une meilleure connaissance des antigènes parasitaires.

Le choix de la technique utilisée (microplaques, tampons, enzyme de couplage,...) a été fait à partir de l'étude bibliographique et de nos essais personnels. Le seul paramètre à ne pas être classique est l'absence d'agent mouillant dans les tampons de lavage (pages 90, 98, 99). Nous supposons que ce fait est dû à la qualité de l'eau que nous utilisons.

Les résultats des essais faits en double exemplaire permettent de conclure qu'un seul examen par sérum est largement suffisant (page 111 ; test epsilon intra-essais toujours inférieur à 1,20).

Les résultats sont exprimés à partir d'une seule dilution de sérum. Ce type d'analyse nous est imposé par le fait que le but de notre étude n'est pas d'aboutir à un dosage précis de la concentration en anticorps mais plus d'obtenir une réponse de type tout ou rien. C'est-à-dire : y a-t-il ou n'y a-t-il pas d'anticorps ?

Le choix de la dilution est obtenu par les analyses comparatives des concentrations d'antigènes et d'anticorps (fig : 21, 22, 23, 24). Il est évident sur ces figures que la dilution 1/200 s'impose. En effet, à cette dilution l'ensemble des sérums a une réponse faible lorsqu'ils sont testés sans antigène (toujours $< 0,200$) et les témoins négatifs sont toujours faibles quelle que soit la concentration d'antigène utilisé.

Le choix de la concentration d'antigènes est indiqué par le moment

où la courbe s'infléchit, ce phénomène s'observe, à la dilution choisie, à 4 µg/ml pour Ag S3 et à 2 µg/ml pour Ag M3 ; ce qui signifie qu'une concentration plus grande d'antigènes n'apporte pas une réponse proportionnellement plus élevée.

De cette étude nous tirons une conclusion fondamentale : L'emploi de produits d'excrétion et de sécrétion comme source d'antigènes est bien supérieur à l'emploi des protéines solubles des parasites. Cette remarque est valable tant d'un point de vue quantitatif (5 fois plus de produits purifiés) que qualitatif (98,5 % de positif à l'aide des antigènes métaboliques contre 68 % avec les antigènes somatiques).

Nous pouvons envisager plusieurs prolongements à ce travail dont certains sont déjà en cours de réalisation au C.I.R.M.F.

- A partir des immuns sérums produits chez le lapin, nous envisageons la mise au point d'une technique de dosage des antigènes circulants par l'application d'une méthode E.L.I.S.A. "double anticorps" (fig 2 ; page 27).
- Les antigènes purifiés pourront servir d'immunogènes pour la production d'anticorps monoclonaux obtenus par hybridation de cellules et amener ainsi une meilleure connaissance immunologique de la loase et des interactions éventuelles avec les autres filarioses.
- D'ores et déjà nous avons commencé une analyse biochimique et immunologique des produits sécrétés et excrétés de manière à définir de façon plus précise ces produits.

CONCLUSIONS GENERALES

La mise au point d'une technique immunologique fine pour la recherche d'anticorps antimicrofilaires de Loa loa nous a amené à rechercher, dans un premier temps, les conditions optimales d'isolement des parasites afin d'obtenir le maximum d'antigènes utilisables.

L'intérêt de notre technique d'isolement est qu'elle permet de recueillir, simultanément, des quantités importantes d'antigènes métaboliques et de microfilaires avec un rendement de l'ordre de 90 %.

Nos résultats montrent que ces antigènes métaboliques et somatiques, après purification, sont immunogènes lorsqu'ils sont injectés chez le lapin. De plus, ils sont adaptables à la technique E.L.I.S.A. pour le dosage des anticorps anti-Loa loa dans d'excellentes conditions de spécificité (98,6 %) pour les antigènes issus des produits d'excrétion et de sécrétion, et une spécificité supérieure à celle obtenue avec des antigènes hétérologues, pour les antigènes somatiques.

La technique mise au point possède une bonne reproductibilité et permet de pratiquer un diagnostic précis de l'affection à Loa loa dans une région où sévissent plusieurs filarioses.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABARU, D.E., DENHAN, D.A.
A comparison of the efficiency of nucleopore and millipore filtration systems for detecting microfilariae.
Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 1976, 7, 367-369.
2. AMBROISE-THOMAS, P.
Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence.
Thèse, Sciences, Lyon, 1969, n° 531.- Multigr, 645 p.
3. AMBROISE-THOMAS, P., DAVEAU, C., DESGEORGES, P.T.
Serodiagnostic de l'onchocercose par micro-ELISA : Etude de 450 sérums et comparaison avec l'immunofluorescence.
Document OMS Offset non publié, WHO/ONCHO/80.152, 1980.
4. AMBROISE-THOMAS, P., DESGEORGES, P.T.
L'hémagglutination indirecte dans le serodiagnostic de l'hydatidose. Comparaison avec l'immunofluorescence indirecte et la technique ELISA.
Lyon Med., 1979, 241, 775-779.
5. AMBROISE-THOMAS, P., DESGEORGES, P.T., MONGET, D.
Diagnostic immunoenzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. I. Modalités techniques.
Bull. WHO, 1978, 56, 609-613.
6. AMBROISE-THOMAS, P., DESGEORGES, P.T., MONGET, D.
Diagnostic immunoenzymologique (ELISA) des maladies parasitaires par une microméthode modifiée. II. Résultats pour la toxoplasmose, l'amibiase, la trichinose, l'hydatidose et l'aspergillose.
Bull. WHO, 1978, 56, 797-804.
7. AMBROISE-THOMAS, P., DESGEORGES, P.T.
Le diagnostic immunoenzymologique (ELISA) de l'hydatidose : sa valeur et ses limites.
Document OMS Offset non publié, WHO/HELM/80.3, 1980.
8. ARAMBULO, P.V., WALLS, K.W., BULLOCH, S., KAGAN, I.
Serodiagnosis of human cysticercosis by microplate enzyme linked immunospecific assay (ELISA).
Acta Trop., 1978, 35, 63-68.

