

N° d'ordre: 391

50376
1989
123

50376
1989
123

UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES de LILLE
FLANDRES ARTOIS

THESE

présentée à l'Université de LILLE I

pour l'obtention du titre de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

option: Biologie

par

Charles LUTSCH



**Les antigènes circulants dans les filarioses lymphatiques
et les schistosomiases humaines:**

**Intérêt diagnostique et pronostique de leur détection par des anticorps
monoclonaux**

Présentée le 30 juin 1989 devant la commission d'examen

| | | | | |
|------------------|--------------|------------|------|----------|
| Membres du Jury: | Président: | Professeur | M. | PORCHET |
| | Examineurs: | Professeur | A. | CAPRON |
| | | Docteur | L. | RAFFENE |
| | Rapporteurs: | Professeur | A. | DHAINAUT |
| | | Professeur | J.P. | DESSAINT |

Ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité mixte INSERM U167-CNRS 624) de l'INSTITUT PASTEUR de LILLE sous la direction du Professeur A. CAPRON

Avec les collaborations de:

M. BARBIER (Hôpital International de l'Université de Paris)

M. CAPRON (INSERM 167-CNRS 624, Lille)

J.Y. CESBRON (INSERM 167-CNRS 624, Lille)

J.P. DESSAINT (INSERM 167-CNRS 624, Lille)

D. HENRY (INSERM 167- CNRS 624, Lille)

P. NIRDE (INSERM 167-CNRS URA 624, Lille)

J.A. NOGUEIRA-QUEIROZ (Université de Fortraleza, Brésil)

K. WANDGI (INSERM167-CNRS 624, Lille)

Xu XIAOYAN (INSERM 167- CNRS 624, Lille)

H. ZAHNER (Justus Liebig Universität, Giessen, RFA)

Avec le soutien financier de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (Vienne), du CNRS, de l'INSERM, du Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

A Anne

A mes parents

A mes maîtres

A toute ma famille et mes amis

en témoignage de mon affection

et de ma profonde reconnaissance

A mon Directeur de Recherches

Monsieur le Professeur A. CAPRON

Membre de l'Académie des Sciences

Au terme de ce travail, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accordé le privilège de travailler au sein de l'équipe de recherche que vous animez.

Soyez assuré de ma profonde estime et de ma sincère reconnaissance.

A mon Président de thèse

Monsieur le Professeur M. PORCHET

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur L. RAFFENE

Votre collaboration m' a été une aide précieuse dans l'aboutissement de ce travail.
C'est avec un plaisir que je vous compte aujourd'hui parmi les membres de ce jury.
Croyez en ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur J.P. DESSAINT

Vous avez suivi ce travail avec grand intérêt. Je vous suis profondément reconnaissant
d'avoir bien voulu examiner ce mémoire et d'avoir accepté de siéger parmi ce jury.
Qu'il me soit permis de vous exprimer toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur A. DHAINAUT

Vous m'avez fait l'honneur d'examiner cette thèse et de participer à ce jury.
Soyez en sincèrement remercié.

A Monsieur le Docteur J.Y. CESBRON

Vous avez guidé avec bienveillance mes premiers pas de chercheur. Par le dynamisme dont vous faites preuve, vous m'avez apporté une aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Je vous en remercie vivement.

A Madame le Docteur M. CAPRON

Je vous remercie pour votre agréable accueil dans votre laboratoire et de m'avoir aidé à initier ce travail.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements :

- aux Docteurs C. DISSOUS, J.M. GRZYCH, M. JOSEPH , A. NOGUEIRA-QUEIROZ, G. OVLAQUE, R. PIERCE, F. VIDAL et K. WANDJI pour l'aide précieuse apportée à ce travail,

- à J.P. GAZET, F. KOYALISSE, et A.M. SCHACHT, dont la compétence technique et le dynamisme ont largement contribué à la réalisation de ce travail,

- à J.L. NEYRINK, pour l'analyse statistique des données,

- à l'ensemble du personnel des secrétariats, du service de documentation et de l'animalerie, pour leur constant dévouement,

- à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

ABREVIATIONS

| | |
|-----------|---|
| AA3-44: | IgM monoclonale de souris anti- <i>Brugia malayi</i> |
| CAA: | Antigène circulant anodique de schistosome |
| CCA: | Antigène circulant cathodique de schistosome |
| DEC: | Diéthylcarbamazine |
| ES: | Excrété/sécrété |
| RIA: | Test radioimmunométrique |
| 2S-ELISA: | "Enzyme linked immunosorbent test" à double site |
| 2S-IRMA: | Test immunoradiométrique à double site |
| 40B1: | IgG3 monoclonale de souris anti- <i>Schistosoma mansoni</i> . |

Les travaux rapportés dans cette thèse ont donné lieu aux publications et conférences suivantes:

PUBLICATIONS:

1. J.A. Nogueira-Queiroz, C. Lutsch, M. Capron, J.P. Dessaint & A. Capron (1986):
Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by a monoclonal antibody. 1. Specificity analysis of a monoclonal antibody with immunodiagnostic capacity.
Clin. Exp. Immunol. **65**, 223-231.
2. C. Lutsch, J.Y. Cesbron, H. Zahner & A. Capron (1987):
Detection of circulating and urinary antigens in *M. natalensis* infected with *B. malayi*, *B. pahangi*, or *L. carinii*. *Parasitol. Res.* **74**, 191-195.
3. C. Lutsch, J.Y. Cesbron, D. Henry, J.P. Dessaint, K. Wandji, M. Ismail & A. Capron (1988): Detection of circulating and urinary antigen in human lymphatic filariasis. Differences in antibody isotypes complexed with the antigen between symptomatic and asymptomatic subjects.
Clin. Exp. Immunol. **71**, 253-260.
4. J.Y. Cesbron, M. Hayasaki, M. Joseph, C. Lutsch, J.M. Grzych & A. Capron (1988) *Onchocerca volvulus*: Monoclonal anti-idiotypic antibody as antigen signal for the microfilaricidal cytotoxicity of Diethyl- carbamazine treated platelets. *J. Immunol.*, **141**, 279-285.
5. C. Lutsch, J.Y. Cesbron, M. Barbier, P. Nirdé, F. Vidal, L. Raffene, F. Ajana, & A. Capron .
Diagnostic value of the assay of circulating antigens in filariasis (soumis à publication).
6. P. Nirdé, C. Lutsch, J.Y. Cesbron & A. capron. Time course and physical properties of ecdysteroids in the biological fluids of vertebrates infected with *Brugia malayi*. (soumis à publication)
7. K. Wandji, J.Y. Cesbron, C. Dissous, D. Taylor, A.Haque, C.Lutsch & A. Capron.
Use of monoclonal antibodies for the characterization of *Onchocerca volvulus* antigens (soumis à publication).

RAPPORTS SCIENTIFIQUES.

1. J.P. Dessaint, J.Y. Cesbron, C. Lutsch, J.-A. Nogueira-Queiroz & A. Capron (1986):
Radioimmunoassays and related procedures in the diagnosis of parasitic infections. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques in Developing Countries. I.E.A & W.H.O., Vienna, August 26-30, 1985. Nuclear Medicine and Related Radionuclide Applications in Developing Countries, 1986, 85-98.
2. J.A. Nogueira-Queiroz, H. Feldmeier, C. Lutsch, J.P. Dessaint & A. Capron (1986):
Circulating and urinary antigen in schistosomiasis (mansoni and hematobium). Detection by a two-site immunoradiometric assay. Rapport I.A.E.A., Research Co-Ordination Meeting on "Nuclear Techniques for Immunodiagnosis of Tropical Parasitic Infections in Asian Countries", Kuala Lumpur (Malaysia). In press.
3. C. Lutsch, J.Y. Cesbron, J.P. Dessaint & A. Capron (1986):
Circulating and urinary antigen in lymphatic filariasis : detection of parasite antigen in asymptomatic patients, and differences in antibody isotypes complexed with the antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. Rapport I.A.E.A. Research Co-Ordination Meeting on Nuclear Techniques for Immunodiagnosis of Tropical Parasitic Infections in Asian Countries. Kuala Lumpur (Malaysia). In press.
4. J.P. Dessaint, J.L. Neyrinck, C. Lutsch & A. Capron (1987):
Radiation-immobilized monoclonal antibody for radioimmunoassay of circulating schistosome antigen. Rapport I.A.E.A., Beijing (China). In press.

CONFERENCES:

1. J.P. Dessaint, J.Y. Cesbron, C. Lutsch, J.-A. Nogueira-Queiroz & A. Capron
Radioimmunoassays and related procedures in the diagnosis of parasitic infections. Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques in Developing Countries. I.A.E.A, W.H.O. Vienna (Austria), August 26-30, 1985.
2. J.P. Dessaint, C. Lutsch, J.Y. Cesbron, & A. Capron:
Circulating and urinary antigen in lymphatic filariasis : detection of parasite antigen in asymptomatic patients, and differences in antibody isotypes complexed with the antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. Rapport I.A.E.A. Research Co-Ordination Meeting on "Nuclear Techniques for Immunodiagnosis of Tropical Parasitic Infections in Asian Countries", Kuala - Lumpur (Malaysia), September 1-4, 1986.
3. J.A. Nogueira-Queiroz, H. Feldmeier, C. Lutsch, J.P. Dessaint & A. Capron:
Circulating and urinary antigen in schistosomiasis (mansoni and hematobium). Detection by a two-site immunoradiometric assay. Rapport I.A.E.A., Research Co-Ordination Meeting on "Nuclear Techniques for Immunodiagnosis of Tropical Parasitic Infections in Asian Countries", Kuala - Lumpur (Malaysia), September 1-4, 1986.
4. C. Lutsch, J.Y. Cesbron, D. Henri, J.P. Dessaint, K. Wandji, M. Ismail & A. Capron
Circulating immunocomplexes and urinary antigen in lymphatic filariasis. Joint Meeting of the Gesellschaft für Immunologie and the Société Française d'Immunologie, Strasbourg, France, November 19-22, 1986.
5. J.Y. Cesbron, C. Lutsch, D. Henry, J.P. Dessaint, M. Ismail & A. Capron
Détection des antigènes circulants dans la filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti*. Différence de l'isotype des anticorps complexés avec les antigènes selon la symptomatologie. Société Française de Parasitologie; Congrès d'hiver, Bordeaux, France, 5-6 février 1988.

RESUME

Les antigènes circulants parasitaires ont été explorés dans le but : d'établir un diagnostic des helminthiases actives, de déterminer la charge parasitaire des hôtes infestés et d'évaluer le traitement thérapeutique de ces parasitoses.

Dans les schistosomiasés et les filarioses, les antigènes circulants et/ou urinaires ont été quantifiés à l'aide d'anticorps monoclonaux en test immunoradiométrique à deux sites (2S-IRMA).

Lors d'enquêtes menées sur des groupes de patients bilharziens ou wuchériens en zone d'endémie, les tests 2S-IRMA se sont avérés plus sensibles dans les urines que dans le sérum. Des complexes immuns formés d'antigènes circulants sont également trouvés dans les filarioses.

Appliqués au diagnostic individuel en milieu hospitalier, les deux tests 2S-IRMA sont de bonne spécificité. La sensibilité du test 2S-IRMA sur des patients bilharziens est faible, mais des antigènes ont été détectés dans des cas de non-répondeurs en recherche d'anticorps spécifiques. L'intérêt diagnostique du dépistage des antigènes filariens circulants et/ou urinaires est par contre confirmé. Ces résultats ont abouti à la mise au point d'un test de type "Dot-Elisa" dont l'utilisation peut être envisagée en zone d'endémie filarienne.

L'emploi des antigènes circulants bilharziens et filariens et des complexes immuns circulants spécifiques est très prometteur en tant que marqueur d'évaluation du traitement anti-parasitaires (suivi thérapeutique chez l'homme et études des nouvelles molécules anti-parasitaires chez l'animal), et également comme argument diagnostique en phase prépatente.

Première partie

GENERALITES

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Parmi les helminthiases majeures affectant l'homme, les filarioses et les schistosomiasis sont les plus invalidantes. Ces maladies sont très répandues dans les régions tropicales et sub-tropicales des quatre continents africain, américain, asiatique et océanique. Dans les régions d'endémie à filarioses et bilharzioses, vivent plus d'un milliard d'hommes, et près de 300 millions d'entre eux sont directement touchés par ces maladies (OMS 1984a, OMS 1985).

La croissance régulière, et rapide, de la population des zones d'endémie où les mesures de lutte sont inexistantes ou insuffisantes, fait que le nombre total de sujets exposés augmente progressivement. Par ailleurs, du fait des activités de développement portant sur l'approvisionnement en eau et l'assainissement, les moustiques vecteurs de filaires et les mollusques hôtes intermédiaires des schistosomes prolifèrent souvent. De plus, le développement constant de l'urbanisation dans les pays tropicaux entraîne la prolifération des populations de moustiques péri-domestiques dans les zones où la démoustication est inefficace, et contribue pour une large part à la propagation et l'accroissement de la prévalence de la filariose de Bancroft.

La lutte contre ces helminthiases passe par la destruction des insectes vecteurs de filaires et par celle des mollusques hôtes intermédiaires de schistosomes. L'utilisation d'insecticides ou de pesticides en général est cependant onéreuse, non exempt de risques pour l'environnement et, de plus, entraîne des résistances qui limitent l'efficacité de ces mesures.

Le traitement médicamenteux de ces maladies parasitaires en campagne de masse se heurte également au problème de son coût mais aussi aux éventuels effets secondaires quelquefois toxiques de ces médicaments. De plus, si le traitement médicamenteux guérit de l'infection, il ne prévient pas la réinfection quasi-obligatoire en zone d'endémie. Aussi, dans le domaine de la prophylaxie de grands espoirs sont fondés sur l'approche vaccinale, notamment

dans le cas de la schistosomiase où un vaccin recombinant est actuellement à l'étude.

Qu'il s'agisse d'évaluer des campagnes prophylactiques en épidémiologie ou de traiter des cas individuels en clinique, un diagnostic fiable est essentiel.

La méthode courante de diagnostic des filarioses repose sur la recherche de larves parasitaires, appelées microfilaires, dans le sang et le derme des patients. Cette technique de certitude est de moindre utilité car la majorité des filariens présentant des symptômes cliniques d'infection sont amicrofilarémiques; de plus, la plupart des patients microfilarémiques sont asymptomatiques. De même, le diagnostic classique de la schistosomiase réside en la recherche d'oeufs de vers dans les selles ou les urines de sujets infestés. L'application de ces techniques nécessite beaucoup de temps et leur sensibilité n'est optimale que lors de fortes infestations.

Les méthodes habituelles d'immunodiagnostic reposent sur le dosage sérologique des anticorps produits par l'hôte en réponse à l'infection parasitaire. Ces techniques partagent pourtant un inconvénient majeur, à savoir qu'elles ne permettent pas de distinguer une exposition antérieure d'une infestation au moment considéré, aussi l'intérêt s'est récemment porté sur la mise en évidence des antigènes parasitaires dans le sang et les urines du patient.

La détection des antigènes parasitaires circulants ou urinaires devrait permettre d'évaluer beaucoup plus efficacement l'état infectieux de l'individu, en rendant possible une évaluation de la charge parasitaire chez les sujets infectés en rapport avec un traitement éventuel. L'espoir de ce type de test est également de résoudre le problème des réactions croisées entre les filaires et les autres helminthes pour réaliser ainsi un diagnostic spécifique des filarioses.

C'est dans ce contexte que nous procéderons, dans le chapitre consacré à nos travaux expérimentaux, à la mise en évidence des antigènes circulants et urinaires dans les filarioses lymphatiques et les schistosomiasés par le biais d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces parasites.

DONNEES GENERALES SUR LES FILARIOSES LYMPHATIQUES

A. LES FILARIOSES HUMAINES.

1. FILARIOSES LYMPHATIQUES.

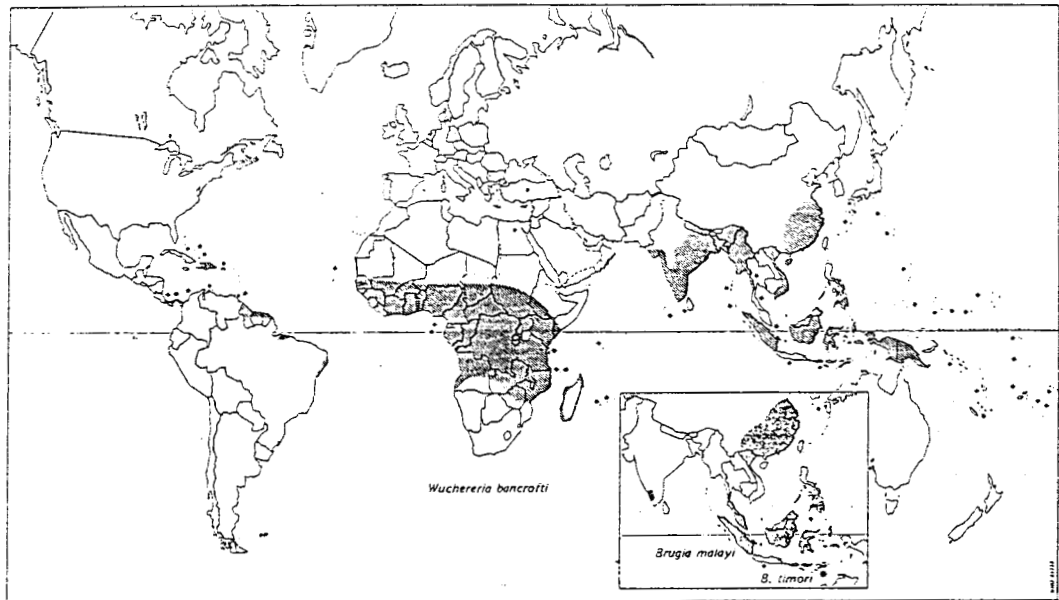
1.1 Cycle biologique des filaires lymphatiques.

Les filarioses lymphatiques humaines sont endémiques en Afrique, en Asie du Sud-Est et en Amérique Centrale (Fig.1). Elles affectent actuellement près de 90 millions d'habitants dont 2/3 en Chine, en Inde et en Indonésie (OMS, 1984a).

Ces helminthiases se caractérisent par la localisation des vers adultes dans les ganglions et les canaux lymphatiques de l'homme. Les adultes sont des nématodes (vers ronds bisexués), blancs, filiformes, qui mesurent 4 à 15 cm de long et leur longévité peut atteindre une quinzaine d'années.

La filariose lymphatique principale, nommée filariose de Bancroft, est causée par l'espèce *Wuchereria bancrofti* et, est transmise par les moustiques vecteurs du genre *Culex*, *Anopheles* et *Aedes*. Les autres filarioses lymphatiques, appelées aussi filarioses de Malaisie et d'Indonésie, sont provoquées par les filaires *Brugia malayi* et *Brugia timori* et, sont transmises par les moustiques vecteurs du genre *Anopheles* et *Mansonia*.

Les vers femelles émettent dans la lymphe des embryons ou microfilaires (larves L1) qui passent ensuite dans le sang. Pourvues d'une gaine, ces microfilaires mesurent 300 microns de long sur 6 à 8 microns de large (Fig. 2). Elles sont présentes dans le sang périphérique avec une certaine périodicité: la périodicité nocturne est la forme la plus répandue, mais la forme semi-périodique ou apériodique se rencontre dans les espèces *W. bancrofti* et *B. malayi*. Lors du repas sanguin, le moustique absorbe les microfilaires. Arrivées dans l'estomac du moustique, les microfilaires traversent la paroi digestive et muent pour donner les larves L2, dites " en saucisse". Ces larves gagnent les muscles thoraciques et deviennent des larves L3 infestantes qui se logent dans la trompe de l'insecte au 10^{ème} jour. Lorsque le moustique pique un sujet sain, les larves infestantes contenues dans la trompe



D'après OMS 1984

Fig. 1. Distribution mondiale de la filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* et *Brugia timori*.

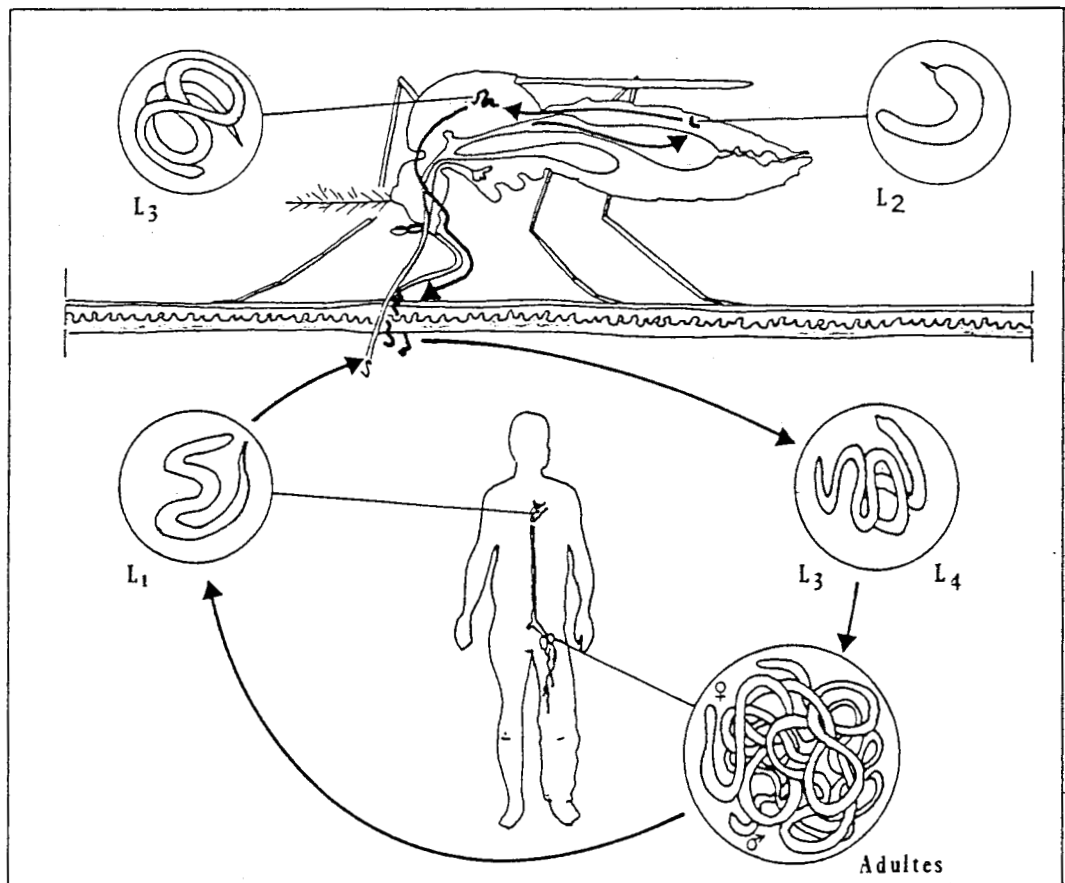


Fig. 2. Cycle évolutif des filaires lymphatiques humaines: *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* et *Brugia timori* (les légendes de la figure sont indiquées dans le texte).

sont déposées sur la peau, et traversent celle-ci activement à l'endroit de la piqûre. Ces larves gagnent les lymphatiques, se logent en amont des ganglions et deviennent adultes en trois mois.