9. AVRAMEAS, S., URIEL, J.
Méthodes de marquage d'antigènes et d'anticorps avec des enzymes
et son application en immunodiffusion.
C R Séances Acad. Sci. [III], 1966, **262**, 2543-2545.
10. AVRAMEAS, S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the
conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochemistry, 1969, **6**, 43-52.
11. AVRAMEAS, S., TERNYNCK, T.
Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced
intracellular penetration.
Immunochemistry, 1971, **8**, 1175-1179.
12. AXEN, R., ERNBACK, S.
Chemical fixation of enzymes to cyanogene halide activated poly-
saccharides carriers.
Eur. J. Biochem., 1971, **18**, 351-360.
13. AXEN, R., PORATH, J., ERNBACK, S.
Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides
by means of cyanogen halides.
Nature, 1967, **214**, 1302-1304.
14. BACH, J.F.
Immunisation active.
In : BACH J.F.- Immunologie.- Paris : Flammarion, 1979.- pp. 469-474.
15. BACH, J.F.
Précipitation en milieu gélifié.
In : BACH J.F.- Immunologie.- Paris : Flammarion, 1969.- pp. 292-297.
16. BALSARI, A., POLI, G., MOLINA, V., DOVIS, M., PETRUZELL, E., BONIOLO,
A., ROLLERI, E.
ELISA for toxoplasma antibody detection : a comparison with other
serodiagnosis tests.
J. Clin. Pathol., 1980, **33**, 640-643.

17. BARRIGA, O.O.
Inducers of immunity and its verification.
In : BARRIGA O.O.- The immunology of parasitic infections.-
Baltimore : University Park Press, 1981.- pp. 19-39.
18. BELL, D.R.
Membrane filters and microfilariae : a new diagnostic technique.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 1967, **61**, 220-223.
19. BELL, D.R.
Diagnosis of parasitic diseases by filtration.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1975, **55**, 489-496.
20. BORDENAVE, G.
La préparation d'anticorps purs à l'aide d'immunoabsorbant.
In : FAURE M., DUPOUEY P., MORELEC M.J.- Les techniques de
l'immunofluorescence et les réactions immunoenzymatiques.-
Paris : Maloine, 1977.- pp. 127-139.
21. BOUT, D., FRUIT, J., CAPRON, A.
Application de la chromatographie d'affinité à l'isolement de
fractions antigéniques d'*Aspergillus fumigatus* supportant une
activité chymotrypsique.
C R Séances Acad. Sci. [III], 1973, **276**, 2341-2344.
22. BOUT, D., DUGIMONT, J.C., FARAG, H., CAPRON, A.
Le diagnostic immunoenzymologique des affections parasitaires.
II. Immunologie quantitative (ELISA).
Lille Med., 1975, **20**, 561-566.
23. BOUT, D., DUGIMONT, J.C., FARAG, H., CAPRON, A.
Immunodiagnosis of human parasitic diseases by ELISA.
In : FELDMANN C.- First International Symposium on immuno-enzymatic
techniques.- Amsterdam : North-Holland Publishing Co., 1976.-
pp. 175-182.
24. BULLOCH, S.L., WALLS, K.W.
Evaluation of some the parameters of the enzyme linked immunospecific
assay.
J. Infect. Dis., 1977, **136**, 279-285.

25. BURDEN, D.J., HAMMET, M.C.
Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Fasciola hepatica* in cattle.
Vet. Rec., 1978, **103**, 158-161.
26. CAMPBELL, C.H.
The antigenic role of excretion and secretion of *Trichinella spiralis* in the production of immunity in mice.
J. Parasitol., 1955, **41**, 483-491.
27. CAPRON, A., GENTILLINI, M., VERNES, A.
Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse.
Pathol. Biol., 1968, **16**, 1039-1045.
28. CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A., AFCHAIN, D.
Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite.
Pathol. Biol., 1968, **16**, 121-138.
29. CAPRON, A., BOUT, D., DUGIMONT, J.C.
Apport des méthodes immuno-enzymologiques utilisant des antigènes purifiés au diagnostic spécifique et automatisé des affections parasitaires.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1975, **55**, 443-454.
30. CARLIER, Y., BOUT, D., CAPRON, A.
Application de l'E.L.I.S.A. (Enzyme linked immunosorbent assay) en parasitologie et mycologie.
Rev. Inst. Pasteur (LYON), 1979, **12**, 25-33.
31. CARLIER, Y., BOUT, D., DESSAINT, J.P., CAPRON, A., VAN KNAPEN, E., RUITENBERG, E.J., BERGQUIST, R., HULDT, G.
Evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis.
Bull WHO, 1980, **58**, 99-105.
32. CARME, B., SAINTE-LAUDY, J., BEN ISMAIL, R., BENVENISTE, J., GENTILLINI, M.
Application du test de dégranulation des polynucléaires basophiles aux filarioses humaines pathogènes.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1980, **60**, 271-276.