1.2. Manifestations cliniques.

Les filarioses de Bancroft et de Malaisie se caractérisent par la diversité de leurs manifestations cliniques, les signes et symptômes étant souvent différents d'une zone d'endémie à l'autre (Lie, 1962; Ottesen, 1980).

L'évolution clinique de ces filarioses suit habituellement le schéma général suivant: période de prépatence sans signe, phase microfilarémique et asymptomatique, puis filariose clinique aiguë, avec ou sans microfilaires, marquée par des épisodes de lymphangites et lymphadénites avec ou sans fièvre avant d'aboutir à une obstruction chronique des voies lymphatiques. Le stade ultime, le plus spectaculaire de la maladie, est l'éléphantiasis localisé souvent aux membres inférieurs ou aux organes génitaux surtout le scrotum. La microfilarémie est généralement absente à ce stade.

1.2.1. Filariose lymphatique.

La période de prépatence est l'intervalle qui sépare la pénétration des larves infestantes et la première apparition d'une microfilarémie décelable. Cette durée est estimée indirectement à partir d'observations épidémiologiques. Le plus jeune enfant chez qui l'on ait observé la présence dans le sang de microfilaires de *W. bancrofti* avait 7 mois; dans le cas de *B. malayi*, l'âge le plus précoce connu est de 3 mois et demi, et dans celui de *B. timori* de 3 mois. Des études consacrées à des infestations expérimentales de ces filaires chez des primates ou des hommes font apparaître des périodes de prépatences similaires (Dondero *et al.*, 1972).

Chez certains sujets, la phase microfilarémique -asymptomatique peut se prolonger pendant de longues années, voire dans certains cas pendant toute leur vie. Certains patients deviennent spontanément amicrofilarémiques, spécialement s'ils vont s'installer dans une région où la filariose n'est pas endémique. Mais la majorité d'entre eux évoluent vers la phase clinique de la maladie.

La période clinique d'incubation qui est le temps d'apparition des premiers signes

cliniques après l'infestation, est de durée variable. Pour les habitants de régions d'endémie elle varie de 2 à 10 ans, mais elle peut être beaucoup plus courte (2 à 6 mois) pour des personnes originaires de zones non-endémiques (Huntington *et al.*, 1944; Partono *et al.*, 1977).

Au **stade aigu**, la filariose de Bancroft peut commencer par de la fièvre, suivie d'une lymphadénite dans les creux inguinaux et axillaires, et d'une lymphangite typique. Les vaisseaux lymphatiques des organes génitaux sont fréquemment atteints chez l'homme (Wartman, 1947; Dondero *et al.*, 1976). Ces crises peuvent durer 3 à 15 jours et peuvent se reproduire plusieurs fois par an. La filariose de Malaisie se manifeste par une lymphadénite unilatérale au niveau de la région inguinale, et la lymphangite se situe sur le membre ou le pied situé du même côté (Partono, 1978). Les ganglions axillaires sont parfois atteints et la lymphangite peut s'étendre tout le long du bras jusqu'à la main. La fréquence des crises varie de 1 ou 2 par an à plusieurs par mois. Un lymphoedème accompagne fréquemment ces épisodes , mais disparaît en général complètement à la fin de chaque phase aiguë. A la longue, la résorption du lymphoedème est de moins en moins complète après chaque épisode et l'on voit progressivement apparaître la phase chronique.

L'évolution de la maladie aboutit à l'apparition des **manifestations chroniques** de la filariose de Bancroft que sont l'hydrocèle, l'éléphantiasis et la chylurie, et les atteintes se localisent essentiellement aux jambes, au scrotum et aux bras. L'incidence annuelle de la pathologie filarienne chronique est d'environ 0.5% dans une région à forte endémie. Dans la brugiose, l'éléphantiasis siège de façon typique au niveau de la ou des jambes au-dessous du genou, ou des bras au-dessous du coude. L'atteinte génitale et la chylurie sont absentes. A son stade chronique, la filariose lymphatique est indolore mais seuls les sujets atteints peuvent véritablement apprécier les effets psychologiques des difformités produites.

1.2.2. Le Poumon Eosinophile Tropicale (PET).

Les porteurs du PET ne présentent pas les manifestations cliniques classiques ni d'ailleurs la microfilarémie, bien que les filaires puissent être présentes dans les viscères et les tissus. Le PET est attribué à une réaction d'hypersensibilité aux antigènes filariens provenant de microfilaires détruites par le système immunitaire de l'hôte (Ottesen, 1980). Le syndrome classique se caractérise par une hyperéosinophilie presque constante et une

atteinte de l'appareil respiratoire pouvant évoluer vers une fibrose pulmonaire chronique. Les sujets souffrant d'un PET représentent 1% des patients filariens.

1.2.3. Résidents asymptomatiques/amicrofilarémiques ("endémonegatifs"). Dans toutes les régions d'endémie, la majorité des sujets ne présentent ni microfilarémie, ni manifestations cliniques de la maladie. Pour l'heure, il est impossible de déterminer si parmi ces sujets certains sont porteurs d'une infestation ou s'ils sont exempts de cette vermineuse.

1.3. Réponse immune dans les filarioses lymphatiques.

1.3.1. Réactivité globale en fonction du stade clinique.

Les résidents d'une région à endémie filarienne lymphatique présentent des réponses immunes variables en rapport avec le stade clinique des individus parasités (Ottesen *et al.*, 1977 et 1982; Subrahmanyam *et al.*, 1980; Mc Greevy *et al.*, 1980; Piessens *et al.*, 1980a et b).

Les sujets microfilarémiques/asymptomatiques constituent le groupe le moins réactif sur le plan immunologique. Chez ces individus, les lymphocytes ne réagissent généralement pas aux antigènes filariens *in vitro* et les taux d'anticorps sériques dirigés contre les antigènes des filaires adultes et des microfilaires, sont faibles ou nuls (Piessens *et al.*, 1980a, 1980b et 1987). Cette hyporéactivité immunologique pourrait résulter d'une exacerbation des mécanismes suppresseurs, puisque des facteurs inducteurs de cellules T suppressives sont présents dans le sérum de patients microfilarémiques (Piessens *et al.*, 1987). L'hyporéactivité clinique observée, est interprétée comme un corollaire de l'hyporéactivité immunologique.

Chez les sujets microfilarémiques-symptomatiques, les réponses cellulaires et humorales vis-à-vis des antigènes filariens restent faibles (Piessens *et al.*, 1980a et b; Ottesen *et al.*, 1977).

Au stade des manifestations chroniques (éléphantiasis, hydrocèle) les réponses immunitaires sont plus intenses que dans le cas de la microfilarémie asymptomatique. Il se peut que l'élimination des microfilaires du sang détermine également l'intensification des réactions inflammatoires locales, aboutissant ultérieurement aux lésions du système

lymphatique et à la pathologie obstructive caractéristique. Des confirmations viennent de l'expérimentation animale qui montre que l'amicrofilariémie est subordonnée à la production d'anticorps anti-microfilaires et qu'il existe une corrélation directe entre la gravité des lésions lymphatiques et l'intensité de la réaction de l'hôte aux antigènes parasitaires.

Les porteurs d'un **poumon éosinophile tropicale** se caractérisent sur le plan immunologique par une hyperréactivité extrême à tous les antigènes filariens et plus particulièrement à ceux qui proviennent des microfilaires (Ottesen *et al.*, 1979; Paranjape *et al.*, 1985). L'élimination très efficace des microfilaires du sang intervient électivement au niveau du poumon, où l'on observe des symptômes asthmatiformes qui pourraient résulter des réactions allergiques médiées par des anticorps IgE spécifiques liés aux mastocytes pulmonaires (Ottesen, 1980). Si la phase aiguë semble s'expliquer par des mécanismes faisant intervenir des anticorps, la phase chronique du syndrome, marquée par une fibrose pulmonaire et une pneumopathie restrictive, résulte peut-être davantage des lésions tissulaires provoquées par l'activation des lymphocytes ou par l'hyperéosinophilie.

Les résidents "endémo-négatifs" qui ne montrent aucun signe clinique ou parasitologique d'infestation, peuvent présenter des réponses immunes humorales ou cellulaires importantes aux antigènes filariens et notamment ceux de microfilaires (Piessens *et al.*, 1980a et b). Parmi ces sujets, il est probable que certains manifestent une immunité anti-parasitaire alors que d'autres présentent une infestation inapparente. Tant que ce groupe ne pourra être défini plus précisément, il sera impossible de distinguer entre les réactions immunitaires qui sont associées à l'établissement naturel d'une immunité protectrice et celles en rapport avec d'autres manifestations de la parasitose.

1.3.2. Série d'observations.

Des mécanismes variés sous-tendent l'hétérogénéité des réactions immunes chez les sujets exposés aux filarioses.

Une **hypergammaglobulinémie polyclonale** modérée est notée chez la majorité des sujets, infestés ou non, vivants en zone d'endémie filarienne. Elle pourrait résulter de l'activation cellulaire par des antigènes filariens spécifiques et des mitogènes non-spécifiques de microfilaires. Des clones cellulaires T spécifiques d'antigènes filariens augmentent *in vitro* la production d'anticorps spécifiques par des cellules B humaines sensibilisées (Nutman *et*

al., 1984). De plus, les microfilaires de *B. malayi* possèdent un mitogène de faible poids moléculaire qui stimule l'activité B helper de cellules T4+ de donneurs non infestés (Wadee & Piessens, 1986). Quant au titre d'anticorps anti-filaires, il ne rend que partiellement compte de l'élévation du taux des immunoglobulines sériques des résidents en zone d'endémie (Ottesen *et al.*, 1982).

Dans la brugiose à *B. malayi*, l'**activation des cellules T suppressives** est notée chez la majorité des patients microfilarémiques, ainsi que chez certains sujets asymptomatiques/amicrofilarémiques (Piessens *et al.*, 1980c, 1982 et 1983). Les produits activateurs sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire retrouvées *in vivo* dans les sérums d'infection d'animaux, et dans les cultures *in vitro* de microfilaires de *B. malayi* (Piessens *et al.*, 1987). Par contre, on ne sait pas si ces molécules inhibent la réponse cellulaire T aux antigènes filariens. Le rôle suppresseur des antigènes circulants filariens chez l'homme, a été suggéré dans des cas d'éléphantiasis à *B. malayi*. Les sujets présentant une augmentation du nombre de cellules T suppressives réagissent peu aux antigènes filariens; se sont également eux qui possèdent les plus forts taux d'antigènes circulants (Piessens *et al.*, 1987). De même, la réponse cellulaire de patients atteints de la filariose de Bancroft vis-à-vis d'antigènes de larves infestantes de *W. bancrofti*, est inversement proportionnelle au taux d'antigènes circulants (Dasgupta *et al.*, 1987). Ces observations suggèrent donc que la libération de matériel parasitaire durant une infection active déprime la réponse du patient aux antigènes filariens, peut-être en raison de l'activation des circuits de régulation immunosuppresseurs activés par les molécules filariennes.

La **transmission transplacentaire** de la filariose lymphatique est considérée comme rare. Par contre l'exposition prénatale ou néo-natale aux antigènes filariens est courante. Des d'anticorps d'isotypes IgA et IgM ne traversant pas la barrière placentaire sont retrouvés dans le sang de cordon ombilical de nouveaux-nés, en zone d'endémie filarienne (Dissanayake *et al.*, 1980b ; Weil *et al.*, 1983) , et des antigènes filariens sont présents dans le lait de femmes infectées par la filaire *O. volvulus* (Petralanda *et al.*, 1988). On sait que l'administration orale d'antigènes durant la période néo-natale s'accompagne souvent d'une **tolérance immunitaire** due à l'absence ou à l'inactivation de clones cellulaires T ou B spécifiques d'antigènes du répertoire immunologique. Aussi, le système immunitaire d'enfants nés de mères infectées peut être conditionné à répondre aux antigènes filariens de telle manière à

affecter l'évolution d'une infection filarienne future. Cela est vrai dans certains cas d'infections filariennes expérimentales (Schrater *et al.*, 1983), et pourrait expliquer l'existence des différences d'évolution de ce type d'infection entre des sujets originaires et ceux immigrants en zones d'endémie filarienne. De plus, la résistance d'animaux à des infections filariennes peut être réduite voire même annulée après exposition précoce ou prénatale à des antigènes filariens (Klei *et al.*, 1980; Haque & Capron, 1982).

Une **compétition entre les diverses réponses immunes anti-parasitaires** a été mise en évidence et semble avoir un impact sur les manifestations cliniques des infections filariennes. La majorité des patients filariens développent une hypersensibilité de type immédiate comme le montrent les tests cutanés, par contre, très peu d'entre eux présentent les manifestations allergiques caractéristiques du poumon éosinophile tropicale. Cette contradiction est attribuée à l'existence d'anticorps bloquants d'isotype IgG qui peuvent "bloquer" l'activation IgE dépendante des mastocytes par les allergènes filariens. Les deux isotopes d'anticorps, IgG (surtout IgG4) et IgE, reconnaissent des épitopes similaires, sinon identiques, sur les molécules filariennes (Ottesen *et al.*, 1981; Hussain & Ottesen, 1985 et 1986). La modulation des mécanismes allergiques IgE dépendants dans les filarioses lymphatiques par les anticorps IgG4 spécifiques, est fortement suggérée (Hussain & Ottesen, 1986).

1.4. **Traitement médicamenteux.**

Depuis une quarantaine d'années, la **diéthylcarbamazine** (DEC, Notézine^R) constitue le médicament de choix pour le traitement individuel et de masse, de la filariose lymphatique. La prise de DEC provoque un afflux de microfilaries dans les fluides biologiques (sang, urine, hydrocèle et liquide céphalo-rachidien) et favorise l'élimination des microfilaries au niveau du foie. L'action microfilaricide de cette molécule, à des concentrations thérapeutiques, est sans effet sur les microfilaries *in vitro* ; en revanche, la DEC fait rapidement disparaître les microfilaries de la circulation *in vivo*. Une contribution à son mode d'action microfilaricide a été récemment rapportée par Cesbron *et al.*, (1987). Il s'agit d'une induction de la cytotoxicité des plaquettes sanguines vis-à-vis des microfilaries, par l'action conjointe de la DEC et d'antigènes excrétés par les microfilaries (FEA, "filarial excretory antigen"). Après un traitement convenable, les microfilaries disparaissent

rapidement et définitivement. Cependant, il arrive que chez certains patients ainsi traités, on continue d'observer des crises périodiques d'adéno-lymphangites témoignant d'une infestation active par les vers adultes. Le traitement par la DEC commence par des doses faibles, puis elles sont augmentées progressivement jusqu'à 6mg/kg/jour; l'administration est poursuivie pendant 21 jours consécutifs. En cas de microfilarémie importante, en particulier dans la loase, le traitement peut entraîner, par lyse, des réactions allergiques graves avec encéphalite et coma. La DEC possède également une activité macrofilaricide sur les filaires lymphatiques mais il arrive que les filaires ne soient pas toutes tuées, même après plusieurs cures de DEC.

D'autres molécules filaricides utilisables contre les filaires lymphatiques sont actuellement à l'étude. Ainsi, l'**ivermectine** qui est une lactone macrocyclique (Laboratoires Merck, Sharp & Dohme), connue pour son action sur le système nerveux des nématodes. L'ivermectine entraîne la libération d'acide gamma-aminobutyrique (GABA) qui se fixe aux récepteurs post-synaptiques affectant ainsi l'activité de neurotransmetteur du GABA chez *O. volvulus*. Elle diminue également efficacement la microfilarémie chez des individus infestés par *W. bancrofti* et *Loa loa* (Richard-Lenoble *et al.*, 1988). La phase 2 de l'étude clinique de son activité sur les filarioses lymphatiques est en cours en Inde.

Les **isothiocyanates** et leurs dérivés, comme la CGP 20376 (Benthiazole des Laboratoires Ciba-Geigy) et la CGP 16343 (Ciba-Geigy) ont une activité macro- et microfilaricide sur les filaires lymphatiques, en intervenant sur la cuticule des vers. La phase 1 de l'étude clinique est actuellement en cours en Inde.

Enfin, la **furapirimidone**, une nouvelle molécule, fait l'objet d'essais cliniques en Chine, mais son mode d'action n'a pas encore été étudié.

2. AUTRES FILARIOSES.

L'**onchocercose**, causée par la filaire *Onchocerca volvulus* est transmise par des insectes Nématocères du genre *Simulium*. C'est la deuxième maladie filarienne par ordre d'importance après les filarioses lymphatiques; elle se rencontre en Afrique et en Amérique Centrale et Latine. Mais c'est pourtant la filariose la plus redoutable par la cécité qu'elle peut entraîner. Ainsi l'économie de certaines régions rurales, en particulier, dans le Bassin de la Volta en Afrique s'en trouve profondément touchée.

La loase est endémique dans les régions forestières d'Afrique Centrale. L'agent de la loase est la filaire *Loa loa* qui est transmise à l'homme par des insectes Tabanidés du genre Chrysops (taon). La loase se manifeste par des oedèmes de Calabar, petits placards oedémateux de quelques centimètres, localisés au dos des mains et des doigts, à la face et aux membres. Ils sont associés à un prurit continu et à une hyperéosinophilie. Des accidents oculaires peuvent également survenir suite aux migrations des vers adultes sous la conjonctive.

La **dracunculose** ou filaire de Médine est provoquée par la filaire *Dracunculus medinensis*. On la rencontre en Afrique, en Arabie, en Inde et en Amérique du Sud. Ce nématode est transmis à l'homme non par un insecte vecteur, mais par l'ingestion d'un crustacé microscopique d'eau douce du genre Cyclops, dans lequel se développent les larves infestantes. La migration du ver adulte femelle à travers les tissus conjonctifs, vers les membres inférieurs de l'homme, peut entraîner certaines invalidités.

On peut ajouter à cette liste trois **filaires des séreuses** dites non pathogènes: *Dipetalonema streptocerca*, *Mansonella ozzardi* et *Mansonella perstans*.

B. LE DIAGNOSTIC DES FILARIOSES LYMPHATIQUES.

1. DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE.

Seule la découverte et l'identification du parasite sous forme larvaire -microfilarie, constituent les preuves diagnostiques absolues.

Dans le cas des filarioses lymphatiques, c'est la recherche de microfilaries dans le sang qui est communément pratiquée (Chularerk & Desowitz, 1970). La méthode des frottis épais, la plus utilisée dans les évaluations épidémiologiques, est pratiquée à partir de sang capillaire. Cette méthode permet la détermination des espèces filariennes parasites en cause. La technique de la cellule de numération, bien que plus sensible, à l'inconvénient de rendre plus difficile l'identification des microfilaries vivantes. Enfin, la technique d'enrichissement par leucoconcentration ou par filtration sur membrane est encore plus sensible, et détecte des cas qui auraient été considérés à tort comme négatifs par les autres méthodes (Southgate *et al.*, 1974). La détermination de l'espèce s'effectue après fixation et coloration des microfilaries.

Dans les régions où il est difficile de faire des prises de sang de nuit, lorsque les seules microfilaries présentes appartiennent à la forme périodique nocturne de *W. bancrofti*, on

utilise avec un certain succès l'épreuve de provocation par la DEC durant la journée. Environ 20 à 60 minutes après administration d'une dose de 100mg de DEC, on peut voir apparaître les microfilaires dans le sang périphérique.

L'absence de microfilaires n'a pourtant pas de signification et ne permet pas d'éliminer la possibilité d'une filariose car les larves L1 n'apparaissent dans le sang qu'un an ou deux après l'infestation. De plus, elles sont rares dans les infestations anciennes et disparaissent souvent après les crises de lymphangite et les affections fébriles aiguës, quelle que soit l'étiologie.

2. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE.

Le manque de fiabilité des méthodes parasitologiques et cliniques dans le cadre d'études épidémiologiques et de diagnostic individuel des filarioses lymphatiques, a amené divers auteurs à proposer des méthodes immunologiques pour compléter ces examens (Kagan, 1963; Capron *et al.*, 1968a; Gidel *et al.*, 1969; Ambroise-Thomas, 1974 et 1975).