33. CARROL, S.M., KARTHIGASU, K.T., GROVE, D.I.
Serodiagnosis of human strongyloidiasis by an enzyme linked immunosorbent assay.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1981, 75, 706-709.
34. CARTER, C.E., COLLEY, D.G.
Electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen preparation.
J. Parasitol., 1978, 64, 385-390.
35. CATT, K., TREAGEAR, G.W.
Solid-phase radioimmunosorbent assay in antibody coated tubes.
Science, 1967, 158, 1570-1572.
36. CHANDRA, R., KATIYAR, J.C., KALPANA MURTHY, P., GEORGE, P.A., SEN, A.B.
Brugia malayi infective larval whole worm antigen in the diagnosis of filariasis by skin test.
Indian J. Med. Res., 1978, 68, 61-66.
37. CLEM, T.R., YOLKEN, R.H.
Practical colorimeter for direct measurement of microplate in enzyme immuno assay systems.
J. Clin. Microbiol., 1978, 7, 55-58.
38. COKER-VANN, M.R., SUBIANTO, D.B., BROWN, P., DIWAN, A.R., DESOWITZ, R., GARRUTO, R.M., GIBBS, C.J.Jr., GAJDUSEK, D.C.
ELISA antibodies to cysticerci of *taenia solium* in human populations in New Guinea, Oceania, and Southeast Asia.
Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 1981, 12, 499-505.
39. CONNOR, D.H., NEAFIE, R.C., MEYERS, W.M.
Loiasis.
In : BINFORD C.H., CONNOR D.H.- Pathology of tropical and extraordinary diseases.- Washington : Armed Forces Institute of Pathology, 1976.- pp. 356-359.
40. CROOK, N.E.
A simple apparatus for reading the results of enzyme immuno assays.
Lab. Prat., 1979, 28, 1190-1191.

41. CUATRECASAS, P., WILCHEK, M., ANFINSEN, C.B.
Selective enzyme purification by affinity chromatography.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1968, **243**, 5226-5233.
42. CUATRECASAS, P., ANFINSEN, C.B.
Affinity chromatography.
Methods Enzymol., 1971, **22**, 345-378.
43. CYPESS, R.H., KAROL, M.H., ZIDIAM, J.L., GLIKMAN, L.T., GITLIN, D.
Larva specific antibodies in patients with visceral larva migrans.
J. Infect. Dis., 1977, **135**, 633-640.
44. DAVEAU, C., AMBROISE-THOMAS, P.
Serodiagnostic de l'Onchocercose par micro-ELISA face à des antigènes homologues somatiques et métaboliques (excrétés-sécrétés). Comparaison à l'immunofluorescence indirecte.
Med. Trop., 1982, **42**, 513-519.
45. DEELDER, A.M., KORNELIS, D.
A comparison of IFA and ELISA for the demonstration of antibodies against Schistosome Gut-associated polysaccharide antigen in Schistosomiasis.
Z. Parasitenkd, 1980, **64**, 65-75.
46. DEELDER, A.M., KORNELIS, D., VAN MARCK, E.A., EVELEIGH, P., VAN EGMOND, J.G.
Schistosoma mansoni : characterization of two polysaccharide antigens and immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infection.
Exp. Parasitol., 1980, **50**, 16-32.
47. DEELDER, A.M., STREEFKERK, J.G.
Schistosoma mansoni : immunohistoperoxidase procedure in defined antigen substrate spheres (DASS) system as serologic field test.
Exp. Parasitol., 1975, **37**, 405-410.
48. DEELDER, A.M., RUITENBERG, E.J., KORNELIS, D., STEEFENBERG, R.A.
Schistosoma mansoni : Comparison of the immunoperoxidase techniques, DASS and ELISA, for human diagnosis.
Exp. Parasitol., 1977, **41**, 133-140.

49. DENHAM, D.A.
The diagnosis of filariosis.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1975, **55**, 517-524.
50. DENNIS, D.T., KEAN, B.H.
Isolation of microfilariae : report of a new method.
J. Parasitol., 1971, **57**, 1146-1147.
51. DE SAVIGNY, D.H.
In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method
for the production of toxocara ES antigen for use in serodiagnosis
tests for visceral larva migrans.
J. Parasitol., 1975, **61**, 781-782.
52. DE SAVIGNY, D.H., VOLLER, A., WOODRUFF, A.W.
Toxocariasis : serological diagnosis by enzyme immuno-assay.
J. Clin. Pathol., 1979, **32**, 284-288.
53. DE SAVIGNY, D.H., VOLLER, A.
Comparison of isotopic and non isotopic methods in a model system
for parasite serology.
Int. J. Nucl. Med. Biol., 1980, **7**, 165-171.
54. DE SAVIGNY, D.H., VOLLER, A.
The communication of ELISA data from laboratory to clinician.
J. Immunoassay, 1980, **1**, 105-128.
55. DISSANAYAKE, S., ISMAIL, M.M.
Antigens of *Setaria digitata* : cross reaction with surface antigens
of *Wuchereria bancrofti* microfilariae and serum antibodies of *W.*
bancrofti infected subjects.
Bull. WHO, 1980, **58**, 649-654.
56. DISSANAYAKE, S., ISMAIL, M.M.
ELISA in the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in man :
a technique for reducing cross reactivity.
Bull. WHO, 1980, **58**, 655-657.