Les épreuves classiques d'immunodiagnostic reposent sur le dosage sérologique des anticorps produits par l'hôte ou sur leur mise en évidence par intradermoréaction. Diverses techniques sont utilisées:

2.1. Les **tests cutanés**, intradermoréaction (IDR) et "Prick test", permettent d'examiner la réaction d'hypersensibilité immédiate d'un sujet vis-à-vis d'un antigène auquel il a déjà été sensibilisé. Le test consiste à introduire une quantité connue d'antigène (homologue ou hétérologue) directement dans le derme (IDR) ou l'épiderme ("Prick test") du patient. Si des anticorps IgE spécifiques de cet antigène réagissent avec ce dernier, on assiste après 15 minutes à l'apparition d'une papule oedémateuse, au point d'inoculation, qui traduit l'augmentation locale de perméabilité vasculaire consécutive à la réaction antigène-anticorps et à la libération d'histamine. Dès 1911, Casoni proposait l'étude de la réponse cutanée immédiate à l'injection d'antigène. Cette technique a été de loin la plus utilisée pour les études épidémiologiques (Ciferri *et al.*, 1965; Gidel *et al.*, 1969; Grove *et al.*, 1977; Tada *et al.*, 1982). Les études sur l'hypersensibilité immédiate dans les helminthiases sont toutefois rendues difficiles par la complexité antigénique des parasites et l'importance des réactions croisées (Vernes, 1975). De plus, la lecture des réactions cutanées est assez délicate,

notamment en cas d'association à une réaction d'Arthus (hypersensibilité de type 3 de Coombs et Gell).

2.2. La réaction de fixation du complément (RFC). Lors du premier temps de la réaction, la mise en présence d'anticorps spécifiques et de l'antigène filarien, détermine la formation d'un complexe qui fixe la quantité précisément déterminée de complément (C') introduite dans la réaction. Le mélange hémolytique (hématies de mouton et sérum anti-hématies de mouton) introduit dans un deuxième temps, visualise cette réaction: il n'y a pas d'hémolyse si le complément est fixé lors du premier temps. Inversement, si le complément est resté libre lors du premier temps (absence d'anticorps anti-filaires), il y a hémolyse.

Ce test a fait l'objet de la première publication concernant le diagnostic immunologique des filarioses (Rodhain & Van den Dranden, 1916). De nombreux auteurs l'ont essayé avec des antigènes homologues ou hétérologues (Ridley, 1956; Kagan, 1963; Gidel *et al.*, 1969) avec des résultats variant de 40 à 80% de positifs. Le manque de sensibilité (correspondant au nombre de sujets infestés et positifs dans le test/nombre total de sujets infestés testés) et l'apparition fréquente d'une activité anti-complémentaire dans les sérums recueillis, l'ont fait abandonner.

2.3. L'hémagglutination indirecte. Des hématies de mouton stabilisées par la glutaraldéhyde et sensibilisées par un extrait antigénique s'agglutinent lorsqu'elles sont mises en présence de dilutions de sérums contenant les anticorps homologues. Cette technique a été appliquée au sérodiagnostic de la filariose de Bancroft (Pacheco & Danaraj, 1966; Fujita *et al.*, 1970), et s'avère d'une bonne sensibilité. Appliquée au diagnostic de l'onchocercose, Capron *et al.* (1972a) notent qu'une réaction positive de bonne spécificité (correspondant au nombre de personnes non infestées par cette filaire et négatives dans le test/ nombre total de personnes non infestées testées) ne peut être interprétée qu'à un titre >1/1024, en raison de nombreuses réactions croisées observées à des taux inférieurs. Cette technique ne permet pas de différencier les trois types de filarioses humaines (onchocercose, wuchérériose et loase).

2.4. L'**immunofluorescence indirecte** consiste à mettre en présence sur une lame, l'antigène et le sérum humain à tester, puis à révéler les anticorps fixés sur cet antigène par une globuline anti-humaine marquée à la fluorescéine. En cas de réaction positive, l'antigène reconnu devient fluorescent et donc visible au microscope en lumière ultraviolette. Plusieurs types d'antigènes peuvent être employés: antigènes solubles fixés ou antigènes figurés comme les microfilaires (Dos Santos *et al.*, 1976), mais la technique la plus fréquente utilise des coupes à la congélation de microfilaires (Ambroise-Thomas & Kien Truong, 1974). Elle nécessite l'emploi de peu de sérum et peut, par conséquent, être réalisée à partir de microprélèvements sanguins effectués sur le terrain. L'intérêt porté sur l'immunofluorescence indirecte en diagnostic des filarioses s'explique par la bonne sensibilité de la méthode, la positivité est de l'ordre de 75 à 95%. Mais le problème des réactions croisées reste posé, même lorsque des antigènes homologues sont utilisés.

2.5. Les techniques de précipitation en gel.

Contrairement aux techniques en milieu liquide, les réactions en gélose sur plaque, **double diffusion d'Ouchterlony (DDG)** et **immunoélectrophorèse (IEP)** peuvent apporter un diagnostic différentiel de filariose. La DDG consiste à laisser simultanément diffuser dans le gel l'antigène et l'anticorps. Cela donne lieu à la formation de lignes de précipitation. Le principe de l'IEP est le même, mais l'antigène est préalablement séparé sous l'influence d'un champ électrique. La double diffusion est généralement utilisée comme test préalable à l'immunoélectrophorèse. Elle permet dans un premier temps de distinguer les filarioses des autres affections mais pas de spécifier le type de filariose. Comparativement à l'IEP, elle est plus rapide et plus simple. Etant donné la difficulté d'obtenir les antigènes homologues (*W. bancrofti* -Oliver-Gonzalez & Bercovitz, 1944), les antigènes hétérologues des vers adultes de *Dipetalonema vitae* et *Dirofilaria immitis* (Biguet *et al.*, 1962a) ou *Ascaris suum* (Niel *et al.*, 1972) ont été utilisés.

En IEP, Capron *et al.* (1968) obtiennent 66 à 87% de résultats positifs suivant la filariose recherchée. Jusqu'alors, l'IEP reste le seul test pouvant distinguer la loase, la wuchérériose et l'onchocercose, par l'existence d'un arc majeur différent dans les trois cas par sa localisation et sa forme. Ce résultat peut être obtenu avec les antigènes homologues et les antigènes hétérologues extraits de *D. vitae* (Capron *et al.*, 1968) ou de *A. suum*

(Gentilini *et al.*, 1972), en raison de la nature des communautés antigéniques unissant les nématodes et notamment les filaires (Capron *et al.*, 1968). Cette méthode présente pourtant le double inconvénient de nécessiter des quantités assez conséquentes de sérum et d'antigène, et de ne permettre la lecture des résultats qu'au bout de quelques jours, ce qui limite son utilisation dans des études séroépidémiologiques mais n'enlève rien de son intérêt dans l'utilisation pour le diagnostic individuel.

2.6. Dosage des IgE spécifiques par un test de type RAST ("radioallergosorbent tests"). La méthode de dosage des IgE spécifiques de type RAST (Wide *et al.*, 1967) consiste à piéger les anticorps sériques dirigés contre un antigène couplé à des billes de sépharose et à les révéler à l'aide d'une anti-immunoglobuline E humaine marquée à l'iode ¹²⁵.

Les helminthiases s'accompagnent généralement d'une élévation du taux des IgE sériques (Jarrett, 1972; Kojima *et al.*, 1972). Cette réponse est associée à la production d'immunoglobulines IgE anti-parasitaires qui ne représentent qu'un faible pourcentage des IgE totales. La réponse IgE spécifique a été démontrée dans les filarioses lymphatiques à *W. bancrofti* (Ito *et al.*, 1972; Neva *et al.*, 1975) et à *B. malayi* (Hussain *et al.*, 1981). Dans ce dernier cas, des différences quantitatives de la réponse anti-parasitaire sont observées et semblent refléter des différences dans les manifestations cliniques. La recherche d'anticorps IgE par le RAST à l'aide d'une fraction hautement allergisante de l'antigène *D. viteae* a permis à Ouaiissi *et al.* (1983) de distinguer les patients onchocerquiens des autres patients filariens (wuchérériens, loasiques et brugians). Bien que les taux d'anticorps IgE anti-parasitaires retrouvés dans le sérum des patients infectés ne représentent qu'un faible pourcentage des IgE totales du sérum (5 à 10% en moyenne -Dessaint *et al.*, 1975a et b), un taux élevé d'IgE totales doit faire penser à une helminthiase (Dessaint & Capron, 1980).

2.7. Les techniques immunologiques de type ELISA et RIA ("Enzyme linked immunosorbent assay" et tests radioimmunologiques).

L'intérêt en matière de sérodiagnostic des filarioses s'est concentré sur les tests ELISA (Engvall & Perlman, 1972) et les RIA qui permettent de mesurer les anticorps de manière quantitative. Dans le test indirect, l'antigène est fixé à un support solide (p. ex. plaque de

polystyrène), puis mis en contact avec le sérum du malade. Après lavage, les anticorps complexés à l'antigène sont révélés par des anti-immunoglobulines humaines conjuguées à une enzyme, ou sont marquées à l'iode ¹²⁵. Dans un cas, l'activité enzymatique est appréciée par addition d'un substrat de la réaction puis lecture au spectrophotomètre, dans l'autre, la lecture des résultats se fait sur un compteur de rayons gamma .

Il est admis que les antigènes homologues filariens sont préférables aux antigènes hétérologues pour la mise au point d'épreuves spécifiques d'immunodiagnostic (Ambroise-Thomas *et al.*, 1980). Comme de façon générale on manque de parasites de l'espèce *W. bancrofti*, on a tenté d'utiliser les antigènes d'espèces voisines *B. malayi* et *B. pahangi* dont le cycle est entretenu sur des animaux de laboratoire et on a également essayé de purifier, à partir de filaires hétérologues, des fractions antigéniques manifestant une "spécificité" vis-à-vis des parasites humains.

Ces études ont porté sur l'emploi d'antigènes somatiques de *Seratia digitana*, *Dipetalonema vitae*, *Onchocerca gibsoni*, *Litimosoides carinii* et *Dirofilaria immitis* . Tout en reconnaissant que le fractionnement de ces antigènes bruts diminue la réactivité croisée, on peut dire qu'aucun des antigènes isolés ne présente encore de spécificité bien nette, de stade ou d'espèce, vis-à-vis des agents de la filariose lymphatique humaine (Capron *et al.*, 1972b; Kagan & Norman, 1974; Dissanayake & Ismail, 1980a; Ambroise-Thomas, 1980). Il semble pourtant que les antigènes somatiques de faibles poids moléculaires du ver adulte de *B. malayi* sont davantage spécifiques d'espèce que les fractions de hauts poids moléculaires (Kaushal *et al.*, 1984)

L'emploi en sérologie d'antigènes filariens métaboliques (antigènes excrétés-sécrétés, ES) fait suite aux travaux de De Savigny (1975) sur la toxocarose qui montrent que les antigènes ES de *Toxocara canis* sont davantage spécifiques que les antigènes somatiques. De plus, il est admis que les anticorps dirigés contre les molécules sécrétées indiquent une infection active, alors que les anticorps dirigés contre les antigènes somatiques peuvent persister longtemps après la mort des parasites. Dans les filarioses lymphatiques, on observe que les antigènes ES (Mackenzie *et al.*, 1978) constituent des préparations antigéniques plus simples et probablement plus spécifiques que les extraits somatiques de la filaire entière dont ils constituent apparemment des sous-ensembles. L'utilisation d'antigènes ES de microfilaires de *W. bancrofti*, apporte une bonne sensibilité

au test de détection des anticorps anti-wuchérériens mais ne résout pas le problème des réactions croisées (Parkhe *et al.*, 1986). Dans la filariose à *B. malayi*, l'utilisation d'antigènes ES de vers adultes a été rapportée pour être plus spécifique aux filarioses que celles des antigènes des autres stades du parasite.

L'utilisation d'**antigènes circulants** issus de sérums de sujets wuchérériens asymptomatiques/microfilarémiques piègent en priorité des immunoglobulines M quelque soit le statut clinique des sujets filariens testés. Les antigènes issus de CIC de patients symptomatiques/amicrofilarémiques détectent essentiellement des anticorps d'isotype IgM chez les sujets microfilarémiques et IgG chez les patients en phase chronique (Reddy *et al.*, 1986).

Comme les antigènes ES, les **antigènes de surface (Ag cuticulaires)** des filaires lymphatiques constituent des préparations antigéniques plus spécifiques que les antigènes somatiques (Mackenzie *et al.*, 1978). Les antigènes de surface des deux espèces de *Brugia* ne peuvent être différenciés (Selkirk *et al.*, 1986), ceux de *W. bancrofti* apparaissent quelque peu différents des précédents notamment dans la zone des 51-67 kD de poids moléculaire (Norman *et al.*, 1986). Dans la filariose à *B. timori*, les antigènes de surface de larves infestantes se sont révélés être les meilleurs indicateurs d'une infection par cette filaire (Maizels *et al.*, 1983b). L'existence d'antigènes de surface spécifiques de stade -mais non d'espèce, chez *B. malayi* (Canlas & Piessens, 1984; Lal & Ottesen, 1988) et *B. pahangi* (Tomisato *et al.*, 1980), a été établie à l'aide d'anticorps monoclonaux, mais aucun de ces antigènes n'a encore été isolé.

L'augmentation, dans des proportions considérables, de la sensibilité de ces épreuves ELISA et RIA détectant des quantités d'anticorps allant jusqu'à l'ordre du femtogramme (10^{-15} g), fait que ces techniques sensibles de diagnostic ne seront vraiment supérieures aux épreuves de moindre sensibilité que lorsque des antigènes de spécificité supérieure auront été isolés.

2.8. Conclusion.

De toutes les techniques sérologiques décrites, il semble qu'aucune ne réponde totalement aux exigences d'une parfaite rigueur et d'une adaptabilité aux conditions les plus diverses de travail. L'hémagglutination indirecte, l'ELISA, la RIA et l'immunofluorescence se

prêtent bien aux enquêtes de masse, et en dépit d'une relative spécificité, ces méthodes sont d'une bonne sensibilité. A l'inverse, les réactions de précipitation en gel et l'immunoélectrophorèse, sont d'une bonne spécificité mais de sensibilité moindre. Leur application trouve son intérêt dans le diagnostic individuel.

L'inconvénient majeur de ces méthodes de recherche d'anticorps reste la difficulté d'appréhender l'évolution des filarioses dépistées, car des anticorps résiduels peuvent être détectés longtemps après l'extinction de l'infection.

Comme la recherche des anticorps chez l'hôte infesté ne permet pas, pour l'instant, de distinguer une exposition antérieure d'une infestation en cours, la mise en évidence de matériel parasitaire (antigènes et ecdystéroïdes) dans le sang ou les urines devrait permettre d'évaluer beaucoup plus efficacement l'état infectieux de l'individu.

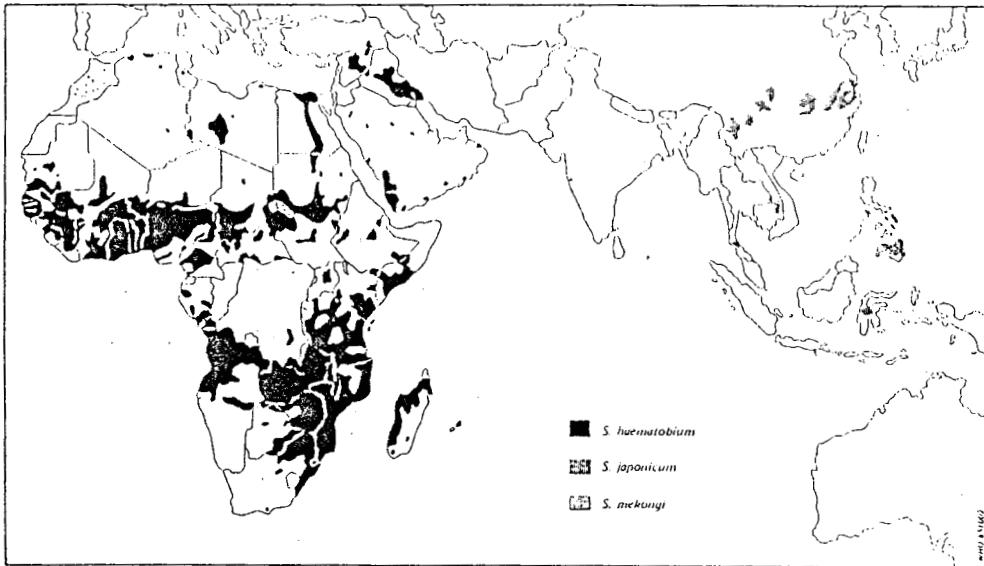
DONNEES GENERALES SUR LES SCHISTOSOMIASES HUMAINES

A. LES SCHISTOSOMIASES HUMAINES:

1. CYCLES BIOLOGIQUES DES SCHISTOSOMES HUMAINS.

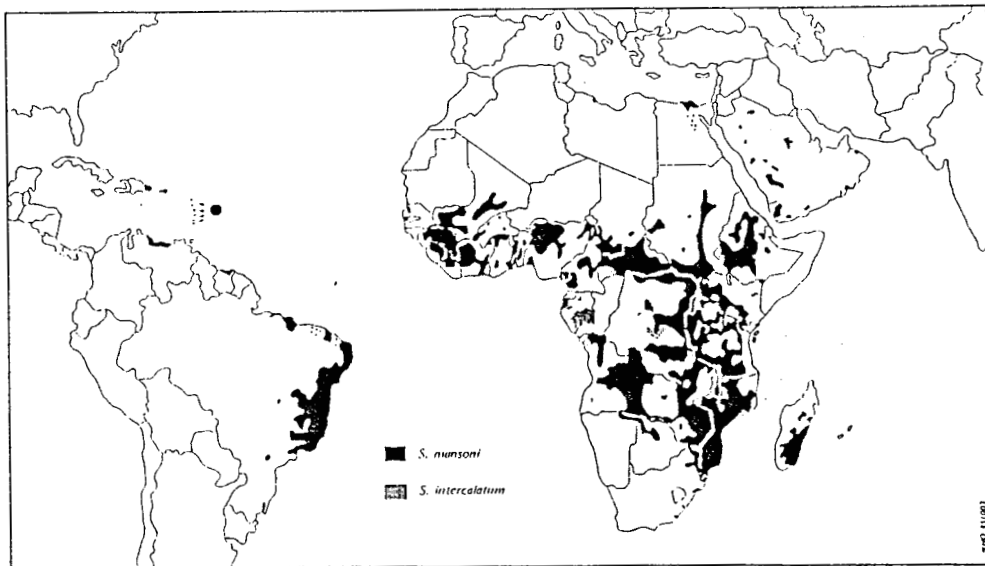
Le simple contact avec l'eau douce dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales peut être à l'origine de la transmission de la schistosomiase ou bilharziose à l'homme. Cette parasitose affecte plus de 200 millions d'individus dans les régions rurales et agricoles. On estime à 500-600 millions le nombre de personnes exposées du fait de la pauvreté, de l'ignorance, de la médiocrité du logement, d'une mauvaise hygiène et de la rareté, sinon de l'absence, d'installations sanitaires (OMS, 1985). Cette affection est à l'origine de 800 000 décès par an, surtout parmi les enfants. De par son importance en santé publique et sur le plan économique dans les régions d'endémie, la schistosomiase se situe au second rang derrière le paludisme.

La schistosomiase est liée à la présence dans l'organisme humain, de trématodes digéniques, parasites sanguicoles, du genre *Schistosoma*. Chacune des cinq espèces pathogènes pour l'homme a un tropisme vasculaire particulier et détermine une pathologie spécifique: *Schistosoma mansoni* provoque la bilharziose intestinale et hépatosplénique, *Schistosoma haematobium* est responsable de la bilharziose urogénitale, *Schistosoma intercalatum* affecte la zone rectale, *Schistosoma japonicum* et *Schistosoma mekongi* sont les agents de la sévère bilharziose artério-veineuse d'Extrême-Orient. *S. haematobium*, *S. mansoni* et *S. japonicum* forment le groupe des schistosomes à forte prévalence. Le premier infeste 100 millions d'humains; c'est d'ailleurs le plus anthropophile du groupe, et seuls quelques primates ont été signalés naturellement infestés. Son aire de répartition touche toute l'Afrique et déborde sur le Proche et le Moyen-Orient (Fig. 3). Le second, *S. mansoni* touche près de 60 millions d'humains en Afrique intertropicale, au Proche-Orient, à Madagascar, mais aussi dans le Nord-Est du continent Sud-Américain et les Caraïbes (Fig. 4). A part l'homme, quelques autres espèces de mammifères peuvent être infestées par cette espèce.



D'après Ch. Cheung

Fig. 3. Distribution mondiale de la schistosomiase à *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* et *S. mekongi*.



D'après Ch. Cheung

Fig. 4. Distribution mondiale de la schistosomiase à *Schistosoma mansoni* et *S. intercalatum*.

Le troisième, *S. japonicum* infeste l'homme et de nombreuses espèces animales domestiques et sauvages. Il sévit surtout en Chine, en Thaïlande et aux Philippines où il touche 100 millions d'individus (Fig. 3). *S. intercalatum* et *S. mekongi* forment le groupe de schistosomes de faible prévalence. Le premier est endémique dans quelques pays d'Afrique équatoriale et subéquatoriale (Fig. 4), le second a été récemment découvert dans quelques pays du Sud-Est asiatique (Fig.3).