57. DISSANAYAKE, S., ISMAIL, M.M.
Antibody determination in diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in man.
Bull. WHO, 1981, **59**, 753-757.
58. DIWAN, A.R., COKER-VANN, M.R., BROWN, P., SUBIANTO, D.B., YOLKEN, R., DESOWITZ, R., ESCOBAR, A., GIBBS, C.J., GAJDUSEK, D.C.
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, **31**, 364-369.
59. ENGVALL, E., JONSSON, K., PERLMANN, P.
Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme labelled antigen and antibodies coated tubes.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, **251**, 427-434.
60. ENGWALL, E., PERLMANN, P.
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) : quantitative assay of IgG.
Immunochemistry, 1971, **8**, 871-874.
61. ENGWALL, E., PERLMANN, P.
Enzyme linked immunosorbent assay : III Quantitation of specific antibodies by enzyme labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.
J. Immunol., 1972, **109**, 129-135.
62. EVELAND, L.K., YERMAKOV, V., KENNEY, M.
Loa loa infection without microfilaremia.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1975, **69**, 354-355.
63. EVELEICH, J.W.
Techniques and instrumentation for preparative immunosorbant separations.
J. Chromatogr., 1978, **159**, 129-145.
64. FAHEY, J.L., TERRY, E.W.
Ion exchange chromatography and gel filtration.
In : WEIR D.M.- Handbook of experimental immunology / Volume 1 : Immunochemistry.- Oxford : Blackwell Scientific publications, 1978.- pp. 8.1-8.15.

65. FAIN, A.

Notes sur la distribution géographique de la filaire *Loa loa* et des tabanides du genre *Chrysops* au Congo et au Rwanda.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1969, **49**, 499-530.

66. FAIN, A.

Notes sur la distribution géographique de la filariose à *Loa loa* et des tabanides du genre *Chrysops* au Congo et au Rwanda - Addenda et Corrigenda.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1970, **50**, 360-361.

67. FAIN, A., MAERTENS, K.

Notes sur la ponte des microfilaires chez *Loa loa* et sur le degré de maturation des vers en migration.
Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales, 1973, **6**, 737-742.

68. FAIN, A.

Epidémiologie et pathologie de la loase.
Ann. Soc. Belg. Med. Trop., 1981, **61**, 277-285.

69. FARAG, H., BOUT, D., CAPRON, A.

Specific immunodiagnosis of human hydatidose by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).
Biomédecine, 1975, **23**, 276-278.

70. FARAG, H., BARAKAT, R.M.R.

The enzyme linked immunosorbent assay in the diagnosis of human bilharziosis.
Tropenmed. Parasitol., 1978, **20**, 12-14.

71. FELGNER, P.

Antibody activity in stick-ELISA as compared to other quantitative immunological tests in sera of Echinococcosis cases.
Tropenmed. Parasitol., 1978, **29**, 417-422.

72. FERREIRA, A.W., CALDINI, A.L.M., HOSHINO-SHIMIZUI, S., CAMARGO, M.E.

Immunoenzymatic assay for the detection of *Schistosoma mansoni* antigens in serum of mice harbouring bisexual and unisexual light-worm infection.
J. Helminthol., 1979, **53**, 189-194.

73. FIFE, E.H.
Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases.
Exp. Parasitol., 1971, 30, 132-163
74. FUCHS, S., SELA, M.
Immunoabsorbents.
In : WEIR D.M.- Handbook of experimental immunology / Volume 1 :
Immunochemistry.- Orford : Blackwell Scientific Publications, 1978.-
pp. 10.1-10.6.
75. GARIN, Y. LANGUILLAT, G., IVANOFF, B., LARIVIERE, M.
A new method for isolation of live microfilariae from blood.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1982, 76, 83-84.
76. GARVEY, J.S., CREMER, N.E., SUSSDORF, D.H.
Isolation of immunoglobulin, antibodies and their subunits.
In : GARVEY J.S., CREMER N.E., SUSSDORF D.H.- Methods in immunology.-
Reading (MA) : W.A. Benjamin, Inc., 1977.- pp. 215-270.
77. GENTILLINI, M., DUFLO, B.
Filarioses.
In : Médecine Tropicale.- Paris : Flammarion, 1982.- pp. 173-195.
78. GLICKMAN, L.T., SCHANTZ, P.M., DOMBROSKE, R., CYPESS, R.H.
Evaluation of serodiagnostic tests for visceral larva migrans.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1978, 27, 492-498.
79. GOUSSARD, B., GARIN, Y., IVANOFF, B.
Loa loa : a method for isolation of microfilariae from blood with
production of metabolic antigen.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (soumis).
80. GOUSSARD, B., IVANOFF, B., BEVILLE, G., GARIN, Y.
Aspect actuel de la technique ELISA appliquée au diagnostic sérolo-
gique des maladies parasitaires. I. Technologie.
Pathol. Biol. (soumis).
81. GOUSSARD, B., IVANOFF, B., BEVILLE, G., GARIN, Y.
Aspect actuel de la technique ELISA appliquée au diagnostic sérolo-
gique des maladies parasitaires. II. Sérodiagnostic des parasitoses.
Résultats.
Pathol. Biol. (soumis).