Le cycle évolutif des schistosomes fait intervenir un hôte intermédiaire, mollusque aquatique, et un hôte définitif, une espèce animale homéotherme, en l'occurrence l'homme. Le cycle des trois principaux schistosomes humains est schématisé dans la figure 5. L'homme héberge des couples de schistosomes adultes (A) dans le système veineux. Les oeufs (B) pondus par le ver femelle traversent les tissus pour gagner la lumière intestinale (*S. mansoni* et *S. japonicum*) ou vésicale (*S. haematobium*). Ils sont alors éliminés avec les selles ou les urines dans le milieu extérieur aquatique où ils libèrent une larve nageante, le miracidium (C). Grâce à son déplacement rapide, le miracidium entre en contact, puis pénètre dans un mollusque aquatique (du genre *Biomphalaria* dans le cas de *S. mansoni*, genre *Bulinus* pour *S. haematobium* et du genre *Oncomelania* pour *S. japonicum*), dans lequel il se transforme en sporocyste primaire (D), au bout de quelques jours. Cette première étape de multiplication asexuée (polyembryonie) est suivie d'une seconde multiplication de même type dans l'hépatopancréas du mollusque, et donne naissance au sporocyste secondaire (E) qui lui-même libère les cercaires (F), stade infestant pour l'hôte définitif. Les cercaires, encore appelées furcocercaires, sont constituées d'une tête et d'une queue bifide. Elles quittent le mollusque par effraction et nagent activement à la recherche de l'hôte. La pénétration dans la peau se fait par l'action conjuguée des mouvements de la cercaire et la libération d'enzymes (protéases) contenus dans les glandes céphaliques. Seule la partie antérieure pénètre et donne naissance au schistosomule (G), stade larvaire du parasite, d'une longueur de 200- 300 µm. Dans la circulation, le schistosomule migre jusqu'au poumon puis vers les endroits de prédilection spécifiques à chaque espèce. Le parasite s'y transforme en schistosome adulte et atteint une longueur de 10 à 20 mm. Le corps du mâle est une feuille étroite, qui en arrière de la ventouse ventrale se replie en une gouttière: le canal gynécophore. La femelle, un peu plus longue que le mâle mais au corps pratiquement cylindrique, se loge dans le canal gynécophore du mâle, qu'elle ne quitte que lors de chaque ponte journalière.

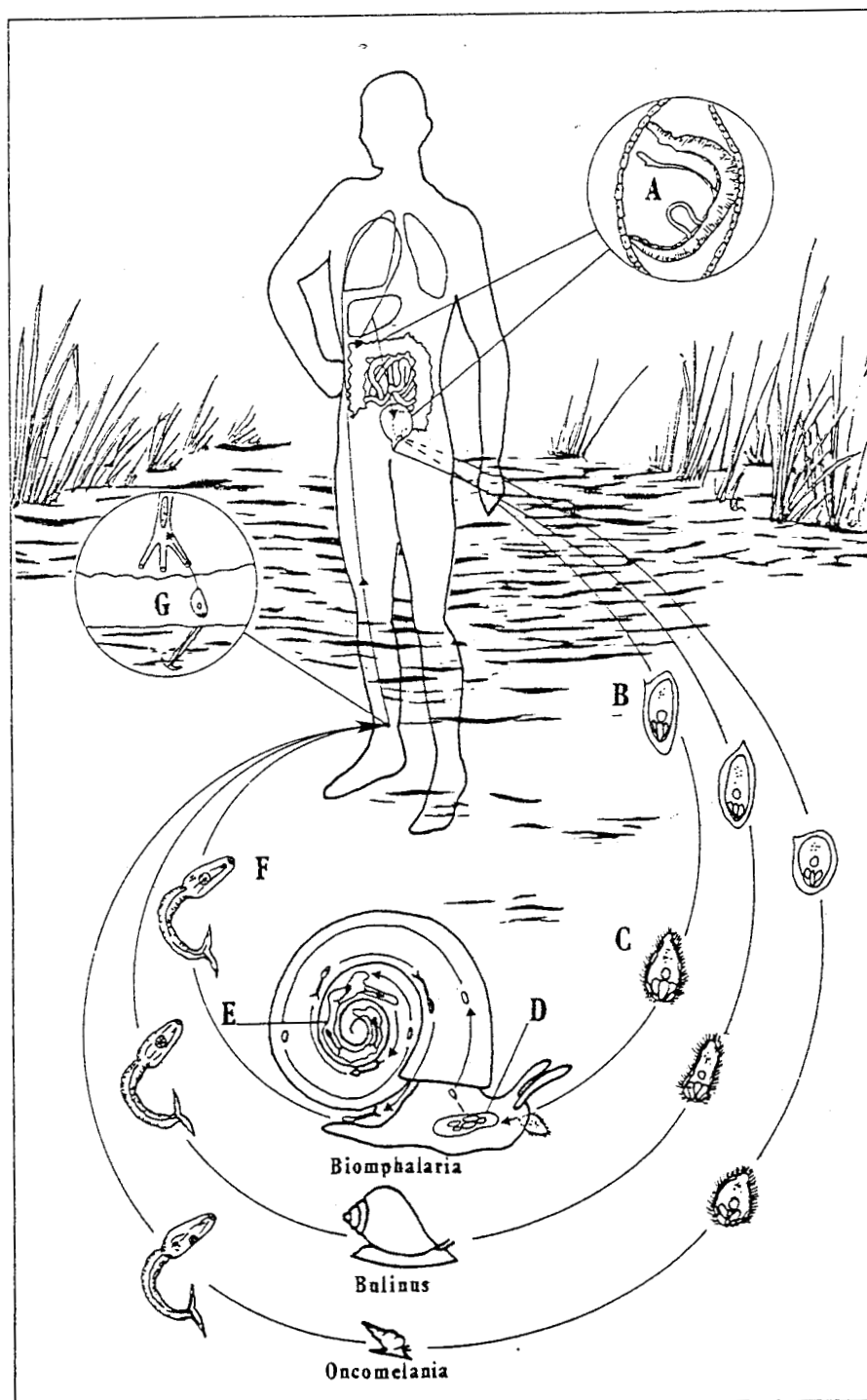


Fig. 5. Cycle évolutif des trois principaux schistosomes humains, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma japonicum* (les légendes de la figure sont indiquées dans le texte).

2. MANIFESTATIONS CLINIQUES.

Les manifestations cliniques successives des bilharzioses peuvent être regroupées en trois phases d'importance inégale:

- une phase immédiate, de réactions cutanées à la pénétration des cercaires
- une phase d'invasion, dite "toxémique", survenant après une période d'incubation discrète,
- une phase d'état marquée ou non par les symptômes de la bilharziose concernée et évoluant ou non vers des complications. L'infestation par les trois principales espèces de schistosomes pathogènes pour l'homme se présente de façon similaire aux deux premières phases; les différences apparaissent quand l'infestation est bien établie et que divers appareils sont atteints chez l'hôte (OMS, 1967).

Les réactions cutanées d'infestation qui suivent la pénétration trans-cutanée des cercaires, débutent par des démangeaisons modérées. Puis apparaissent de nombreuses taches rouges qui finissent par disparaître.

La phase d'invasion ou de "toxémie" dure habituellement 45 jours à trois mois et correspond aux migrations et au développement des vers. La migration des schistosomules à travers le poumon et le foie, entraîne souvent des réactions inflammatoires dans ces organes qui se manifestent par des fièvres et des toux éventuelles. L'étape de maturation des schistosomules jusqu'au début de la ponte, avec migration vers les sites définitifs, se manifeste par des réactions d'hypersensibilité fébriles et des réactions cutanées, en réaction aux produits ovulaires et de schistosomules.

Les manifestations de la phase d'état, liées à la ponte importante, dépendent des territoires de ponte de chaque schistosome. L'agent de la bilharziose uro-génitale, *S. haematobium*, a une localisation préférentielle au niveau de l'appareil urinaire. L'hématurie est le signe essentiel et le plus fréquent. L'excrétion urinaire des oeufs peut être importante et le nombre d'oeufs calcifiés augmente progressivement dans les tissus. Sur le plan clinique, des séquelles obstructives se manifestent par une hydronéphrose, des déformations des uretères et une calcification de la vessie. Des atteintes rénales et génitales causent des cas de stérilité, de même que des surinfections bactériennes complètent le tableau clinique de la bilharziose urinaire.

S. mansoni a une localisation préférentielle au niveau du Système Porte, ce qui explique

la topographie des lésions: intestin, foie et rate. Les manifestations intestinales sont dues à la traversée de la paroi intestinale par les oeufs. Des syndromes d'aspect dysentérique allant jusqu'aux formes les plus sévères sont relevés. Au niveau du foie et de la rate, l'obstruction provoquée par les oeufs aboutit à une embolie localisée et donc à une hypertension portale. La formation du granulome peut alors s'effectuer: les oeufs sont entourés de cellules inflammatoires et le tissu conjonctif prolifère. Dans les formes graves, le foie et la rate aboutissent à une hépatosplénomégalie.

Les manifestations cliniques de la bilharziose artério-veineuse, causée par *S. japonicum*, rappellent celles qui sont observées dans le cas de *S. mansoni* tout en étant plus graves. Cette différence de gravité est attribuée à la production ovulaire plus élevée chez *S. japonicum* et par le fait que la ponte intervient par paquets, d'où une stimulation plus intense des réactions tissulaires.

3. REPONSE IMMUNE.

3.1. Mécanismes effecteurs de la réponse immune à la réinfection:

Dans la schistosomiase, les vers adultes d'une primo-infection induisent une immunité à laquelle ils sont pratiquement réfractaires alors que le stade larvaire post-infestant (schistosomule) demeure particulièrement vulnérable. Ce phénomène est appelé "immunité concomitante".

Les mécanismes effecteurs de l'immunité à la réinfection ont été décrits à partir d'études sur modèles animaux, et ont été progressivement abordés chez l'homme. Le rôle des anticorps dans l'immunité protectrice est d'induire une cytotoxicité léthale pour le schistosomule. Bien que le rôle des anticorps fixant le complément n'ait pas été élucidé *in vivo* chez l'homme, la cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps (ADCC) apparaît comme étant le mécanisme principal de destruction du schistosomule chez l'homme (Capron A. *et al.*, 1980). L'ADCC vis-à-vis des schistosomules impliquant des cellules non lymphoïdes comme les macrophages, les monocytes, les éosinophiles et les plaquettes humaines, a été démontré *in vitro* chez l'homme (Joseph *et al.*, 1978; Capron *et al.*, 1984; Joseph *et al.*, 1983). Les anticorps effecteurs sont des anticorps anaphylactiques, les IgE en particulier. Le rôle des éosinophiles dans les mécanismes effecteurs humains, *in vivo* vis-à-vis des schistosomes, est suggéré par l'augmentation du nombre de ces cellules et la présence d'anticorps (IgE et IgG) dirigés contre

les antigènes de ver adulte chez des individus immuns (Hagan *et al.*, 1985). Le rôle des lymphokines dans les mécanismes effecteurs n'est pas à exclure. Ainsi, les macrophages sont activés en cellules tueuses par le MAF ("Macrophage Activating Factor") dont la composante principale est l'interféron. La cytotoxicité des plaquettes est également induite et modulée par les lymphokines; elle résulte d'une balance entre l'activation des cellules T CD4+ et CD8+.

Bien que l'immunité concomitante soit restée longtemps controversée chez l'homme, cette notion a trouvée son affirmation dans des études épidémiologiques récentes. Ainsi, dans la schistosomiase à *S. mansoni*, la résistance à la réinfection d'enfants kényans après traitement curatif, a mis en évidence l'existence de deux groupes d'enfants, les uns résistants et les autres susceptibles à la réinfection. Tous présentent une variété de réponses immunes protectrices comme de forts taux d'IgG et IgE capables de médier des activités cellulaires cytotoxiques *in vitro* (Butterworth *et al.*, 1985). Cependant, les enfants susceptibles à la réinfection présentent de forts taux d'anticorps dirigés contre des antigènes polysaccharidiques d'oeufs, lesquels possèdent des épitopes identiques à ceux trouvés à la surface des schistosomules (Dunne *et al.*, 1987). Aussi a été émise l'hypothèse que ces anticorps dirigés contre ces antigènes d'oeufs se fixent à la surface de schistosomules et bloquent la fixation d'anticorps effecteurs. Des anticorps d'isotype IgM dirigés contre des antigènes de surface de schistosomules (dont l'épitope immunodominant glycanique est porté par une molécule de 38 000Kd), et présents à forts taux dans le sérum de sujets susceptibles, bloquent la cytotoxicité d'éosinophiles dépendant d'anticorps IgG présents dans les mêmes sérums (Khalife *et al.*, 1986). Ces mêmes patients possèdent des anticorps d'isotype IgG2 dirigés contre des antigènes d'oeufs et ayant un rôle bloquant (Butterworth *et al.*, 1987). Cette restriction isotypique des anticorps effecteurs et bloquants ne semble pas uniquement restreinte à des épitopes carbohydrates puisqu'il existe une corrélation positive entre la présence d'anticorps d'isotype IgG4 dirigés contre des épitopes peptidiques et la susceptibilité à la réinfection (Capron A., en préparation). L'isotype IgG4 d'anticorps dirigés contre les antigènes d'oeufs de *S. mansoni* s'est avéré être un très bon indicateur de l'intensité d'infection (Dunne *et al.*, 1988).

3.2. Réponse immune et stade clinique.

La pénétration des cercaires à travers la peau, après de multiples expositions,

déclenche une réaction d'hypersensibilité à complexes immuns. L'œdème tissulaire au niveau du derme et de l'épiderme comprend des infiltrats d'éosinophiles, de neutrophiles et de cellules mononuclées.

Chez certains sujets en phase d'invasion, les schistosomules provoquent une congestion des capillaires pulmonaires aboutissant à un poumon infiltré par des éosinophiles et par des cellules mononuclées. L'un des antigènes de surface des schistosomules appelé SM 97 (Lanar *et al.*, 1986) entraîne la synthèse d'interféron gamma *via* les cellules T stimulées. L'action de cette interleukine par les macrophages pulmonaires pourrait expliquer l'attrition des parasites observés à ce niveau.

Chez l'homme, les vers adultes peuvent vivre plusieurs années. Maximales au cours de la deuxième décennie de la vie, la fréquence et l'intensité de l'infection diminuent chez les personnes plus âgées. Les diverses études épidémiologiques semblent indiquer que les personnes jeunes ont une immunité acquise plus faible que celle des personnes âgées, dans les zones d'endémie; le nombre d'œufs diminue avec l'âge et les symptômes également. Dans l'une des études, des enfants soudanais atteints de schistosomiase chronique à *S. mansoni* et *S. haematobium*, présentent des réponses immunes cellulaires et humorales inverses. Les rapports du nombre de cellules matures T3+/T suppresseur ou T^h helper⁺/T suppresseur sont inversement proportionnels à l'intensité de l'infection rapportée par le comptage d'œufs dans les selles et les urines (Feldmeier *et al.*, 1985a). La prolifération lymphocytaire *in vitro* et la fonction des cellules NK décroissent avec l'augmentation de la charge parasitaire (Feldmeier *et al.*, 1985b). Par contre, il existe une corrélation positive entre le nombre de cellules T suppressives et les taux d'anticorps IgG et IgE dirigés contre les vers adultes et la charge parasitaire (Feldmeier *et al.*, 1985a). Le traitement de ces patients par une dose unique de praziquantel abolit l'excrétion d'œufs dans les selles ou les urines et restaure l'équilibre des sous-populations lymphocytaires, la prolifération lymphocytaire *in vitro* et l'activité NK (Felmeier *et al.*, 1988). De même, une diminution importante des taux d'anticorps IgE spécifiques, de complexes immuns à IgE et d'antigènes circulants (CCA) est notée. Ces résultats indiquent que la modulation des réponses immunes dans la schistosomiase chronique est associée à une infection active et peut être réversible après une chimiothérapie active.

Les interactions idiotype-antiidiotype pourraient également influencer la mise en place de réponses immunes dans la schistosomiase chronique où l'hôte est continuellement exposé aux

antigènes de vers adultes, aux produits excrétés-sécrétés et aux antigènes solubles d'oeufs. Le développement d'une schistosomiase chronique chez la souris est associée à la production d'anticorps anti-idiotypes vis-à-vis d'antigènes solubles d'oeufs (Powell & Colley, 1985). Les réponses anti-idiotypes de cellules T vis-à-vis d'antigènes solubles d'oeufs ont été relevées dans les cas d'infections humaines par *S. mansoni* (Lima *et al.*, 1986).

Les produits ES du ver, les anticorps effecteurs et bloquants, les interactions idiotype-antiidiotype, contribuant à l'expression de l'immunité pourraient bien intervenir dans la pathologie induite par le parasite.

4. TRAITEMENT MEDICAMENTEUX.

L'objectif essentiel de la chimiothérapie contre la schistosomiase est la réduction et la prévention de la morbidité. Parmi les nombreux médicaments actifs sur les schistosomes, seuls sont envisageables actuellement pour une chimiothérapie de masse le métrifonate, l'oxamniquine et le praziquantel (OMS, 1985).

Le métrifonate (Bilarcil[®]), est un ester organophosphoré qui est actif uniquement sur *S. haematobium*. Deux voies métaboliques donnent naissance au DDVP (phosphate de diméthyle et de dichloro-2, 2 vinyle), un inhibiteur de la cholinestérase à action directe. La prescription est une prise orale de 10 mg/kg, répétée 15 jours plus tard et éventuellement au bout d'un mois. Pourtant, le mode d'action du métrifonate dans la schistosomiase reste inconnu. Dans les programmes de lutte contre la bilharziose urinaire, les taux de guérison observés sont de 40% à plus de 80%, la diminution du nombre d'oeufs chez les sujets non guéris atteignant 90%.

L'oxamniquine (Vancil[®], Mancil[®]) est une tétrahydroquinoléine qui n'est active que sur *S. mansoni*. La posologie habituelle est de 60 mg/kg *per os*, en une seule prise. Bien qu'on ignore le mode d'action précis, on a constaté que la mort du parasite est associée à la formation de grosses vésicules sous le tégument. L'oxamniquine est également efficace sur les jeunes vers, et chez les adultes, les mâles sont plus sensibles que les femelles; de plus, il existe une nette différence dans l'efficacité de cette chimiothérapie sur les diverses souches de schistosomes. L'administration de la dose thérapeutique convenable d'oxamniquine détermine un taux de guérison d'au moins 60%, dépassant souvent 90%. Chez les patients qui ne sont pas guéris, le nombre d'oeufs excrétés est abaissé de plus de 80 à 90% un an après le

traitement.

Le praziquantel (Biltricide^R) est une pyrazino-isoquinoléine hétérocyclique qui est efficace sur toutes les espèces de schistosomes humains. Son efficacité n'est limitée ni par l'origine géographique de l'espèce ou de la sous-espèce parasitaire, ni par l'âge, le sexe, la nature ou l'origine des nombreuses souches d'hôte animal. Son administration *per os* en une seule dose de 40 mg/kg est en général suffisante. Le mode d'action du praziquantel n'est pas connu au niveau moléculaire mais on sait qu'il est associé à de fortes contractions musculaires résultant d'une action sur l'influx calcique et à la formation de vésicules au niveau du tégument du ver. Il semble que des anticorps dirigés contre des antigènes de surface du ver soient impliqués dans le mécanisme d'action du praziquantel. Le taux de guérison dans les schistosomiasis à *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum* et *S. mekongi* est généralement supérieur à 60% au bout d'un an et le nombre d'oeufs est réduit d'au moins 95% chez les sujets non guéris. Dans le cas de *S. haematobium*, le taux de guérison est généralement compris entre 80 et 95%. Un taux moins élevé a été observé en cas d'infestation mixte à *S. mansoni* et *S. haematobium*.

B. LE DIAGNOSTIC DE LA SCHISTOSOMIASE:

La recherche systématique de la schistosomiase est basée sur l'anamnèse qui oriente sur la possibilité d'un contact entre le patient et la forme infestante du parasite, mais aussi sur l'examen clinique. Pour confirmer le diagnostic à la vue de signes cliniques, ou pour révéler une infection asymptomatique, la recherche d'oeufs du parasite dans les selles et les urines, et la mise en évidence d'une réponse immune anti-parasitaire sont habituellement effectuées.

1. DIAGNOSTIQUE PARASITOLOGIQUE.

Les oeufs de *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. intercalatum* sont recherchés dans les matières fécales. La position de l'éperon terminal et la forme de l'oeuf permettent de distinguer les trois espèces. On y trouvera plus rarement des oeufs de *S. haematobium* qui seront à différencier de ceux de *S. intercalatum*. La technique de frottis fécal épais (épreuve de Kato *in* Martin & Beawer, 1968), bien que la plus fiable au maximum d'intensité de l'infection, ne suffit pourtant pas toujours à déceler tous les sujets infestés; en pareil cas, il faut alors recourir à une technique d'enrichissement (Becquet, 1974). Les résultats quantitatifs de l'examen

coprologique attestent de corrélations entre le degré d'infestation et l'existence de l'hépatomégalie et la splénomégalie chez les enfants. Les oeufs de tous les schistosomes peuvent être retrouvés dans les tissus, notamment dans les biopsies rectales.

Pour le diagnostic de l'infestation à *S. haematobium*, les techniques de filtration d'urine (Bell, 1974) sur filtre de nylon, polycarbonate ou papier, remplacent habituellement les techniques qualitatives de sédimentation. Des études cliniques et épidémiologiques ont permis d'évaluer la relation entre l'infestation et la protéinurie ou l'hématurie. Des enfants excréant plus de 50 oeufs/10ml d'urine présentent une hématurie et/ou une protéinurie, lesquelles peuvent être appréciées de façon semi-quantitative par des bandelettes réactives vendues dans le commerce.

On peut également citer des techniques d'éclosion de miracidiums qui ont été utilisées dans les essais cliniques des médicaments antibilharziens pour déterminer la viabilité des oeufs de schistosomes. Ces tests, dont la lecture se fait habituellement au microscope, ont récemment été remplacés par une méthode de "Dot-ELISA" lisible à l'oeil nu. En effet, des substances présentes dans l'oeuf de *S. mansoni*, absorbées sur des membranes de nitrocellulose, fixent la lectine de soja couplée à la peroxydase (Linder *et al.*, 1986).

2. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE.

Hormis la phase aiguë de la schistosomiase où les oeufs du parasite peuvent être aisément mis en évidence, notamment dans les zones à fortes prévalence et intensité, le diagnostic parasitologique est habituellement supplanté par les techniques sérologiques.

2.1. Les tests cutanés.

Le "Prick test" et l'introdermoréaction utilisant des extraits de *S. mansoni*, permettent de mettre en évidence dans la bilharziose l'existence d'une hypersensibilité immédiate (HSI). La sensibilité de ces tests appliqués à la schistosomiase varie de 65% (Pellegrino *et al.*, 1959) à 100% (Sherif, 1956) selon l'antigène utilisé, mais la fréquence des réactions faussement positives chez des sujets non porteurs de schistosomes peut être de 27% (Davies & Eliakim, 1954). L'HSI est tardivement positive au cours de l'infection et le demeure longtemps après la disparition des parasites, ce qui ne permet pas une surveillance post-thérapeutique. Un à trois jours après l'injection intra-dermique, on observe une réaction indurée, spécifique de l'hypersensibilité retardée (HSR). C'est la réaction immédiate (HSI) qui est pourtant

considérée comme significative, mais l'HSR a cependant permis de démontrer une corrélation statistique avec le degré d'infestation du sujet. Les tests cutanés ne sont actuellement plus utilisés.

2.2. La réaction de fixation du complément (RFC) nécessite l'utilisation d'un antigène délipidé afin d'éviter les fausses réactions (Pautrizel *et al.*, 1963). Des résultats positifs dans 96% des bilharzioses à *S. mansoni* et 50% des bilharzioses à *S. haematobium* environ 30 jours après l'infestation, ont été rapportés. Elle ne permet pourtant pas de différencier l'espèce de schistosome en cause.

2.3. La réaction d'hémagglutination indirecte utilise également un antigène délipidé. Elle se positive assez précocement et est spécifique du groupe des schistosomes; il n'existe pas de réaction croisée avec les autres helminthiases excepté dans le cas de la trichinose. Cette technique a donné de bons résultats, mais elle ne pourra se généraliser que lorsqu'un antigène satisfaisant sera utilisé dans les kits diagnostiques commercialisés.

2.4. L'immunofluorescence indirecte utilise comme antigènes des cercaires, des coupes à la congélation de vers adultes, de foie de souris et de hamsters parasités par *S. mansoni*. La réaction d'immunofluorescence appliquée à la bilharziose est d'une grande sensibilité (75% à 98% de positivité selon les auteurs) et est positive précocement (Capron *et al.*, 1972a). Mais elle donne lieu, comme les autres techniques, à des réactions croisées avec d'autres parasitoses et certaines maladies non parasitaires (Vernes *et al.*, 1969). Des anticorps d'isotype IgM dirigés contre les antigènes associés à l'intestin (antigènes circulants anodique et cathodique -voir chapitre IV) sur les coupes de vers mâles adultes peuvent être mis en évidence par cette technique en période prépatente (Nash, 1978). L'immunofluorescence indirecte est une technique de choix parmi les tests de diagnostic immunologique de la bilharziose.

2.5. Les réactions de précipitation en gel (IEP).

L'étude des communautés antigéniques entre *S. mansoni* et *S. haematobium* a démontré l'existence de 19 fractions communes sur les 21 détectées (Capron *et al.*, 1966) autorisant

l'emploi de *S. mansoni* pour le diagnostic de la bilharziose urinaire. En immunoélectrophorèse, les arcs de précipitation sont numérotés de l'extrémité cathodique vers l'anode. L'arc de précipitation numéro 4 a été reconnu spécifique du genre *Schistosoma*, l'arc 8 est spécifique de *S. mansoni* (Biguet *et al.*, 1962b; Capron *et al.*, 1967). Deux à trois arcs de précipitation (ou l'un au moins des arcs spécifiques) sont exigés (Capron *et al.*, 1972a). La sensibilité de l'IEP est respectivement de 80% et 60% pour les infestations à *S. mansoni* et *S. haematobium*. Les anticorps précipitants apparaissent 4 à 6 semaines après le début de l'infection et persistent longtemps. Après traitement, une augmentation transitoire des anticorps est souvent observée puis ils disparaissent en quelques quelques mois.

L'électrosynérèse permet une révélation rapide des anticorps: l'utilisation de la fraction 4 permet un diagnostic spécifique du genre.

2.6. La réaction péricercarienne de Vogel et Minning.

Cinq à six cercaires récemment émises sont déposées sur une lame dans une goutte d'eau additionnée d'une goutte de sérum immun. En cas de réaction positive, les cercaires s'immobilisent en quelques minutes, puis, après un quart d'heure environ, la cuticule du corps et de la queue se dédouble et commence à s'épaissir considérablement. C'est une réaction spécifique du genre *Schistosoma*, d'apparition précoce, s'atténuant progressivement dans les affections anciennes. Elle est positive au cours de la bilharziose confirmée dans 80% des cas (Capron *et al.*, 1972a). De réalisation délicate, elle est de moins en moins utilisée.

2.7. La réaction de précipitation périovulaire de Gonzales.

Lorsque les oeufs vivants de schistosome sont incubés avec du sérum de bilharzien, les antigènes solubles qui sont libérés à travers les micropores de la coque de l'oeuf, forment des précipités digitiformes à leur périphérie. Positive 40 jours environ après l'infestation, son évolution semble liée à la présence des oeufs dans l'organisme (Ruiz-Tiben *et al.*, 1979).

2.8. Dosage des IgE spécifiques dans la bilharziose.

Les schistosomes, comme d'autres helminthes qui sont en contact intime avec les tissus de l'hôte, entraînent une élévation parfois massive du taux des immunoglobulines E sériques. Les anticorps IgE spécifiques de schistosomes peuvent être détectés par la technique du RAST

et dépassent souvent plusieurs centaines d'unités internationales (Dessaint *et al.*, 1975b). La sensibilité et la spécificité de ce test sont respectivement de 66% et 85% lorsqu'on utilise des antigènes de vers adultes de *S. mansoni* (Mott & Dixon, 1982). Par contre, l'utilisation d'antigènes spécifiques d'une espèce donnée augmenterait notablement la sensibilité et la spécificité de ce test, comme cela a été constaté dans le cas de l'échinococcose hydatique (Dessaint *et al.*, 1975a).

2.9. Les tests sérologiques **ELISA** et **RIA** sont certainement de nos jours les tests de détection d'anticorps de la schistosomiase les plus employés. Divers antigènes bruts ou purifiés, mais non définis sur le plan moléculaire, de vers adultes ou d'oeufs ont fait l'objet d'une étude comparative, rapportée par Mott & Dixon (1982). Chez des patients bilharziens non traités, la spécificité et le taux de faux positifs sont similaires dans tous les cas. Par contre, chez ces mêmes patients traités, les antigènes d'oeufs se sont révélés être de plus grande sensibilité et spécificité. L'Elisa utilisant les antigènes d'oeufs est d'une meilleure sensibilité que le test de recherche des IgE spécifiques dans la bilharziose évolutive.

Les anticorps dirigés contre les **antigènes excrétés-sécrétés (ES)** de schistosomes ont été évalués pour le diagnostic sérologique de la schistosomiase. L'utilisation de l'antigène circulant anodique (CAA) ou "gut-associated circulating anodic proteoglycan" (GASCAP), a montré que les anticorps dirigés contre GASCAP sont spécifiques du genre *Schistosoma* (Kelsoe & Weller, 1978) et apparaissent précocement au cours de l'infection, mais ne peuvent être utilisés pour le diagnostic des infections chroniques (Nash *et al.*, 1978 et 1981). Des résultats contradictoires ont été obtenus quant à la corrélation entre les taux d'anticorps anti-GASCAP et le comptage des oeufs dans les selles (Kelsoe & Weller, 1978; Deelder *et al.*, 1980).

L'antigène circulant cathodique (CCA) ou antigène M est également spécifique du genre *Schistosoma* (Carlier *et al.*, 1978). Les anticorps dirigés contre cet antigène apparaissent tôt au cours de l'infection (Carlier *et al.*, 1978) mais ne sont pas toujours notés au stade chronique de la maladie (Deelder & Van den Berge, 1981).

Enfin, l'antigène circulant PSAP ("Phenol sulfuric test active peak") est spécifique de genre et permet d'établir une corrélation positive entre le taux d'IgG anti-PSAP et le degré d'infection. Cet antigène, à l'inverse de l'antigène GASCAP, détecte de plus forts taux

d'anticorps dans les infections chroniques. De plus, la réponse anticorps anti-PSAP peut distinguer les infections chroniques et aiguës de schistosomiase à *S. mansoni*. En phase aiguë, des taux élevés d'IgM spécifiques et faibles d'IgG spécifiques sont notés, alors qu'en phase chronique, les patients présentent en majorité des IgG anti-PSAP (Nash *et al.*, 1978 et 1983). Le remplacement de l'enzyme par l'euprotium (un chélate de lanthanide) possédant un temps de fluorescence relativement long, a été utilisé dans un test de "time-resolved fluoroimmunoassay" (TRFIA). Comparé à l'ELISA, ce test s'est montré davantage sensible et spécifique dans la schistosomiase urinaire (Aceti *et al.*, 1988).

Le remplacement du "coating" de l'antigène sur un support solide par l'utilisation d'anticorps monoclonaux piégeant des fractions antigéniques spécifiques pourra certainement augmenter dans le futur les performances du test ELISA de type "sandwich". De même, l'utilisation de protéines recombinantes spécifiques et de peptides correspondants peut notablement augmenter la spécificité du sérodiagnostic (Newport *et al.*, 1988).

Les méthodes ELISA et RIA sont utiles en raison de leur grande sensibilité et leur faible consommation d'antigène. Pour l'ELISA, il existe la possibilité de réaliser des systèmes de lecture à l'oeil nu ("Dot-ELISA"). De plus, ces techniques immunoenzymatiques ont l'avantage de ne pas être soumises à une législation restrictive à l'inverse des techniques utilisant les radioéléments.

2.10. Technique d'immunotransfert (Immunoblotting).

Après séparation de l'antigène en gel de polyacrylamide, puis transfert sur nitrocellulose, la réponse humorale d'un patient peut être étudiée sur les différentes fractions antigéniques. Les anticorps du sérum testé sont révélés par un anticorps anti-immunoglobuline humaine. Ainsi, Ruppel *et al.* (1985) ont mis en évidence un polypeptide de *S. mansoni* de 31Kd de poids moléculaire, reconnu seulement par le sérum de patients bilharziens, et cette réponse anti-31Kd est précoce. Bien que n'étant pas automatisé à l'inverse de la technique l'ELISA, et donc plus astreignante, l'immunotransfert peut être utilisé comme technique de référence ou de confirmation immunodiagnostique.

CHAPITRE IV

**LES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES
DANS LES PARASITOSE.****A. NATURE DES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES.**

Les parasites libèrent *in vitro* et *in vivo* diverses molécules, appelées communément : antigènes métaboliques, exoantigènes, antigènes "libérés *in vitro* ", antigènes circulants et produits d'excrétion-sécrétion (produits ES) (Anders *et al.*, 1982).

Parmi ces molécules, certaines sont associées à des organes sécréteurs ou excréteurs. Ainsi, les larves et/ou les vers adultes de divers nématodes excrètent *in vitro* des enzymes à activité acétylcholinestérase dont l'origine est à rechercher dans les glandes sécrétrices de l'oesophage (Edwards *et al.*, 1971). Les produits des glandes du préacétabulum de cercaires de schistosomes qui sont impliqués dans la pénétration de la larve à travers la peau, ont été identifiés comme étant une source d'antigènes ES chez l'hôte infesté (Pino-Heiss *et al.*, 1986). De même, les sécrétions des glandes de pénétration des miracidiums de schistosomes ont fait l'objet d'études de leur rôle dans l'implication de la formation du granulome chez l'hôte (Hang *et al.*, 1974). D'autres substances libérées par le parasite ont pour origine l'appareil digestif, le système excréteur ou l'appareil génital. Dans la schistosomiase, les antigènes circulants anodiques et cathodiques retrouvés dans les liquides biologiques de l'hôte infesté, sont des molécules dérivées de l'intestin du parasite (Carlier *et al.*, 1975; Deelder *et al.*, 1980a).

Au cours du développement du parasite a lieu un renouvellement continu de la cuticule des nématodes et du tégument des trématodes. La libération de structures de surface observée *in vitro* par des expériences de marquage de surface de schistosomules ou de schistosomes adultes, voire des fragments membranaires entiers qui s'en détachent, s'effectue probablement aussi *in vivo*. Certaines glycoprotéines de surface de microfilaires de *B. malayi* radiomarquées, qui sont libérées *in vitro*, sont antigéniques (Egwang & Kazura, 1987).

Bien que parmi les molécules libérées par le parasite, certaines soient clairement

associées à des organites ou des organes sécréteurs ou excréteurs, nous retiendrons le terme générique de produit ES pour toute molécule libérée par les parasites vivants, même celles d'origine cuticulaire (liées au renouvellement des structures de surface) et intestinale des trématodes et des nématodes. Parmi les produits ES, libérés par le parasite dans le milieu interne de l'hôte, les molécules à propriétés antigéniques sont appelées antigènes ES. Celles qui passent dans la circulation sont alors nommées antigènes circulants, puis antigènes urinaires s'ils sont éliminés dans les urines de l'hôte. A la mort des parasites, notamment après une cure thérapeutique, des substances essentiellement somatiques, issues de la lyse des corps parasitaires, peuvent alors passer dans la circulation et être à l'origine d'une augmentation du taux sanguin en antigènes circulants.

Des antigènes circulants et urinaires ont été décrits dans les infections à protozoaires et à métazoaires.

B. METHODES DE DETECTION ET D'ETUDE DES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES.

1. Les tests de détection d'antigènes circulants et urinaires.

1.1. Les réactions de précipitation en gel (ID et IEP) ont été les premières techniques à mettre en évidence les antigènes circulants et urinaires de schistosomes (Berggren & Weller, 1967). L'IEP a permis de distinguer les antigènes circulants cathodiques (ou antigène M) et anodiques (Carlier *et al.*, 1975; Deelder *et al.*, 1976). Ces antigènes sont spécifiques du genre *Schistosoma* (Carlier *et al.*, 1978), et une corrélation entre la charge parasitaire et l'intensité de l'arc de précipitation a été notée (Berggren & Weller, 1967). Ce test n'est plus utilisé actuellement en raison de sa consommation importante en réactifs, et son application reste limitée au diagnostic individuel. Dans l'onchocercose, l'IEP révèle un arc de précipitation majeur localisé dans la région cathodique et qui est spécifique de cette filariose (Ouaissi *et al.*, 1981).

La technique de "counter" IEP consiste à faire migrer l'antigène circulant contenu dans les échantillons et l'anticorps utilisé sous l'influence d'un champ électrique; au point d'équivalence apparaît un arc de précipitation. Appliquée au diagnostic de la wuchérériose (Dasgupta *et al.*, 1984; Weil *et al.*, 1986) par utilisation d'anticorps dirigés contre *L. carinii*, *B. malayi* et *D. immitis*, cette technique diagnostique 100% des patients microfilarémiques

contre 10% dans les pathologies chroniques amicrofilariémiques.

1.2. **L'hémagglutination indirecte** utilise des hématies de moutons couplées à des anticorps dirigés contre l'antigène circulant anodique de *S. mansoni*. Elle a fait l'objet d'une recherche d'antigènes circulants dans la schistosomiase expérimentale (Deelder & Eveleigh, 1978), mais n'a pas donné de résultats probants dans la schistosomiase humaine. **L'agglutination de particules de nitrate de cellulose** coatées par la fraction IgG de sérum de cheval dirigée contre *T. cruzi* a révélé l'existence d'antigènes circulants dans la trypanosomiase américaine humaine (Katzin *et al.*, 1989).

1.3 Le test de **radioimmunoprécipitation au polyéthylène-glycol** d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux radiomarqués (**RIPEGA**). Le principe de la réaction est d'obtenir la formation de complexes entre l'anticorps monoclonal ou polyclonal radiomarqué et l'antigène présent dans le sérum (Santoro *et al.*, 1978b). Ces complexes peuvent alors être précipités par le PEG, et la radioactivité présente dans le culot est proportionnelle à la quantité d'antigènes circulants. La concentration en PEG utilisée est critique car il faut définir le seuil où seuls les complexes seront précipités et non les anticorps marqués.

Utilisée dans la recherche d'antigènes circulants dans la schistosomiase (Santoro *et al.*, 1978a et b), l'onchocercose (Ouaissi *et al.*, 1981; Des Moutis *et al.*, 1983) et les filarioses lymphatiques (Hamilton *et al.*, 1984b; Haque *et al.*, 1985), cette méthode a pourtant l'inconvénient d'être d'une moindre sensibilité que d'autres techniques. De plus, la présence de facteurs rhumatoïdes interfère fortement dans ce test.

1.4. Les tests **immunoradiométriques et ELISA à deux sites** (2S-IRMA et 2S-ELISA) s'appliquent à des antigènes présentant des épitopes répétitifs pouvant être piégés par un anticorps fixé à un support solide puis par un second anticorps en phase liquide (anticorps traceur), qui lui est radiomarqué (Carlier *et al.*, 1980) ou conjugué à un enzyme (Deelder *et al.*, 1980a).

1.4.1. Le **Test 2S-IRMA** a été appliqué à la schistosomiase (Carlier *et al.*, 1980; Feldmeier *et al.*, 1986), aux filarioses lymphatiques (Hamilton *et al.*, 1984a; Dissanayake *et*

al., 1984; Maizels *et al.*, 1985b; Forsyth *et al.*, 1985; Paranjape *et al.*, 1986), l'onchocercose (Ouaissi *et al.*, 1981; Weiss *et al.*, 1986) et la toxocarose (Robertson *et al.*, 1988).

1.4.2. Le test 2S-ELISA a été largement utilisé dans la recherche d'antigènes parasitaires circulants.

- Dans les infections à protozoaires: la trypanosomiase américaine (Corral *et al.*, 1984; Freilij *et al.*, 1987), la trypanosomiase africaine (Liu & Pearson, 1987; Nantulya, 1989), la toxoplasmose (Candolfi *et al.*, 1987; Asai *et al.*, 1987).

- Dans les infections à métazoaires: la schistosomiase (Deelder *et al.*, 1980; Ismail *et al.*, 1981; De Jonge *et al.*, 1988), la filariose lymphatique (Maizels *et al.*, 1985b; Weil *et al.*, 1987; Huijin *et al.*, 1987; Lal *et al.*, 1987), l'onchocercose (Petralanda *et al.*, 1988), l'hydatidose (Gottstein *et al.*, 1984), la toxocarose (Bowman *et al.*, 1987) et la dirofilariose de chien (Weil *et al.*, 1985; Grauer *et al.*, 1988).

La sensibilité de ce type de test de dosage autorise la mise en évidence d'infections de faible intensité puisque des antigénémies de l'ordre de 10ng équivalent protéines/ml, voire moins, peuvent être mis en évidence dans les liquides biologiques. La sensibilité est de l'ordre de 50-98% pour des patients filariens microfilarémiques et des sujets bilharziens excréant des oeufs, et de 15-60% pour des patients filariens amicrofilarémiques.

Lorsque les produits de réaction solubles de l'ELISA sont remplacés par des produits précipitants la réaction est appelée "Dot-ELISA". Dans la dirofilariose de chien, plusieurs tests de ce type, utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre *Dirofilaria immitis*, ont été développés. Ces tests se sont avérés d'une bonne spécificité (85-100%) et la sensibilité variant de 52 à 95% (Brunner *et al.*, 1988). L'intérêt de ces tests, appelés "Home test", est leur rapidité d'exécution (résultat en 3 -10 minutes) et leur utilisation possible en dehors du laboratoire.

Il est généralement admis que les tests immunologiques à double sites sont davantage spécifiques que les autres systèmes RIA et ELISA, car la substance dosée doit être reconnue successivement par deux anticorps avant de donner une réponse dans le test (Haber *et al.*, 1981). Les molécules qui possèdent de nombreux déterminants antigéniques, comme les antigènes glucidiques et les glycoprotéines sont les candidates idéales pour ce type de test. Cette bonne spécificité n'est pourtant pas toujours vérifiée, puisqu'il a été montré que dans un

test immunométrique à double sites, le second anticorps peut présenter une spécificité modifiée lorsque l'antigène est fixé au premier anticorps (Boscato *et al.*, 1989).

1.5. Les tests radio- et enzymo-immunologiques par inhibition ou compétition sont basés sur la compétition entre l'antigène sérique recherché et le même antigène purifié vis-à-vis d'un anticorps dirigé contre cet antigène.

Dans le cas où l'antigène purifié est fixé à un support solide (bille, tube), l'anticorps marqué (^{125}I ou enzyme) et l'antigène sérique sont en phase liquide. Plus la quantité d'antigène sérique est importante, moins il y aura d'anticorps marqué piégé par l'antigène coaté et plus faible sera le signal. Inversement, plus l'antigénémie est faible, plus importante est la fixation d'anticorps marqué sur l'antigène coaté, et plus fort est le signal.

Un deuxième type de test utilise l'anticorps fixé au support solide et l'antigène purifié marqué. Dans les tests de compétition, les trois éléments (antigène purifié, antigène recherché et anticorps) sont présents simultanément alors que dans les tests d'inhibition, la phase liquide est déposée sur le support solide après préincubation préalable.