82. GRAIG, P.S., RICKARD, M.D.
Evaluation of "crude" antigen prepared from *Taenia saginata* for serological diagnosis of *T. saginata* cysticercosis in cattle using the ELISA.
Z. Parasitenkd, 1980, 6, 287-297.
83. GRELCH, H., HORCHVER, F.
Comparative studies on the serodiagnosis of bovine fascioliasis using the indirect immunofluorescence and immunoperoxidase test (ELISA).
Berl. Munch. Tierarztl. Wochenscke, 1977, 90, 332-335.
84. GRUNTZIG, J., JENNES, B.
Historical note on *Loa loa* : a reinterpretation.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1977, 26, 679-683.
85. GUYON, J.
Sur un nouveau cas de filaire, sous conjonctive, ou *Filaria oculi* des auteurs, observé au Gabon (Côte occidentale d'Afrique).
C R Séances Acad. Sci., 1964, 59, 743-748.
86. HAMILTON, R.G., HUSSAIN, R., OTTESEN, E.A., ADKINSON, N.F.Jr.
The quantitation of parasite specific human IgG and IgE in sera : evaluation of solid phase RIA and ELISA methodology.
J. Immunol. Methods, 1981, 44, 101-114.
87. HASSAN, F., ABDEL-WAHAB, M.F., NOSSEUR, A., SEDEEK, S., SHEHATA, A., MASOOD, M.A.
Evaluation of ELISA in immunodiagnosis of Schistosomiasis.
J. Trop. Med. Hyg., 1980, 82, 3-7.
88. HEIDE, K., SCHWICK, M.G.
Salt fractionation of immunoglobulins.
In : WEIR D.M.- Handbook of experimental immunology / Volume 1. : Immunochemistry.- Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1978.- pp. 7.1-7.11.
89. HILLYER, G.V., GOMEZ de RIOS, I.
The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of schistosomiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, 28, 237-241.

90. HILLYER, G., KAGAN, I.
New advances in the immunodiagnosis of parasitic infection.
I. The ELISA.
Bull. Assoc. Med. PUERTO-RICO, 1979, **71**, 366-377.
91. HILLYER, G.V., SANTIAGO DE WEIL, N.
Use of immunologic techniques to detect chemotherapeutic success
in infection with *Fasciola hepatica*. II. The ELISA infected rats
and rabbits.
J. Parasitol., 1979, **75**, 680-684.
92. HILLYER, G.V., RUIZ TIBEN, E., KNIGHT, W.B., GOMEZ DE RIOS, I.,
PELLEY, R.P.
Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni* : comparison
of ELISA, radioimmunoassay and precipitation tests performed with
antigens from eggs.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, **28**, 661-669.
93. HILLYER, G.V., RAMZY, R.M.R., EL ALAMY, M.A., CLINE, B.L.
Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma haematobium* and
Schistosoma mansoni in man.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, **29**, 1254-1257.
94. HILLYER, G.V., ROSSY, M.
The ELISA for the detection of antibodies to DNA. Studies with
New-Zealand mice and murine *Schistosomiasis mansoni*.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, **29**, 411-415.
95. HOFFMAN, D.R.
Estimation of serum IgE by an enzyme linked immunosorbent assay
(ELISA).
J. Allergy Clin. Immunol., 1973, **51**, 303-307.
96. HULDT, G., LAGERQUIST, B., PHILLIPS, T., DRAPER, C., VOLLER, A.
Detection of antibodies in *Schistosomiasis* by enzyme-linked
immunosorbent assay.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 1975, **69**, 483-488.
97. IACONA, A., PINI, C., VICARI, G.
Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of
hydatid disease.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, **29**, 95-102.

98. ISMAIL, M.M., JAMES, C., WEBBE, G.
The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of circulating antigen and antibody in *Schistosoma haematobium* infected baboons.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1981, 75, 542-548.
99. JONES, T.C., MOTT, K., PEDROSA, L.C.
A technique for isolating and concentrating microfilariae from peripheral blood by gradient centrifugation.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1975, 69, 243-246.
100. KAGAN, I.G.
Diagnostic, epidemiologic and experimental parasitology : immunologic aspects.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, 28, 429-439.
101. KALIRAJ, P., RAO, K.N., HARINATH, B.C., GHIRNIKAR, S.N.
Immunization studies in rabbits with human filarial parasite *Wuchereria bancrofti*.
Indian J. Exp. Biol., 1978, 16, 994-995.
102. KALIRAJ, P., CHIRNIKAR, S.N., HARINATH, B.C.
Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) for bancroftian filariasis.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1981, 75, 119-120.
103. KALIRAJ, P., CHIRNIKAR, S.N., HARINATH, B.C.
Immunodiagnosis of bancroftian filariasis : comparative efficiency of the indirect hemagglutination test, indirect fluorescent antibody test, and enzyme linked immunosorbent assay done with *Wuchereria bancrofti* microfilarial antigens.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, 30, 982-987.
104. KELSOE, G.H., WELLER, T.H.
Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni* : Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen.
Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 1978, 75, 5715-5717.

105. KHARAT, J., MARINATHI, B.C.
Antibody analysis in human filarial sera by ELISA using *Wuchereria bancrofti* microfilariae culture antigen.
Indian J. Exp. Biol., 1982, **20**, 378-380.
106. KRICKA, L.J., CARTER, T.N.J., BURT, S.M., KENNEDY, J.H., HOLDER, R.L., HALLIDAY, M.F., TELFORD, M.E., WISTOMM, G.B.
Variability in the adsorption properties of microtitre plates used as solid supports in enzyme immunoassay.
Clin. Chem., 1980, **26**, 741-744.
107. LANGUILLAT, G., GARIN, Y., TURSZ, A., BEAUVAIS, B., LARIVIERE, M.
Enquête sur l'étiologie de l'hypofécondité au Gabon Oriental. III. Endémie filarienne (*Loa loa* et *D. perstans*). Fréquences des microfilaires dans les hydrocèles.
Rev. Epidémiol. Santé Publique, 1978, **26**, 273-283.
108. LAZAR, P.B., SCHWARTZ, D.
Corrélation et régression.
In : LAZAR P.B., SCHWARTZ D.- Eléments de probabilité et statistique.- Paris : Flammarion, 1967.- pp. 103-109.
109. LEVINE, D.M., HILLYER, G.V., FLORES, S.I.
Comparison of counterelectrophoresis, the ELISA and KATO fecal examination for diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, **29**, 602-608.
110. LEVY, H.B., SOBER, H.A.
A simple chromatography method for preparation of gamma-globulins.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1960, **103**, 250-255.
111. LOEWY, A.G., SIEKEVITZ, P.
L'absorption de l'ultra-violet.
In : LOEWY A.G., SIEKEVITZ, P.- Biologie Cellulaire.- Paris : Masson, 1974.- p. 117.
112. LONG, E.G., LAWRENCE, M.C., AUGUSTINE, T.
ELISA for *Schistosoma mansoni* infection : durability of blood spots on filter paper.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1981, **75**, 740-741.

113. LONG, G.W., LEWERT, R.M., PELLE, R.P.
Characterisation of the glycoprotein antigens which mediate the Schistosoma japonicum circumoval precipitin reaction.
Infect. Immun., 1981, **34**, 389-396.
114. LONG, G.W., LEWERT, R.M., PELLE, R.P.
Fractionation of Schistosoma japonicum soluble egg antigen glycoproteins by hydrophobic interaction chromatography.
Infect. Immun., 1981, **34**, 397-406.
115. LONG, G.W., YOGORE, M.G., LEWERT, R.M., BLAS, B.L., PELLE, R.P.
Efficacy of purified Schistosoma japonicum egg antigens for ELISA serodiagnosis of human Schistosomiasis japonica : Specificity and sensitivity.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, **31**, 1006-1014.
116. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, **193**, 265-275.
117. LUNDE, M.N., OTTESEN, E.A., CHEEVER, A.W.
Serological differences between acute and chronic Schistosomiasis mansoni detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, **28**, 87-91.
118. LUNDE, M.N., OTTESEN, E.A.
Enzyme-linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.) for detecting IgM and IgE antibodies in human schistosomiasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, **29**, 82-86.
119. MAC LAREN, M.L., LONG, E.A., GOODGAME, R.W., LILLYWHITE, J.E.
Application of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of Schistosoma mansoni infections in St Lucia.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1979, **73**, 636-639.
120. MC MURRAY, C.H., BLANCHFLOWER, W.J.
Multi-channel, probe colorimeter for use with the micro ELISA test which makes use of disposable flat bottom micro haemagglutination plates.
Clin. Chem., 1979, **25**, 570-576.

121. MADWAR, M.A., VOLLER, A.

Serological investigation on patients with Schistosomiasis with special reference to circulating antigen.
Tropenmed. Parasitol., 1977, 28, 57-62.

122. MANGIN

Observation sur un ver trouvé sous la conjonctive à Maribou île de Saint-Domingue.
J. Med. Chir. Pharm. (PARIS), 1770, 338-339.

123. MARCH, J.C., PARIKH, I., CUATRECASAS, P.

A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography.
Anal. Biochem., 1974, 60, 149-152.

124. MARCOULIS, G., GRASBECK, R.

Preliminary identification and characterization of antigen extracts of *Onchocerca volvulus*.
Tropenmed. Parasitol., 1976, 27, 314-322.

125. MATOSSIAM, R.M., Mc LAREN, M.L., DRAPER, C.C., BRADSTREET, C.M. DIGHERO, M.W., KANE, G.J., Mc KINLAY, L.M., RICKARD, M.D.

The serodiagnosis of human hydated disease : 2. Additional studies on selected sera using indirect haemagglutination (IHA), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and defined substrat spheres (DASS).
J. Helminthol., 1979, 53, 287-291.

126. MORELEC, M.J., CAZENAVE, P., AVRAMEAS, J., TERNYNCK, T.H.

Préparation d'anticorps purs à l'aide d'immunoabsorbants - Précisions techniques.
In : FAURE M., DUPOUEY P., MORELEC M.J.- Les techniques de l'immuno-Fluorescence et les réactions immunoenzymatiques.- Paris : Maloine, 1977.- pp. 147-151.

127. MUSCOPLAT, C.C., SCHOSTER, J.V., OSBORNE, C.A., JOHNSON, D.W.

Density gradient separation of lymphocytes eosinophil and microfilariae from blood of dogs infected with *Dirofilaria immitis*.
Am. J. Vet. Res., 1977, 38, 2095-2096.

128. NAKANE, P.K., KAWAOI, A.
Peroxidase labelled antibody. A new method of conjugaison.
J. Histochem. Cytochem., 1974, 22, 1084-1092.
129. NEVA, F.A., GAM, A.A., BURKLE, J.
Comparison of larval antigens in an enzyme linked immunosorbent assay for strongyloidiasis in human.
J. Infect. Dis., 1981, 144, 427-432.
130. OGUMBA, E.O.
Serological investigations with Loa loa antigens.
J. Helminthol., 1972, 46, 241-250.
131. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
Antigènes parasitaires : Memorandum/OMS.
Bull. WHO, 1976, 53, 39-53.
132. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
Le titrage avec immunoabsorbant lié à une enzyme (ELISA).
Bull. WHO, 1977, 55, 557-568.
133. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
L'immunologie de la filariose.
Bull. WHO, 1981, 59, 205-212.
134. OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., LUNDE, M.N., HUSSAIN, R.
Endemic filariasis on a pacific Island. II. Immunologic aspects :
Immunoglobulin, complement and specific antifilarial IgG, IgM
and IgE antibodies.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, 31, 953-961.
135. OUCHTERLONY, O.
Diffusion in gel methods for immunological analysis.
Prog. Allergy, 1962, 5, 1-78.
136. OUCHTERLONY, O., NILSSON, L.A.
Immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
In : WEIR D.M.- Handbook of experimental immunology / Volume 1 :
Immunochemistry.- Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1978.-
pp. 19.1-19.44.