Ces méthodes ont été appliquées à la schistosomiase (Abdel-Hafez *et al.*, 1984; Mitchell *et al.*, 1981), la filariose lymphatique (Hamilton *et al.*, 1984a) et l'ascaridiase (Tanaka *et al.*, 1983); leur sensibilité et leur spécificité se sont avérées similaires à celles obtenues dans les tests à deux sites. La sensibilité des tests de compétition et d'inhibition est pourtant supérieure à celle des tests à double sites, car les antigènes ne présentant qu'un seul déterminant antigénique sont susceptibles d'être détectés.

L'antigène purifié (natif ou recombinant) peut être remplacé par son déterminant antigénique sous forme de peptide ou de glucide de synthèse, ou encore par un anticorps anti-idiotype (image interne de l'antigène) (Potocnjak *et al.*, 1982).

2. Méthodes d'étude des antigènes circulants et ES.

La purification des antigènes circulants peut être réalisée par des techniques de chromatographie d'échanges d'ions, d'affinité sur des lectines et d'immunoaffinité.

L'analyse de leur poids moléculaire fait appel à des techniques de chromatographie de filtration sur gel, d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie de "Western blotting" et d'immunoprécipitation suivie d'un "SDS-PAGE".

Enfin l'étude biochimique est entreprise par des traitements physiques (température) et

chimiques (acides, bases, protéases, urée, lipases, etc....) et l'analyse des acides aminés et des sucres.

3. Méthodes de détection des complexes immuns circulants (CIC).

Une des premières méthode utilisée est la précipitation des CIC au polyéthylène-glycol (PEG) (Creighton & Lambert, 1973). Sinon la majorité des méthodes sont basées sur la liaison des immunoglobulines contenues dans les complexes immuns avec le C1q du complément (Nydegger *et al.*, 1974), la conglutinine (Casoli *et al.*, 1977), les facteurs rhumatoïdes (Winchester *et al.*, 1971), les récepteurs pour le complément ou les immunoglobulines (Fc) sur diverses cellules (Penttinen *et al.*, 1971; Théofilopoulos *et al.*, 1974) et les anticorps spécifiques anti-C3, anti-C4 ou anti-C1q immobilisés sur des supports solides (Antes *et al.*, 1987). Ces techniques permettent de titrer les CIC, mais en général, n'identifient pas la nature des antigènes ou des anticorps intervenant dans leur formation. La spécificité antigénique des CIC piégés peut être étudiée par utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes susceptibles d'être contenus dans les CIC (Sisley *et al.*, 1987). L'identification de l'antigène des CIC est également possible par capture des antigènes en excès par des anticorps spécifiques fixés sur des supports solides. L'anticorps des CIC est alors identifié par une anti-immunoglobuline marquée. Cette dernière technique a été utilisée dans la recherche de CIC spécifiques dans la wuchérériose (Dissanayake *et al.*, 1982), l'hydatidose (Craig *et al.*, 1986) et la toxoplasmose (Van Knappen *et al.*, 1985).

C. LES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES DANS

LES AFFECTIONS A PROTOZOAIRE.

1. Dans le paludisme à *Plasmodium falciparum*, des antigènes solubles libérés dans la circulation sanguine par les mérozoïtes ont été mis en évidence chez des sujets en phase aiguë d'infection (Mc Gregor *et al.*, 1968). De même, Wilson *et al.* (1975) ont montré l'existence de molécules antigéniques circulantes qu'ils classent selon leur thermostabilité et leur spécificité antigénique: 3 types sérologiques d'antigènes labiles à 56°C (antigène L), 2 types d'antigènes stables à 56°C mais instables à 100°C (antigène R) et 2 types d'antigènes thermostables à 100°C (antigène S). Lors d'une étude épidémiologique menée sur des enfants paludéens, ces auteurs notent seulement les antigènes S ainsi que des anticorps anti-antigènes

L qui sont probablement à l'origine de la formation de complexes immuns.

Des études réalisées sur des antigènes ES de *P. falciparum* libérés dans les surnageants de cultures synchrones de mérozoïtes, ont montré l'existence d'un antigène S de poids moléculaire 220 kDa. Un autre antigène de 50 Kd libéré par le stade de réinvasion (mérozoïte) du parasite a été découvert, et son précurseur est un antigène de 126 Kd localisé probablement dans la vacuole parasitophore du stade schizonte (Delplace *et al.*, 1985 et 1987).

En vue du diagnostic du paludisme, l'intérêt s'est plutôt porté sur la recherche d'antigènes particuliers des formes intraérythrocytaires de *P. falciparum* (Mackey *et al.*, 1982; Prou & Deletoille, 1988) et de *P. vivax* (Wang *et al.*, 1987), par l'utilisation de tests ELISA ou d'immunofluorescence.

2. Dans la **toxoplasmose**, la première démonstration d'antigènes circulants a été réalisée chez des souris et des lapins lors d'infections expérimentales par *Toxoplasma gondii* (Raizman & Neva, 1975). Plus tard, Van Knappen et Panggahean (1977) montrent que l'antigénémie est détectable pendant la phase active d'une infection, d'une réinfection ou de la réactivation d'une toxoplasmose humaine chronique.

Lors d'une toxoplasmose congénitale, des antigènes de *T. gondii* sont également détectés dans le liquide amniotique et le liquide cérébro-spinal d'enfants (Araujo *et al.*, 1980), et se révèlent être des indicateurs de la sévérité et du pronostic de l'affection (Hughes, 1985).

La recherche d'antigènes circulants de *T. gondii* est jugée très utile pour la mise en évidence d'une infection aiguë chez des patients soumis à une thérapie immunosuppressive (Candolfi *et al.*, 1987) ou anti-cancéreuse, et ceux immunodéprimés par suite d'une affection (maladie de Hodgkin, lupus érythémateux systémique, SIDA,...) (Hughes, 1985). A ce jour, le diagnostic de la forme méningo-encéphalique de la toxoplasmose par la détection d'antigènes circulants de toxoplasmes n'a pas encore été exploré, bien que le nombre de cas (liés au SIDA) ne cesse d'augmenter (Luft & Remington, 1988).

Des activités enzymatiques, telle la nucléoside triphosphate hydrolase figurent parmi les antigènes circulants de toxoplasmes (Asai *et al.*, 1987).

Des antigènes complexés de toxoplasmes (complexes immuns spécifiques) ont été notés dans la circulation d'animaux et d'humains infectés. De hauts titres de complexes

immuns spécifiques, dont les immunoglobulines fixées sont d'isotypes IgG et IgM, sont retrouvés chez ces patients. Chez des sujets sains, un faible titre de ces complexes immuns est noté et semble être le signe d'une infection ou réinfection latente en absence de signes cliniques (Van Knapen *et al.*, 1985).

3. Dans la **babésiose** à *Babesia argentina*, Goodger (1973 et 1976) décrit deux antigènes circulants qui sont soit du matériel parasitaire complexé au fibrinogène, soit du fibrinogène modifié par l'activité métabolique du parasite ou par l'attachement aux érythrocytes infectés.

Des antigènes solubles dérivés de cultures de babésies (*B. bovis*), probablement des antigènes de surface des mérozoïtes, ont par ailleurs permis de protéger des bovins contre cette affection (Smith *et al.*, 1981).

4. En culture *in vitro*, les formes promastigotes de **leishmanies** libèrent des facteurs excrétés (EF) (Adler & Gunders, 1964). Ce matériel est antigénique (Schnur *et al.*, 1972), mais sa nature biochimique est encore mal connue (Ranjit & Asoke, 1985). Un matériel similaire à EF a été retrouvé dans les tissus infectés par des formes amastigotes (Hommel *et al.*, 1977), mais il n'a pas encore été mis en évidence dans la circulation de patients atteints de leishmaniose. Par contre, des antigènes solubles et les anticorps correspondants ont été détectés dans l'urine de patients atteints de leishmaniose viscérale (Kohanteb *et al.*, 1987).

5. Dans la maladie de Chagas ou **trypanosomiase américaine**, des antigènes circulants de *Trypanosoma cruzi* sont présents dans les sérums d'infection d'animaux (Araujo, 1982) et d'humains (Araujo *et al.*, 1981; Marcipar *et al.*, 1982). Des antigènes solubles sont éliminés dans les urines de patients infectés (Corral *et al.*, 1984).

En réalisant une étude sur des enfants atteints de la maladie de Chagas, Freilij *et al.* (1987) trouvent des antigènes circulants et urinaires de *T. cruzi* chez 100% de ceux qui se trouvent en phase aiguë de la maladie, alors qu'en phase chronique 80% d'entre eux possèdent des antigènes circulants et 100 % des antigènes urinaires. Les molécules mises en évidence sont deux glycoprotéines de 80 et 55 kDa de poids moléculaire. La présence d'antigènes urinaires chez 100 % des patients en phase chronique a été confirmée récemment (Katzin *et*

al., 1989) et les molécules précédentes ont été retrouvées en plus d'une glycoprotéine de 100 kDa.

6. Dans la maladie du sommeil ou **trypanosomiase africaine**, des antigènes membranaires de formes procycliques de *Trypanosoma brucei rhodensiense* ont été mis en évidence dans le sérum de souris infestées, notamment en début de phase prépatente, 2 jours après infestation (Liu & Pearsons, 1987).

Chez des sujets Kényans, cliniquement suspectés de maladie du sommeil, des antigènes circulants de formes procycliques de *T. b. rhodensiense* ont été détectés chez 90% des patients présentant un diagnostic parasitologique positif et chez 13% de patients en absence de parasites sanguins (Nantulya *et al.*, 1989). Chez ces derniers patients, il est possible que les parasites soient présents dans les tissus, comme le système nerveux central, et absents du sang périphérique.

D. LES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES DANS LES AFFECTIONS A HELMINTHES.

1. La schistosomiase.

De nombreux travaux ont porté sur l'étude des antigènes circulants dans la schistosomiase. Okabe et Tanaka (1961) ont les premiers mis en évidence des antigènes parasitaires dans l'urine de patients atteints de schistosomiase à *S. japonicum*. Par la suite, les antigènes circulants ont été étudiés chez l'homme (Carlier, 1975; Bout *et al.* ,1977a; Santoro *et al.*, 1978; Deelder *et al.*, 1980), mais ont également été retrouvés chez la souris (Berggren & Weller, 1967; Nash, 1974; Santoro *et al.*, 1978b; El-Dosoky *et al.*, 1984), le hamster (Gold *et al.*, 1969; Deelder *et al.*, 1976), le rat (Santoro *et al.* , 1978a; Capron *et al.* , 1980), le lapin (Carlier *et al.*, 1978; Qian et Deelder, 1983) et le singe (Houba *et al.*, 1976; Capron *et al.*, 1980) infestés expérimentalement.

Les antigènes solubles contenus dans les produits ES de schistosomes sont directement libérés dans la circulation sanguine où ils peuvent être détectés dans le sérum (Gold *et al.*, 1969; Nash, 1974; Deelder *et al.*, 1976; Santoro *et al.* 1978a) et le plasma (Berggren & Weller, 1967). Certains de ces antigènes sont dégradés par le foie et excrétés sous forme de molécules non-antigéniques de faible poids moléculaire (Nash, 1982 et 1983), alors que

d'autres sont éliminés sous forme antigénique dans les urines (Okabe & Tanaka, 1961; Gold *et al.*, 1969; Carlier, 1975; Deelder *et al.*, 1976) et le lait (Santoro *et al.*, 1977a et 1977b).

Les principaux antigènes circulants retrouvés dans la schistosomiase ont été décrits. Le premier est trouvé dans la circulation de hamsters fortement infestés par *S. mansoni* (Berggren & Weller, 1967). Il correspond à un antigène de poids moléculaires dispersés, extrait du ver adulte à l'acide trichloracétique (fraction TCA soluble) dont l'origine est à rechercher dans l'épithélium intestinal de *S. mansoni*, *S. japonicum* et *S. haematobium* (Fujino *et al.*, 1985). Cet antigène est également présent chez *S. intercalatum* (De Jonge *et al.*, 1989); sa charge électrique est négative et il est constitué de quantités égales de N-acétyl galactosamine et d'acide glucuronique (Nash *et al.*, 1974). Ce matériel est appelé "glycoprotéine associée à l'intestin" ("gut-associated proteoglycan" -GASP (Nash *et al.*, 1974 et 1982)) ou encore "antigène circulant anodique" ("circulating anodic antigen" -CAA, Deelder *et al.*, 1976). Les identités physique, chimique et immunologique de ces deux antigènes, ont amené leurs auteurs (Nash & Deelder, 1985) à les regrouper sous le terme de "gut-associated circulating anodic proteoglycan" -GASCAP.

Un second antigène ES de ver adulte du genre *Schistosoma*, mais également localisé dans les oeufs, est appelé "phenol sulfuric test active peak" -PSAP (Nash *et al.*, 1981). Il s'agit également d'une glycoprotéine de poids moléculaire variant entre de 90 et 130 kDa, de charge électrique positive, dont la partie glucidique est surtout constituée de galactose, de N-acétyl galactosamine, de N-acétyl glucosamine et de mannose (Nash *et al.*, 1977). Cet antigène n'a pourtant pas été retrouvé dans le sérum ou les urines de souris ou d'humains infestés (Nash *et al.*, 1983).

D'autres antigènes de charge électrique positive mais immunologiquement différents du PSAP (Nash & Deelder, 1985) ont été trouvés dans la fraction TCA-soluble d'extraits de vers adultes de *S. mansoni*. Deelder *et al.* (1976) ont décrit un matériel antigénique appelé "circulating cathodic antigen" -CCA. Il s'agit de molécules thermostables, de nature glucidique, d'une large gamme de poids moléculaires (50 à 300 kDa), retrouvées dans le sérum et les urines d'animaux infestés (Deelder *et al.*, 1976 et 1980). Comme l'antigène circulant anodique, l'antigène circulant cathodique est présent dans l'épithélium intestinal des vers adultes de *S. mansoni* et *S. japonicum* (Deelder *et al.*, 1980; Qian & Deelder, 1983), et est régurgité *in vitro* dans le milieu de culture (Deelder *et al.*, 1980). Récemment, l'origine

| Dénomination | Poids moléculaires et charge électrique | Nature biochimique | Origine | Liquides biologiques renfermant les antigènes ES |
|--|--|--------------------|---|--|
| CAA ("Circulating anodic antigen")* ou GASP ("gut- associated proteoglycan")* | PM dispersés <50-300 kDa Charge négative | Glyco-protéique | Epithélium intestinal: <i>S. mansoni</i> <i>S. haematobium</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. intercalatum</i> | Sérum, plasma, et urine de patients et d'animaux infestés |
| CCA ("Circulating cathodic antigen") ou Antigène "M" | PM dispersés <50-300 kDa Charge positive | Glyco-protéique | Epithélium intestinal: <i>S. mansoni</i> <i>S. japonicum</i> | Sérum, plasma, urine et lait de patients et d'animaux infestés |
| PSAP ("Phenolsulfuric-test active peak") | PM dispersés 90-130kDa Charge positive | Glyco-protéique | Indéterminée | Non retrouvé sous forme d'antigène circulant ou urinaire |

Tabl. 1: Tableau récapitulatif des divers antigènes ES de ver adulte de schistosomes (*ces deux antigènes ont été regroupés sous le terme commun: "Gut-Associated Anodic Proteoglycan"- GASCAP).

parasitaire de l'antigène circulant cathodique (CCA) a pu être précisée: chez les cercaires, il est retrouvé dans le cytoplasme et les pilosités de l'épithélium du tube digestif; chez les vers jeunes et adultes des deux sexes, il est localisé dans l'appareil de Golgi, des vésicules cytoplasmiques et les pilosités de l'épithélium du tube digestif; au stade miracidium, l'antigène CCA n'est pas retrouvé (De Water *et al.*, 1986).

Carlier *et al.* (1975) identifient dans l'urine de sujets bilharziens un antigène spécifique de schistosome de 45 kDa appelé antigène "M" qui est similaire sinon identique à l'antigène circulant cathodique. Cet antigène thermostable, de nature glycoprotéique est originaire de l'épithélium intestinal de ver adulte (Carlier *et al.*, 1980a). Il est régurgité *in vitro* dans le milieu de culture (10 kDa < Pm < 70 kDa) et peut être détecté dans le sérum, l'urine (Carlier *et al.*, 1975), et le lait de sujets infestés (Santoro *et al.*, 1977a et b).

Le caractère commun des antigènes circulants est leur nature essentiellement polysaccharidique suggérée par les travaux portant sur la thermo-résistance, la solubilité au TCA, la résistance aux enzymes protéolytiques, la labilité au périodate, l'affinité à des lectines et la composition en carbohydrates (Gold *et al.*, 1969; Nash *et al.*, 1974; Bout *et al.*, 1977a; Carlier *et al.*, 1980b ; Auriault *et al.*, 1982).

2. Les filarioses et autres nématodoses.

L'existence des antigènes circulants dans la filariose de Bancroft a été démontrée pour le première fois par un test cutané après transfert passif de sérum filarien ("passive cutaneous anaphylaxis"), par Franks (1946). Plus récemment, différentes techniques immunologiques ont été utilisées pour détecter les antigènes circulants et urinaires dans les filarioses. Chez des patients infestés par la filaire de Bancroft, des antigènes filariens ont été mis en évidence dans le sérum (Kaliraj *et al.*, 1979 ; Au *et al.*, 1981; Dissanayake *et al.*, 1983; Dasgupta *et al.*, 1984; Reddy *et al.*, 1984; Hamilton *et al.*, 1984a; Maizels *et al.*, 1985; Forsyth *et al.*, 1985; Paranjape *et al.*, 1986; Das *et al.*, 1987; Lal *et al.*, 1987; Weil *et al.*, 1987) mais aussi dans les urines (Dissanayake *et al.*, 1984; Weil *et al.*, 1986; Huijuin *et al.*, 1987). Des antigènes ont également été retrouvés dans la circulation de patients atteints des filarioses à *Brugia malayi*, *B. timori* (Maizels *et al.*, 1985b) et *Onchocerca volvulus* (Ouaissi *et al.*, 1981; Des Moutis *et al.*, 1983). Enfin, il a été montré que le lait de femmes atteintes d'onchocercose pouvait contenir ces antigènes (Petalanda *et al.*, 1988).

Dans le modèle animal, des antigènes circulants filariens ont été observés lors d'infestations expérimentales de mérions (*Meriones inguiculatus*) par *B. pahangi* (Maizels *et al.*, 1985b), de mastomys (*Mastomys natalensis*) par *B. malayi* (Haque *et al.*, 1985), de chiens par *Dirofilaria immitis* (Weil *et al.*, 1985; Grauer *et al.*, 1988) et de chimpanzés par *O. volvulus* (Weiss *et al.*, 1986), mais aussi dans des infestations naturelles de bovins parasités par *O. gibsoni* (Forsyth *et al.*, 1984).

La nature de ces antigènes, leur origine et leur spécificité de stade et d'espèce, bien que peu connues, ont pourtant fait l'objet de quelques études. Ainsi, dans le cas de l'onchocercose, Des Moutis *et al.* (1983), en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre *O. volvulus*, situent l'origine des antigènes circulants dans la cuticule du ver, alors que ceux reconnus par un anticorps monoclonal "Gib 13" dirigé contre *O. gibsoni* ont pour origine l'oeuf (Forsyth *et al.*, 1984), l'utérus et l'intestin du parasite (Wenger *et al.*, 1988). Les antigènes reconnus par "Gib 13", de nature polysaccharidique, sont retrouvés dans la circulation sous forme de molécules de 56 kDa et 62 kDa de poids moléculaire. La présence de structures glucidiques dans les antigènes onchocerquiens avait déjà été suspectée auparavant par Ouaiissi *et al.* (1981). Des anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre *B. malayi* (Paranjape *et al.*, 1986; Lal *et al.*, 1987) et *Dirofilaria immitis*, une filaire de chien (Weil & Liffis, 1987), ont permis de mettre en évidence dans la circulation de patients atteints de la filariose de Bancroft, un antigène glycoprotéique de 200 kDa. Un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène (200 kDa), appelé "CA 101", détecte dans le sérum de patients wuchériens des molécules de 200, 160 et 78 kDa (Lal *et al.*, 1987). L'anticorps monoclonal "Gib13" reconnaît dans le sérum de patients wuchériens des antigènes de poids moléculaires plus faibles (52 kDa -Dissanayake *et al.*, 1984; 140, 62, 56, 52, kDa -Lal *et al.*, 1987); dans l'urine de ces mêmes patients, un antigène de 67 kDa est retrouvé (Dissanayake *et al.*, 1984). Des antigènes de *W. bancrofti* isolés de complexes immuns circulants sont de nature glucidique et présentent une masse molaire apparente de 35 kDa (Dissanayake *et al.*, 1983) et 200 kDa (Lunde *et al.*, 1988). Dans le modèle animal, un anticorps monoclonal "Bp1" dirigé contre *B. pahangi*, reconnaît un antigène natif de 500 kDa et en conditions réductrices, un antigène de 90 kDa de poids moléculaire dans le sérum de mérions infestés expérimentalement par *B. malayi* et *B. pahangi* (Maizels *et al.*, 1987).