137. PARC, F., RIVIERE, F., ROUX, J., LAIGRET, J.
Méthodes simplifiées de récolte de formes larvaires de *Wuchereria bancrofti* Cobbold (var. *pacifica*) : leur préparation pour l'immuno-fluorescence.
Bull. WHO, 1978, **56**, 305-308.
138. PINON, J.M., GENTILLINI, M.
Etude immunologique des filarioses humaines. Comparaison des tests cellulaires (rosettes, inhibition de la migration des lymphocytes) et des tests sérologiques.
Nouv. Presse Méd., 1973, **2**, 1283-1287.
139. PINON, J.M., SULAHIAN, A., DROPSY, G.
The use of ELIEDA (Enzyme linked immunoelectrodifusion assay) in the studies of humoral antibodies in human Schistosomiasis.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1978, **72**, 492-495.
140. PINON, J.M., SULAHIAN, A., REMY, G., DROPSY, G.
Immunological study of hydatidosis. I. Evaluation of immunoelectrodifusion tests and enzyme linked immunoelectrodifusion assay (ELIEDA) in human hydatidose.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1979, **28**, 318-324.
141. RICHARD-LENOBLE, D., CARME, B., YEBAKIMA, A., KOMBILA, M.Y.
Intérêts et limites de la réaction immunoenzymatique ELISA appliquée à la filariose *Loa loa*.
Med. Mal. Infect., 1980, **10**, 217-221.
142. RICHARD-LENOBLE, D., KOMBILA, M.Y., CARME, B., GILLES, J.C., DELATTRE P.Y.
Prevalence des filarioses humaines sanguicoles au Gabon.
Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales, 1980, **73**, 192-199.
143. RISSING, J.P., BUXTON, T.B., TALLEDO, R.A., SPRINKLE, T.J.
Comparison of two enzyme linked immunosorbent assays for antigen quantitation : direct competition and antibody inhibition.
Infect. Immun., 1980, **27**, 405-410.
144. ROFFI, J., DEROUIN, F., DIALLO, P.B.
Application d'une méthode immunoenzymologique (ELISA) au dépistage de la trypanosomiase africaine à *Trypanosoma brucei gambiense*.
Med. Mal. Infect., 1978, **8**, 9-14.

145. ROFFI, J., LAFABRIE, B., CHOVEL, M., VIALE, M., DIGOUTTE, J.P.
Application du test ELISA au dépistage de l'Onchocercose.
Med. Trop., 1982, 42, 297-306.
146. ROSE, G., BIGUET, J., ROSE, F., D'HAUSSY, R.
Application d'une réaction d'hémagglutination au diagnostic de l'Onchocercose.
Rev. Hyg. Med. Soc., 1966, 14, 383-392.
147. ROTMANS, J.P., MOOIJ, G.W.
Separation and comparative immuno assay (DASS, ELISA) with antigens from adult *Schistosoma mansoni*.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1980, 74, 463-468.
148. ROTMANS, J.P., VAN DER VOORT, M.J., LOOZE, M., MOOIJ, G.W., DEELDER, A.M.
Schistosoma mansoni : use of antigens from excretions and secretions in immuno-diagnosis.
Exp. Parasitol., 1981, 52, 319-330.
149. RUITENBERG, E.J., CAPRON, A., BOUT, D., VAN KNAPEN, F.
Enzyme immuno-assay for serodiagnosis of parasitic infections.
Biomedicine, 1977, 26, 311-314.
150. RUITENBERG, E.J., ETEERENBERG, P.A., BROSI, B.J., BUYS, J.
Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme linked immunosorbent assay.
Bull. WHO, 1974, 51, 108-109.
151. RUITENBERG, E.J., SEKVIS, W.M., BROST, B.S.M.
Some characteristics of a new multiple channel photometer through the plate reading of microplates to be used in ELISA.
J. Clin. Microbiol., 1980, 11, 132-134.
152. RUITENBERG, E.J., VAN KNAPEN, F.
The enzyme linked immunosorbent assay and its application to parasitic infections.
J. Infect. Dis., 1977, Suppl, S 267-S271.

153. SALONEN, E.M., VAHERI, A.
Rapid solid phase enzyme immunoassay for antibodies to viruses and other microbes : Effects of polyethylene glucol.
J. Immunol. Methods, 1981, **41**, 95-103.
154. SANG, H.T., PETITHORY, J.
Techniques de concentration des microfilaries sanguicoles.
Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales, 1963, **56**, 197-206.
155. SAUNDERS, G.C., CAMPBELL, S., SANDERS, W.M., MARTINEZ, A.
Automation and semi-automation of Enzyme Immunoassay Instrumentation.
In : NAKAMURA R.M., DITO, W.R., TUCKER III, E.S.- Immunoassay in the clinical laboratory New York : Alan R. Liss, 1979.- pp. 119-138.
156. SAWYER, T.K., WEINSTEIN, P.P.
Studies on microfilariae of the dog heartworm *Dirofilaria immitis* : separation of parasites from whole blood.
J. Parasitol., 1963, **49**, 39-45.
157. SCHWARTZ, D.
Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
Paris : Flammarion, 1963.
158. SPEISER, F.
Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of filariasis and echinococcosis.
Tropenmed. Parasitol., 1980, **31**, 459-466.
159. STREEFKERK, J.G.M., VAN DER PLOEG, M., VAN DUIJN, P.
Agarose beads as matrices for proteins in cytophotometric investigations of immunoperoxidase reaction.
J. Histochem. Cytochem., 1975, **23**, 243-250.
160. SUZUKI, T., DAMIAN, R.T.
Schistosomiasis mansoni in baboons. IV. The development of antibodies to *Schistosoma mansoni* adult worm, egg, and cercarial antigen during acute and chronic infections.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, **30**, 825-835.