Bien que des antigènes libérés *in vitro* par les parasites *Onchocerca volvulus*

| Dénomination de l'anticorps | Filariose | Modèle | Poids moléculaire (kDa) | Nature biochimique |
|--|--|--------|-------------------------|--------------------------------|
| Mn anti- <i>B. pahangi</i> -Bp1- | <i>B. malayi</i> et <i>B. pahangi</i> | Mérion | 500, 90 | Glycoprotéique (épitope PC) |
| Mn anti- <i>O. gibsoni</i> -Gib 13- | <i>O. gibsoni</i> | Bovin | 62, 56 | Epitopes glucidiques |
| Mn anti- <i>O. gibsoni</i> -Gib 13- | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 52 67 dans urines | Epitopes glucidiques |
| Mn anti- <i>O. gibsoni</i> -Gib 13- | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 140, 62, 56, 52 | Indéterminé |
| PI anti- <i>B. malayi</i> | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 200 | Glycoprotéique |
| Mn anti- <i>D. immitis</i> | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 200 | Glycoprotéique |
| Mn anti-200kDa <i>W. bancrofti</i> -CA 101- | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 200, 160, 78 | Glycoprotéique (épitope PC) |
| --- | <i>W. bancrofti</i> | Homme | 35,55,200 dans CIC* | Glucidique |

Tabl. 2: Tableau récapitulatif des divers antigènes filariens circulants détectés à l'aide d'anticorps monoclonaux (Mn) et polyclonaux (PI) anti-filaires. *(CIC: complexe immunitaire circulant)

(Schiller *et al.* 1980, Ngu *et al.* 1981, Daveau *et al.* 1982), *Wuchereria bancrofti* (Kharat *et al.*, 1982; Morgan *et al.*, 1986) et *Brugia malayi* (Kaushal *et al.*, 1982 et 1984) aient été décrits, la preuve de la présence d'épitopes antigéniques identiques dans les molécules filariennes dérivées de culture *in vitro* et *in vivo* de liquides biologiques d'infection, a été apportée par Maizels *et al.* (1985b) à l'aide de l'anticorps monoclonal "Bp1". Les épitopes reconnus par cet anticorps possèdent la même réactivité immunologique et les mêmes caractéristiques que la phosphorylcholine (PC); et les molécules porteuses de ces épitopes sont de nature glycoprotéique (Maizels *et al.*, 1987). Dans la wuchérériose, Prasard & Harinath (1988) ont montré l'existence d'une protéine de 55 kDa commune aux antigènes ES de microfilaires et aux CIC de patients infestés.

D'autres anticorps monoclonaux, "Gib 13" (Wenger *et al.*, 1988) et "CA 101" (Lal *et al.*, 1987), reconnaissent l'épitope phosphorylcholine et possèdent tous deux l'idiotype T15, lequel est associé aux anticorps dirigés contre le composant PC du polysaccharide C de pneumocoques. La présence de la phosphorylcholine comme déterminant antigénique a été démontrée dans une variété d'organismes dont les bactéries, champignons et helminthes (revue générale dans Baldo *et al.*, 1979). Parmi les nématodes, l'épitope PC est retrouvé chez *Ascaris suum* (Crandall & Crandall, 1971), *Haemonchus contortus* (Pery *et al.*, 1974), *Nippostrongylus brasiliensis* (Pery *et al.*, 1979) et *Toxocara canis* (Sugane & Osborne, 1983). L'étude de la réponse humorale de souris Balb/c vis-à-vis de larves infestantes et de vers adultes *Dipetalonema vitae*, une filaire de rongeur, se décompose en deux populations d'anticorps dont l'une est de spécificité anti-phosphorylcholine (Gualzata *et al.*, 1986); les déterminants PC ont pu être localisés dans certaines structures internes du ver (oeuf, utérus, intestin) mais non sur la cuticule. Lal *et al.* (1987) supposent que les antigènes PC sont libérés dans la circulation de l'hôte par un processus d'excrétion-sécrétion et deviennent alors accessibles aux anticorps anti-PC utilisés dans les tests de détection.

La réactivité croisée parmi les nématodes et particulièrement parmi les filaires est connue depuis de longue date (Oliver-Gonzalez & Morales, 1945; Capron *et al.*, 1968; Ambroise-Thomas, 1974). Ces observations ont été renforcées par des expériences de marquage de molécules de surface qui, analysées en immunoprécipitation, montrent une réactivité croisée de stade et d'espèce dans le genre *Onchocerca* et *Brugia* (Forsyth *et al.*, 1981; Maizels *et al.*, 1983a et 1985a; Philipp *et al.*, 1984). De même, des antigènes ES de *Brugia*

sont reconnus par divers anticorps anti-filaires et certains anticorps non anti-filaires (Kaushal *et al.*, 1982 et 1984; Maizels *et al.*, 1987). Récemment, des anticorps monoclonaux dirigés contre diverses espèces de filaires se sont avérés ne pas être spécifiques d'espèce (O.M.S. 1984b).

La phosphorylcholine est un déterminant antigénique majeur de nombreux antigènes circulants filariens (Lal *et al.*, 1987) et peut expliquer pour une grande part la large communauté antigénique observée parmi les nématodes (Maizels *et al.*, 1987). Les molécules portant les déterminants PC sont de masses moléculaires très hétérogènes et sont détectées dans les extraits parasitaires, les produits de libération *in vitro* (ES), et les sérums et urines d'infection (Maizels *et al.*, 1987).

Parmi les molécules libérées *in vitro* par les filaires il faut citer celles qui ne sont pas reconnues par des anticorps dirigés contre le parasite ou l'hôte (Maizels *et al.*, 1985b). Il est possible que ces molécules ne soient pas immunogènes *in vivo* et constituent, de ce fait, de bons candidats pour le diagnostic immunologique. Le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre de tels antigènes a d'ailleurs été envisagé (Maizels *et al.*, 1985b).

Diverses activités enzymatiques ont été attribuées aux antigènes ES. Ainsi, la présence de collagénase (métallo-protéase) a été notée parmi les facteurs ES de larves infestantes de *B. malayi* et des anticorps correspondants ont été retrouvés dans des infestations naturelles d'*O. volvulus* et de *B. malayi* (Petralanda *et al.*, 1986). De même, l'acétylcholinestérase a été trouvée dans le surnageant de culture de microfilaires et d'adultes de *B. malayi*, et s'est révélée être antigénique (Rathaur *et al.*, 1987).

Parmi les autres nématodoses humaines, on peut signaler la mise en évidence d'antigènes circulants d'*Ascaris lumbricoides*, d'*Anisakis*, de *Toxocara canis* (Tanaka *et al.*, 1983) et de *Trichinella spiralis* (Leikina *et al.*, 1982). Dans ce dernier cas, des antigènes circulants ont été trouvés chez des humains accidentellement atteints de toxocarose viscérale et oculaire, de même que chez des patients asymptomatiques des Philippines (Robertson *et al.*, 1988). Dans des cas d'infections animales par *Haemonchus contortus*, *Trichinella spiralis* (in Wilson, 1974), et *Toxocara canis* (Bowman *et al.*, 1987), des antigènes circulants ont été trouvés.

3. Les cestodoses.

L'homme, de façon plus ou moins accidentelle, peut être parasité par les formes larvaires du ténia *Echinococcus granulosus* qui se logent en général dans le foie et deviennent des larves hydatiques (kystes hydatiques). Dans ce type d'affection, des antigènes circulants d'*E. granulosus* ont pu être détectés dans les sérums de patients (Gottstein, 1984; Craig, 1986).

Dans des infections expérimentales, des antigènes circulants de *Taenia pisiformis* (Craig *et al.*, 1984), de *Mesocestoides corti* (Sogandares-Bernal *et al.*, 1981), d'*Echinococcus granulosus* (Bekhti *et al.*, 1977) et d'*Echinococcus multilocularis* (Ali-Khan *et al.*, 1982) ont été mis en évidence.

E. ROLE DES PRODUITS ES D'HELMINTHES DANS L'IMMUNITE:

1. Echappement au système immunitaire et modulations des réponses immunes de l'hôte.

Pour effectuer son développement chez l'hôte, et pour y persister, le parasite doit échapper au système immunitaire de celui-ci. Une des stratégies utilisées par les helminthes est l'acquisition d'antigènes de l'hôte. Des molécules très diverses sont fixées à sa surface: les antigènes des groupes sanguins (*S. mansoni*, *W. bancrofti*) ou du complexe majeur d'histocompatibilité (*S. mansoni*), des immunoglobulines (*S. mansoni*, *E. granulosus*), de l'albumine (*W. bancrofti*)... Parmi les autres mécanismes d'échappement à l'action du système immunitaire de l'hôte, la libération continue de produits ES peut avoir des implications importantes dans l'induction et la régulation de la réponse immune.

1.1 Echappement par libération de composants de surface.

Le rôle de la libération d'antigènes de surface de schistosomules de *S. mansoni* dans le mécanisme d'échappement au système immunitaire de l'hôte a été rapporté par Pearce *et al.* (1986). En comparaison avec les schistosomules obtenus *in vitro*, relativement peu d'anticorps anti-schistosomes sont présents à la surface de schistosomules dérivés de l'hôte. Cette réduction de capacité pour les parasites de fixer des anticorps semble liée à la perte de protéines de surface des vers plutôt qu'à celle d'une acquisition de molécules de l'hôte.

Un phénomène analogue est mis en évidence chez un autre trématode *Fasciola hepatica*.

Lorsque la larve de ce parasite est mise en contact avec du sérum immun de mouton, la surface de celle-ci se couvre d'immunoglobulines qui se lient spécifiquement au glycocalyx (Hanna, 1980). Le complexe ainsi formé se détache ensuite du parasite, et le glycocalyx est rapidement remplacé par une sécrétion exocrine du tégument. Pour Duffus & Franks (1980), les jeunes douves peuvent échapper *in vitro* aux mécanismes de cytotoxicité des éosinophiles et des neutrophiles de bovins par libération d'antigènes de surface. Bien que de nombreuses cellules adhèrent à de jeunes douves incubées dans du sérum immun, la surface des parasites est peu altérée, et des cellules adhérentes et des complexes anticorps-glycocalyx se trouvent détachés de la jeune douve.

Les mêmes observations ont été faites sur des larves de nématodes *Toxocara canis*, où les éosinophiles adhérant à la surface des vers, en présence de sérum immun, sont libérés en même temps que des morceaux de cuticule formés d'antigènes épicuticulaires et d'anticorps (Badley *et al.*, 1987).

La libération d'antigènes de surface, aussi bien chez *F. hepatica* que *T. canis*, semble donc prévenir du contact intime des molécules effectrices des cellules éosinophiles avec la surface vivante des larves parasitaires.

1.2. Rôle dans l'immunité concomitante du schistosome.

Le schistosomule de *S. mansoni*, stade cible de la réponse immune, présente à sa surface une glycoprotéine de 38 kDa (gp 38) dont la partie carbohydrate possède l'un des épitopes protecteurs du rat qui induit chez l'homme une forte réponse anticorps. Cet épitope glucidique est retrouvé à tous les stades du parasite, et notamment dans un antigène ES de 115 kDa du ver adulte (Dissous & Capron, 1983). Ce changement de topographie de l'expression de cet antigène selon le stade du développement du parasite constitue une confirmation moléculaire de l'immunité concomitante. La réponse anticorps vis-à-vis de cet épitope, aussi bien chez le rat que chez l'homme, conduit à la production simultanée d'anticorps effecteurs et bloquants; ces derniers inhibant l'activité cytotoxique des anticorps dirigés contre cet épitope protecteur (Grzych *et al.*, 1984; Khalife *et al.*, 1986; Butterworth *et al.*, 1988).

Des clones cellulaires T de rat, spécifiques des produits ES de ver adulte, augmentent et accélèrent *in vivo* la réponse anticorps IgG dirigée contre les antigènes de surface du schistosomule (Pestel *et al.*, 1985). Ces antigènes, situés dans la zone de poids moléculaire

comprise entre 30 et 40 kDa sont impliqués dans la réponse immune IgG protectrice. Cette observation apporte au niveau cellulaire la confirmation du concept d'immunité concomitante.

1.3. Suppression des fonctions lymphocytaires.

In vivo, les produits ES du cestode *Taenia taeniaeformis* ont un effet inhibiteur de la fonction lymphocytaire chez le rat, en induisant des populations cellulaires suppressives (Burger *et al.*, 1986).

Les produits ES de vers adultes de *Schistosoma mansoni* contiennent une substance de faible poids moléculaire (SDIF1 ou "Schistosome Derived Inhibitory Factor 1") capable d'inhiber sélectivement la prolifération lymphocytaire (Dessaint *et al.*, 1977). Dans la schistosomiase expérimentale de rat, une diminution de la réactivité des lymphocytes, associée à une réduction des réactions d'hypersensibilité retardée, est notée 3 à 4 semaines après le début de l'infection. Le même phénomène peut être observé sur des cellules de rat non infecté et traité *in vivo* par le SDIF1 (Camus *et al.*, 1981). De plus, cet état d'immunodépression est souvent associé à une susceptibilité plus grande aux infections bactériennes, virales et parasitaires. Ainsi, le traitement par le SDIF1 de rats Fischer résistants à l'infestation par *Dipetalonema vitae*, conduit au développement normal de cette filaire chez ce rat, et des microfilaires circulantes sont retrouvées. Le même résultat a été obtenu chez des rats athymiques suggérant ainsi le rôle primordiale des cellules T dans ce processus (Haque *et al.*, 1981). Le SDIF1 exerce un effet inhibiteur sélectif sur la prolifération de lignées cellulaires T (Mazingue *et al.*, 1986) et bloque la division des cellules au cours de la transition G1-S ou au début de la phase S du cycle cellulaire (Mazingue *et al.*, 1987). Une inhibition de la génération de lymphocytes cytotoxiques (CTL) et de cellules suppressives non spécifiques est observée *in vitro* en présence de SDIF1 (Mazingue *et al.*, 1983). L'efficacité du SDIF au cours de l'infection reste à être démontrée mais pourrait être une des explications de l'immunosuppression de même qu'il pourrait participer à la régulation de certains mécanismes effecteurs.

Les produits ES de schistosomules de *S. mansoni* (SRP) ont été décrits comme facteurs stimulants de la prolifération non spécifique des lymphocytes B et T (Auriault *et al.*, 1984). L'action du SRP peut partiellement expliquer la régulation de la réponse immune cellulaire durant l'infection par *S. mansoni* par le parasite lui-même.

La présence d'épitopes phosphorylcholine (PC) dans les produits ES des helminthes semble également participer à la modulation de la réactivité lymphocytaire (Maizels *et al.*, 1987); les épitopes PC ont été signalés comme inhibiteurs de certaines populations spécifiques de lymphocytes B (Mitchell *et al.*, 1977a; Mitchell & Lewers, 1977).

1.4. Altération des fonctions macrophages et granulocytaires.

La cytotoxicité des éosinophiles anticorps dépendant (ADCC) vis-à-vis des schistosomules de *S. mansoni*, peut être bloquée par des complexes immuns (Butterworth *et al.*, 1977; Capron *et al.*, 1979). Les produits ES d'origine intestinale du ver adulte, entrant dans la composition des complexes immuns circulants, sont mis en cause dans ce mécanisme.

Pour Caulfield *et al.* (1982), l'endocytose par les neutrophiles humains, d'antigènes dérivés de la surface de schistosomules de *S. mansoni* et retrouvés *in vitro* dans les produits ES, empêcherait ces cellules de décharger les lysosomes à la surface du parasite; elles ne pourraient plus contribuer aux mécanismes d'ADCC.

Des facteurs excrétés de schistosomes peuvent indirectement être à l'origine d'une inhibition de la fonction du macrophage. Diverses enzymes (sérine protéase, métalloaminopeptidase) contenues dans les facteurs ES de schistosomule sont capables d'hydrolyser des immunoglobulines IgG libres ou fixées à la surface de celui-ci (Auriault *et al.*, 1981a). Les peptides ainsi produits, dont le tripeptide TKP (Thr-Lys-Pro), inhibent *in vitro* l'activité phagocytaire des macrophages, la libération d'enzymes cellulaires et l'activité cytotoxique IgE dépendante des macrophages vis-à-vis des schistosomules (Auriault *et al.*, 1980; Auriault *et al.*, 1981b). La digestion protéolytique d'IgG peut être suspectée comme facilitant l'élimination des fractions Fc des immunoglobulines liées à la surface des parasites limitant ainsi l'activation du complément et la fixation des éosinophiles, neutrophiles et macrophages. Un tel mécanisme est imaginé dans le cas des larves de *F. hepatica* (Chapman & Mitchell, 1982).

La dégranulation des mastocytes peut être inhibée *in vitro* et *in vivo* par des facteurs présents dans les produits ES non purifiés de vers adultes de *S. mansoni* contenant le SDIF2, alors que l'antigène circulant "M" ne produit pas cet effet inhibiteur (Mazingue *et al.*, 1980). L'effet inhibiteur du choc anaphylactique du cobaye par le SDIF2 a ainsi pu être démontré. Le SDIF2 inhibe le mécanisme de cytotoxicité d'éosinophiles dépendants d'anticorps (ADCC) par

inhibition de dégranulation des mastocytes , mais n'a pas d'effet direct sur l'éosinophile. Cette action sur les cellules mastocytaires peut partiellement expliquer la faible incidence des manifestations allergiques observées dans les helminthiases et peut représenter un mécanisme d'échappement du parasite au niveau de l'ADCC.

Le schistosomule de *S. mansoni* exprime à sa surface un antigène de 28 kDa (p28) qui est reconnu par des anticorps de patients ou de rats infestés expérimentalement. Cette protéine est synthétisée dans les cellules périphériques du système protonéphridien de schistosomule puis est transportée à la surface sur laquelle elle est exprimée transitoirement (Taylor *et al.*, 1988) après quoi elle pourrait être libérée sous forme de produit ES. Une activité glutathion-transférase est retrouvée dans la p28 native (Taylor *et al.*, 1988), un enzyme impliqué dans la détoxification de radicaux libres. Le rôle fonctionnel de cet enzyme reste à être démontré, et l'on pense qu'il détoxique les produits de lipopéroxidation qui résultent de l'attaque du système immunitaire sur la membrane du parasite. Des travaux similaires réalisés dans le modèle souris avec *S. japonicum* ont amené à la description d'une molécule de 26 kDa ayant les mêmes propriétés que la p28 (Mitchell *et al.*, 1989).

L'évasion immunitaire via des produits ES a été décrite dans le cas du nématode *Trichinella spiralis*. Rhoads (1983) identifie et purifie une superoxyde-dismutase de vers adultes et de larves de stade musculaire de *Trichinella spiralis*, qui est également retrouvée dans les sécrétions *in vitro* des larves de stade musculaire. Des différences significatives de mortalité *in vitro* des divers stades parasitaires par des granulocytes et des métabolites oxydants sont notées et reflètent des différences de contenu en superoxyde dismutase et en glutathion peroxidase -une autre enzyme antioxydante (Kazura & Meshnick, 1984). La co-incubation *in vitro* de vers adultes "oxydant résistant" avec de jeunes larves sensibles, protège ces dernières contre l'action des agents oxydants. Ces observations suggèrent que la superoxyde dismutase, sécrétée par les larves enkystées dans le muscle, protège celles-ci *in vivo* contre les métabolites de l'oxygène d'origine cellulaire (neutrophiles et éosinophiles).

1.5. Modulation de la réaction du complément.

La résistance des hôtes intermédiaires, souris et rat, à l'infection par le cestode *T. taeniaeformis* est de nature humorale et dépend du taux de complément (Musoke & Williams, 1975 ; Mitchell *et al.*, 1977b). Les métacercaires de ce cestode libèrent des produits ES qui ont

la capacité de fixer le complément par les voies classiques et alternes (Hammerberg & Williams, 1978a). Ce facteur ES, de nature glycoprotéique (Hammerberg & Williams, 1978b), est également retrouvé dans le liquide kystique, et pourrait être à l'origine d'une consommation locale du complément, contribuant ainsi à l'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte (Hammerberg & Williams, 1978a).

Des antigènes ES de vers adultes de *S. mansoni* possèdent *in vitro* la propriété d'activer le complément en l'absence d'anticorps (Santoro *et al.*, 1980b). Certains des antigènes ES sont retrouvés dans les sérums d'infection et une corrélation hautement significative entre les taux d'antigènes circulants et la chute de C3d dans la schistosomiase humaine est notée (Santoro *et al.*, 1980a). Ces observations suggèrent fortement que certains antigènes libérés par les schistosomes peuvent activer le complément *in vivo*.

2. Les produits ES d'helminthes dans l'immunité protectrice.

La mise en évidence du rôle des produits ES dans le développement des réponses immunes protectrices de l'hôte, vient essentiellement des expériences de vaccination utilisant les produits ES.

L'injection intramusculaire d'antigènes ES de cultures d'oncosphères de *Taenia ovis* et *T. hydatigena*, protège les moutons contre l'infection par oeufs de *T. ovis* (Rickard & Bell, 1971). D'autres expériences de vaccination d'hôtes intermédiaires de cestodes par des antigènes ES d'oncosphères de *T. ovis*, *T. multiceps*, *T. saginata*, *Echinococcus granulosus*, etc..., se sont avérées encourageantes (revue dans Rickard & Howell, 1987). De même, des antigènes ES du stade adulte de *T. taeniaeformis* immunisent des rats et des souris contre l'ingestion d'oeufs de ce cestode. Par contre, la nature de ces antigènes ES d'oncosphères et de stade adulte de ce cestode n'est que très peu connue et l'on ne sait pas si ces antigènes sont sécrétés sous forme particulière ou s'ils sont liés à des structures de surface (Rajasekariah *et al.*, 1980a et 1980b). Pourtant il existe des différences qualitatives dans l'immunité "précoce" induite par les antigènes ES d'oncosphère et de stade adulte du cestode *T. taeniaeformis*. En effet, lorsque des souris vaccinées par des antigènes ES d'oncosphère sont infestées par des oncosphères viables, ces derniers sont en majorité détruits et les rares survivants se développent normalement. A l'inverse, lorsque ces souris immunisées par des antigènes ES de stade adulte sont infestées par des oncosphères, la majorité d'entre eux se développent dans le

foie mais meurent finalement au bout de 6-8 semaines (Lightowers *et al.*, 1986).