161. TERNYNCK, T.H., AVRAMEAS, J.
Polyacrylamide protein immunoabsorbent prepared with glutaraldehyde.
FEBS Letters, 1971, **25**, 1574-1578.
162. THORSON, R.E.
The relation of the secretions and excretions of the larva of
Nippostrongylus muris to the production of protective antibodies.
J. Parasitol., 1951, **37** (suppl), 18-19.
163. THORSON, R.E.
The use of "metabolic" and somatic antigens.
In : JACHOWSKI.- Immunodiagnosis of helminthic infections.-
Am. J. Hyg. Monographic Serie N° 22, 1963.- pp. 60-67.
164. TRABUC, M.
Application de la technique ELISA au dosage des IgE humaines,
normales et pathologiques.
Thèse, Biochimie, Lyon, 1978.
165. VACCA, L.L., ABRAHAMS, S.J., NATTCHI, N.E.J.
A modified peroxidase antiperoxidase procedure for improved loca-
lisation of tissue antigens : Localisation of substance P in rat
spinal cord.
J. Histochem. Cytochem., 1980, **28**, 297-307.
166. VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NEISCHLAG, E.
A method for producing specific antisera with small doses of
immunogen.
J. Clin. Endocrinol. Metabol., 1971, **33**, 988-991.
167. VAN KNAPEN, F., FRANCHIMONT, J.H., RUITENBERG, R.J., BALDELLI, B.,
BRADLEY, Y., GIRSON, T.E., GOTTAL, C., HENRIKSEN, S.A., KOHLER,
G., SKOUGAARD, N., SOULE, C., TAYLOR, S.M.
Comparison of the ELISA with three other methods for the detection
of *Trichinella spiralis* infection in pigs.
Vet. Parasitol., 1980, **7**, 109-121.
168. VAN KNAPEN, F., FRANCHIMONT, J.H., VERDONK, A.R., STUMPF, J.,
UNDEUTSCH, K.
Detection of specific immunoglobulin (IgG, IgM, IgA, IgE) and total
IgE levels in human Trichinosis by means of the Enzyme linked
immunosorbent assay (ELISA).
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, **31**, 973-976.

169. VAN LOON, A.M., VAN DER VEEN, J.
Enzyme linked immunosorbent assay for quantitation of toxoplasma antibodies in human sera.
J. Clin. Pathol., 1980, **33**, 635-639.
170. VAN WEEMEN, B.K., SCHURS, A.H.
Immuno assay using antigen enzyme conjugates.
FEBS Letters, 1971, **15**, 232-235.
171. VOLLER, A.
The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Theory, technique and applications).
Ric. Clin. Lab., 1978, **8**, 289-298.
172. VOLLER, A., BIDWELL, D.
The enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.). Volume 2 :
A review of recent development with abstracts of microplate applications.
VALE (GUERNSEY, G.B.) : Microsystems Ltd., 1980 (126 pages).
173. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., HULDT, G., ENGWALL, E.
A microplate method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay and its application to malaria.
Bull. WHO, 1974, **51**, 209-211.
174. VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E.
Enzyme immuno-assay for parasitic diseases.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1976, **70**, 98-106.
175. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A., FLECK, D.G., PERKINS, M., OLADEHIN, B.
A microplate enzyme immuno assay for toxoplasma antibodies.
J. Clin. Pathol., 1976, **29**, 150-153.
176. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A., EDWARDS, R.
A comparison of isotopic and enzyme immuno assays for tropical parasitic diseases.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1977, **71**, 431-437.

177. VOLLER, A., DE SAVIGNY, D.
Diagnostic serology of tropical parasitic diseases.
J. Immunol. Methods, 1981, **46**, 1-29.
178. WEBBE, G., JAMES, C., NELSON, G.S., ISMAIL, M.M., SHAW, J.R.
Cross-resistance between *S. haematobium* et *S. mansoni* in baboon.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1979, **73**, 42-54.
179. WEIL, G.J., POWERS, K.G., PARBUONI, E.L., LINE, B.R., FURROW, R.D.,
OTTESEN, E.A.
Dirofilaria immitis. VI. Antimicrofilarial immunity in experimental
filariasis.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, **31**, 477-485.
180. WEILAND, G., SCHWARZHUBER, A.
Investigation on the recognition of visceral larva migrans by the
peroxidase test (ELISA) and by immunofluorescence.
Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr., 1978, **91**, 209-213.
181. WEINSTEIN, P.P.
Excretory mechanisms and excretory products of nematodes : an
appraisal.
In : STAUBER.- Host influence on parasite physiology.- New Branswick :
Rutgers University Press, 1960.- pp. 65-92.
182. WILLIAMSON, A.R.
Isoelectric focusing of immunoglobulins.
In : WEIR D.M.- Handbook of experimental immunology / Volume 1 :
Immunochemistry.- Oxford : Blackwell Scientific Publication, 1978.-
pp. 9.1-9.31.
183. YOGORE, M.G., LEWERT, R.M., BLAS, B.L.
Schistosoma japonica in barrio San Antonio, Basey, Saman, in the
Philippines. V. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) compared
with quantitative stool examination and circumoval precipitin
(COP) test.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 1981, **30**, 1252-1262.