L'épitope protecteur de la gp38 du schistosomule de *S. mansoni* est également présent dans l'haemocyanine (KLH: "Keyhole Limpet Hemocyanin") du mollusque marin *Megathura crenulata*. Le rôle protecteur de cet épitope reconnu par l'anticorps monoclonal IgG2a de rat a pu être établi par des expériences d'immunisation par des anticorps anti-idiotypiques dirigés contre l'IgG2a (Grzych *et al.*, 1985) et par la KLH (Grzych *et al.*, 1987). De même, la protéine p28 induit, sous forme native et recombinante, un fort taux de protection après immunisations expérimentales de rongeurs et de babouins (Balloul *et al.*, 1987; Capron *et al.*, 1987).

L'utilisation d'antigènes ES de schistosomule nommés SRP ("Schistosomulum Released Products") dans l'immunisation de rats et de singes induit une forte réponse cytotoxique et protectrice IgE dépendante vis-à-vis des schistosomules, indiquant que le SRP contient les antigènes cibles de la réponse protectrice; ils sont des antigènes protecteurs potentiels pour ces hôtes semi-permissif et permissif (Dammoneville *et al.*, 1986). L'un de ces antigènes de 26 kDa induit une stimulation par les cellules T spécifiques de la sécrétion d'anticorps IgE cytotoxiques par les lymphocytes B (Dammoneville *et al.*, 1987). De plus, il apparaît qu'un anticorps anti-idiotype monoclonal de rat (image interne de l'épitope de la 26 kDa) possède ces mêmes propriétés (Velge-Roussel *et al.*, 1989).

Des expériences de vaccination d'hôtes naturels contre leurs parasites nématodes (*Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Angiostrongylus cantonensis*, ...) par utilisation d'antigènes ES n'ont été que peu encourageantes. Des résultats positifs dans le cas de *Trichinella spiralis* ont pourtant été rapportés. Les larves L1 de *T. spiralis* sécrètent un antigène de 48 kDa originaire des granules sécrétoires de stichocytes. Ces antigènes sont également présents dans la cuticule des jeunes vers. Des essais de vaccination de souris utilisant ces antigènes induisent une immunité protectrice similaire à l'immunité faisant suite à une primo-infection (Silberstein & Despommier, 1984 et 1985). Le rôle probable de ces antigènes ES dans l'induction de réponses immunes protectrices est suggéré par la réactivité des cellules-T spécifiques de *T. spiralis* qui, stimulées par une préparation antigénique enrichie en antigènes ES, prolifèrent et conservent leur activité anti-*T. spiralis in vivo* (Reidlinger *et al.*, 1986). La meilleure voie d'administration des antigènes ES de *T. spiralis* pour obtenir les plus forts taux de protection chez le porc et la souris est la voie orale (Vernes, 1976).

Les futurs essais de vaccination utilisant des antigènes ES d'helminthes mieux définis, devront également prendre en compte l'importance de la voie de présentation antigénique et la nature de l'adjuvant utilisé.

3. Immunopathologie induite par les produits ES d'helminthes.

3.1. Rôle des ES d'oeufs de schistosomes.

La formation de granulomes autour des oeufs de schistosomes est l'un des exemples d'une réponse immune anti-helminthe ayant des conséquences pathologiques pour l'hôte. Il s'agit du développement d'un tissu fibreux autour de la coque ovulaire, partiellement détruite, qui s'accompagne au niveau du foie d'une disparition d'hépatocytes et donc d'une diminution de la fonction hépatique. La présensibilisation de souris par des antigènes sécrétés par le miracidium contenu dans l'oeuf, peut entraîner une accélération de la formation d'un granulome ou une augmentation de la taille de celui-ci (Boros & Warren, 1970). Cette préparation antigénique est appelée SEA ("soluble egg antigen") et son activité inductrice d'un granulome a été retrouvée dans les produits ES et les homogénats d'oeufs. Ce SEA est produit par le miracidium mature mais n'est pas retrouvé dans les oeufs immatures (Hang *et al.*, 1984). Trois antigènes majeurs la compose, MSA1 ("Major Serological Antigen1"), MSA2 and MSA3 (Pelley *et al.*, 1976), et l'activité inflammatoire granulomateuse essentielle est attribuée à MSA1 (Pelley & Pelley, 1976). Tous les constituants caractéristiques d'une réaction d'hypersensibilité sont présents au lieu de formation du granulome: lymphocytes, neutrophiles, éosinophiles, plasmocytes et cellules géantes multinuclées (Von Lichtenberg, 1973; Hang *et al.*, 1974). Le granulome est le résultat d'une réponse immune T-dépendante, et il a été montré que des clones cellulaires T spécifiques de SEA sont capables de produire une variété de médiateurs activant ou recrutant les cellules intervenant dans la formation du granulome *in vitro* (Lammie *et al.*, 1985). Des cellules T de phénotype suppresseur/cytotoxique interviennent dans un second temps et vont stopper l'expansion du granulome (Chensue *et al.*, 1983). Les antigènes SEA interviennent également par stimulation directe de la prolifération des fibroblastes humains et indirectement par stimulation de lymphocytes et/ou de monocytes à libérer des substances recrutant et activant des fibroblastes qui produisent de la fibronectine et du collagène, éléments constitutifs du granulome (Wylter & Tracy, 1982).

Les peptides résultants de l'hydrolyse des IgG par des protéases sécrétées par les oeufs de *S. mansoni*, sont rapportés comme ayant un rôle dans la modulation du granulome autour des oeufs (Himmi *et al.*, 1985). L'un d'eux, le tripeptide TKP, inhibe la migration des macrophages vers le SEA. De plus, l'injection de TKP à des souris infestées par *S. mansoni* réduit la réponse granulomateuse *in vitro*. La modulation de cette réponse par le TKP semble être une voie de prévention intéressante de la formation du granulome.

3.2 Rôle des ES de schistosomules.

Les produits ES de parasites helminthes peuvent aussi contribuer à l'immunopathogénèse par stimulation de la production d'IgE s'accompagnant de réactions allergiques vis-à-vis d'allergènes d'origine parasitaire ou non (Warren, 1982). Les antigènes SRP de schistosomule induisent une réponse protectrice IgE anti-schistosomule, mais entraînent aussi une élévation générale de la réponse IgE, soit *in vitro* chez des cellules humaines ou de rat en culture, soit *in vivo* chez des rats immunisés par des allergènes non parasitaires. Cette augmentation de la synthèse d'IgE est reliée à une activité de type sérine-protéase du SRP (Verwaerde *et al.*, 1986). Les sérines-protéases sont présentes dans le SRP sous forme de deux molécules : une majeure de 27.5 kDa et une mineure de 29 kDa. Ces deux molécules sont également présentes à la surface du schistosomule et de la cercaire, ainsi que dans un homogénat de schistosomule. Leur intervention dans la régulation de la synthèse d'IgE pourrait résulter de l'augmentation de FcE RII au niveau de la membrane des cellules lymphoïdes (Verwaerde *et al.*, 1988).

3.3. Rôle des complexes immuns: hypersensibilité aux complexes immuns.

La libération par le parasite de substances immunogènes induit la synthèse d'anticorps qui est suivie par la formation de complexes immuns (CI). Ces CI sont à l'origine de l'élimination des antigènes par intervention de cellules polynuclées ou de cellules phagocytaires. Toutefois, les CI sont impliqués dans des cas de lésions pathologiques observées au cours des parasitoses. Ces infections sont d'ailleurs accompagnées de taux élevés de CIC souvent riches en anticorps anti-idiotypes (Lambert *et al.*, 1983).

La schistosomiase est une maladie souvent associée à la présence de CI circulants ou

non (Bout *et al.*, 1977b; Santoro *et al.*, 1980a). Leur rôle régulateur a été observé (Capron *et al.*, 1982): ils peuvent soit favoriser l'action cytotoxique des macrophages et des plaquettes, soit moduler l'activité des éosinophiles. Des dépôts d'antigènes et de complexes immuns circulants sont impliqués dans les pathologies rénales (Van Mark *et al.*, 1982; Warren, 1982; Deelder *et al.*, 1978; Nash, 1982). Les antigènes circulants de schistosomes ont pu être localisés chez l'hôte sous forme de précipités dans le glomérule rénal, (Magalhaes-Filho *et al.*, 1965; Van Marck *et al.*, 1977; Verwaerde *et al.*, 1979; Carlier *et al.*, 1980a; Deelder *et al.*, 1980 et 1985; El-Dosoky *et al.*, 1984) ainsi que des antigènes de schistosome, les immunoglobulines (IgG, IgM et IgE) et la fraction C3 du complément (Hoshino-Schimizu *et al.*, 1975). L'activation du complément par les CI semble être un des mécanismes dans l'apparition des lésions glomérulaires (Santoro *et al.*, 1980a) et hépato-intestinales ou hépatospléniques (Galvao-Castro *et al.*, 1981). Un mécanisme analogue à la maladie sérique est incriminé dans la schistosomiase aiguë (fièvre de Katayama) et la présence de dépôts d'antigènes circulants dans les macrophages de la rate (El-Dosoky *et al.*, 1984; Deelder *et al.*, 1985) et les cellules de Küpfer du foie (Van Marck, 1975; Deelder *et al.*, 1980; El-Dosoky *et al.*, 1984; Salama *et al.*, 1984) pourrait intervenir dans le développement de l'immunopathologie de la schistosomiase. La formation d'autoanticorps (anti-IgG) pourrait être susceptible d'aggraver les lésions.

Une association entre le taux de CIC spécifiques et la pathologie parasitaire est en général observée. Le taux des CIC est apparemment plus élevé dans la schistosomiase aiguë que dans l'infestation chronique sans séquelles graves. Ce même taux est élevé chez les sujets présentant une hépatosplénomégalie. Dans la wuchérériose, le taux et la fréquence de CIC sont supérieurs chez les patients symptomatiques par rapport aux sujets microfilarémiques/asymptomatiques (Dissanayake *et al.*, 1982; Das *et al.*, 1987). Dans l'onchocercose, des lésions dermiques (Sisley *et al.*, 1987) et oculaires (vascularites) semblent associées au dépôt de CI. Toutefois, l'hypersensibilité à complexes immuns dans les filarioses n'a pas encore été démontrée de façon convainquante.

CHAPITRE V

LES ECDYSTEROIDES CIRCULANTES ET URINAIRES DANS LES HELMINTHIASES

A. LES ECDYSTEROIDES DANS LES SCHISTOSOMIASES.

Des hormones ecdystéroïdes d'invertébrés, l'ecdysone et la 20- hydroxy-ecdystérone qui sont connues comme hormones de mues des insectes, sont présentes chez le schistosome, *S. mansoni* (Torpier *et al.*, 1982; Nirdé *et al.*, 1983). Ces hormones ecdystéroïdes sont présentes à tous les stades du schistosome, même à l'état d'oeuf. Même si leur présence chez le schistosomule doit être imputée à une contamination par l'hôte intermédiaire *B. glabrata*, il ne semble pas en être de même pour le jeune schistosome (J 11) et le ver adulte (J 40), chez lesquels une synthèse endogène est suspectée (Nirdé *et al.*, 1984; Nirdé, 1988). En effet, ces hormones sont détectées à deux moments privilégiés de la biologie du parasite: au jour 11 après l'infestation, lorsque le jeune ver est en phase exponentielle de croissance vers le stade adulte; au jour 40 après l'infestation lorsque les vers réalisent leur maturation sexuelle et commencent à pondre. Le rôle de ces hormones dans le développement et la reproduction du parasite, est illustré par la réduction de la charge parasitaire du hamster et de la souris infestés par les schistosomes après immunisation de ces rongeurs par des immunogènes ecdystéroïdes (Nirdé, 1988).

L'ecdysone et la 20-hydroxy-ecdysone, peuvent être détectés dans le sérum et les urines d'hôtes infestés par *S. mansoni* (Torpier *et al.*, 1982; Nirdé *et al.*, 1983 et 1984): dans l'infestation expérimentale dès le 6^{ème} jour et chez l'homme alors que l'examen parasitologique est encore négatif. L'analyse d'urines de jeunes bilharziens, infestés par le parasite *S. haematobium*, révèle la présence d'hormones ecdystéroïdes. Après traitement par une chimiothérapie spécifique (Oltipraz^R), les ecdystéroïdes urinaires diminuent de manière significative dès le 4^{ème} jour après le traitement (Nirdé, 1988).

Même en l'absence de preuves directes de la biosynthèse d'hormones ecdystéroïdes par le parasite, on peut admettre que des ecdystéroïdes sont excrétés par les parasites *in vivo* dans la circulation de l'hôte. La détection de ces ecdystéroïdes peut ainsi être utilisée comme

indicateur d'une helminthiase.

B. LES ECDYSTEROÏDES DANS LES FILARIOSES ET AUTRES NEMATODOSES.

La présence d'hormones ecdystéroïdes a été établie chez divers nématodes dont des nématodes parasites d'animaux , comme *Haemonchus contortus* (Denis, 1977), *Parascaris equorum* (O'Hanbon *et al.*, 1987), et la parasite humain *Ascaris lumbricoïdes* (Horn *et al.*, 1974).

Dans des infestations expérimentales du rongeur *Mastomys natalensis* par les filaires *L. carinii* , *D. vitae* et *B. pahangi*, des ecdystéroïdes ont été détectés dans la circulation de cet animal (Koolman *et al.*, 1984). Une part du taux des ecdystéroïdes détectées reviendrait pourtant à une origine alimentaire selon ces auteurs.

Dans l'infestation expérimentale par *B. malayi*, les hormones ecdystéroïdes apparaissent dès le 7^{ème} jour après l'infestation, et les pics d'ecdystéroïdes sériques semblent correspondre , à la fois, avec les mues parasitaires et la ponte des microfilaires par les vers femelles (Nirdé, 1988, Nirdé *et al.*, soumis). Le rôle de ces ecdystéroïdes comme facteur stimulant le développement et la reproduction de cette espèce filarienne est suggéré.

Deuxième partie

RESULTATS

**LES ANTIGENES ET LES COMPLEXES IMMUNS CIRCULANTS
DANS LES FILARIOSES LYMPHATIQUES**

Article 1

Filariose lymphatique humaine: détection d'antigènes circulants et urinaires et différence dans les isotypes d'anticorps complexés aux antigènes circulants entre les sujets symptomatiques et asymptomatiques.

Le diagnostic des filarioses est rendu difficile par la variété et la faible spécificité de la symptomatologie, la fréquence des formes amicrofilarémiques et l'étendue des réactions croisées retrouvées en sérologie. L'approche immunodiagnostique a visé par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules excrétées/sécrétées (produits ES) à la détection dans le sérum de sujets infectés de molécules ES, dans l'espoir qu'elles soient le témoin d'une infection active, et constituent une aide déterminante au diagnostic.

L'anticorps monoclonal de souris anti-*Brugia malayi*, AA3-44, qui est cytotoxique pour les microfilaires en présence de macrophages a été décrit par Aggarwall *et al.* (1985). Son étude rapportée dans le présent article a révélé qu'il est dirigé contre des molécules de 42 et 115 kDa présentes à la surface des stades L1, L3 et adultes de *B. malayi*.

Cet anticorps a permis de développer un test immunoradiométrique à double site (2S-IRMA) pour détecter des antigènes circulants non seulement dans le sérum mais aussi dans l'urine des patients infectés. Ainsi, dans une série de prélèvements de 35 patients du Sri Lanka infestés par *Wuchereria bancrofti*, des produits d'origine parasitaire sont décelés dans toutes les urines, alors que 50% seulement des sérums correspondants sont positifs. Parmi les patients présentant des antigènes circulants, 80% des sujets sont microfilarémiques/asymptomatiques et 20% sont amicrofilarémiques/ symptomatiques. Le plus fort taux de positivité chez les patients microfilarémiques laisse supposer une relation entre microfilarémie et taux d'antigènes

circulants. Il n'existe pourtant pas de corrélation entre les deux paramètres, peut-être en raison de la réponse anticorps vis-à-vis des antigènes circulants. Bien que tous les patients présentent des antigènes urinaires, l'antigénémie est double chez les patients symptomatiques par rapport aux sujets asymptomatiques / amicrofilarémiques. Les résultats obtenus dans le sérum et l'urine ne sont pourtant pas directement comparables, car dans le sérum l'antigène peut être complexé, alors qu'il ne l'est pas dans l'urine dans des conditions physiologiques normales. La même quantité d'antigène peut fixer davantage de traceurs (AA3-44 radiomarqué) si elle est contenue dans l'urine, alors que dans le sérum certains épitopes théoriquement accessibles au traceur sont déjà saturés par les anticorps de l'hôte infesté.

L'utilisation de l'anticorps AA3-44 a également permis de mettre en évidence des complexes immuns circulants spécifiques et de montrer que l'isotype des immunoglobulines complexées à ces molécules est en rapport avec le statut clinique des malades. Les sérums qui présentent des immunoglobulines G fixées à l'antigène circulant correspondent aux patients filariens souffrant d'oedème lymphatique ou d'éléphantiasis, tandis que ceux qui n'ont que des immunoglobulines M proviennent plutôt de patients asymptomatiques. Cette différence isotypique suggère l'existence de mécanismes de régulation immune affectant l'expression des manifestations cliniques de la filariose lymphatique.

L'anticorps AA3-44 détecte des antigènes circulants dans les filarioses lymphatiques, mais également dans d'autres filarioses (Loase, Onchocercose) et d'autres nématodoses (Ankylostomiase, Strongyloïdose).

Lymphatic filariasis: detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects

C. LUTSCH, J. Y. CESBRON, D. HENRY, J. P. DESSAINT, K. WANDJI, M. ISMAIL* & A. CAPRON Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France and

* Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Colombo, Sri Lanka

(Accepted for publication 2 September 1987)

SUMMARY

A two-site immunoradiometric assay using a monoclonal antibody (MoAb) against *Brugia malayi* microfilariae allowed the detection of parasite molecules both in the serum and the urine of patients from Sri Lanka infected with *Wuchereria bancrofti*. Whereas 50% of patients had no antigen in their serum, all of them excreted detectable amounts of antigen in their urine, the levels being higher in symptomatic than in asymptomatic patients. The poor detection in serum appeared to be related to the presence of circulating immune complexes. It was shown that the isotype of the antibodies complexed with the circulating antigen was IgM in the asymptomatic group, while it was mainly IgG in the symptomatic patients (swelling and lymphoedema or elephantiasis). These results suggest the existence of regulatory immune mechanisms affecting the clinical expression of lymphatic filariasis.

Keywords circulating antigens and immune complexes filariasis radioimmunoassay

INTRODUCTION

Wuchereria bancrofti, *Brugia malayi* and *Brugia timori* are the causative agents of lymphatic filariasis which affects nearly 200 million people in the tropics and the subtropics (Warren & Mahmoud, 1983). The knowledge of the pathogenesis and immunology of this disease has been difficult to acquire both due to the lack of suitable models that mimic all aspects of the human disease, and to the impossibility of defining a correlation between the parasitological, clinical and immunological statuses (Selkirk *et al.*, 1986). Indeed, filarial disease may often occur without detectable microfilaraemia, making parasitological confirmation of infection extremely difficult. Moreover, the broad spectrum of cross-reactivity between species of nematodes, especially Filarids, frustrates serological diagnosis (WHO, 1984).

In this report, a monoclonal antibody probe against *Brugia malayi* (Aggarwal *et al.*, 1985) is used to demonstrate the presence of circulating filarial antigen in the serum and urine of patients infected with *Wuchereria bancrofti*. We show that the isotype of the antibodies complexed with circulating antigen is closely related to the clinical status of the patients.

Correspondence: Charles Lutsch, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

MATERIALS AND METHODS

Collection of *Brugia malayi* larvae

The *Brugia malayi* life cycle was maintained as described by Sanger, Lammeler & Kimming (1981). Briefly, the adult females and microfilariae (L1 worms) were harvested from the peritoneal cavity of jirds infected 6 months previously with 70 infective larvae (L3 worms). Parasites were collected and washed extensively in RPMI 1640 (Gibco, New York, USA) supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The female worms, maintained in serum-free medium (RPMI) supplemented with penicillin and streptomycin under a gas phase of 5% CO₂ in air at 37°C produced L1 worms. These L1 *in vitro* (to distinguish them from L1 derived *in vivo* as described above), were collected by filtration through a 0.22 µm filter (Schleicher and Schüll, Dassel, FRG); the culture medium was stored at -20°C.

Third stage larvae (L3) were harvested from *Aedes aegypti* mosquitos fed 13 days previously on *Mastomys natalensis* rats with a microfilaraemia level of 80 to 150 larvae in 20 mm³ peripheral blood as described by Tandon *et al.* (1983). The collected larvae were washed five times in RPMI to remove small host debris.

Preparation of saline antigenic extract

Brugia malayi adult worms were obtained as described above. The *Dipetalonema vitae* adults were extracted from the subcutaneous tissues of hamsters (*Mesocricetus auratus*) (Haque *et al.*, 1978) and *Onchocerca volvulus* adult worms were obtained by dissection of subcutaneous nodules surgically removed from African patients.

The crude antigenic extract of these various parasites was processed by the method of Capron, Gentilini & Vernes (1968) modified by the addition of 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF, Sigma, St Louis, Mo) plus 100 IU/ml of aprotinin (Sigma) in saline buffer.

Soluble antigens from *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus* (hydatid fluid), *Ascaris suum* and *Toxoplasma gondii* were prepared by the same method. The protein concentration was determined by the Biorad (Bio-Rad, Richmond, California) assay procedure (Bradford, 1976).

Human sera and urine collection

Early morning sera and urines from Sri Lanka were supplied by Professor M. Ismail and Dr S. Dissanayake (Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Colombo, Sri Lanka). The patient groups infected with *W. bancrofti* consisted of: (i) asymptomatic individuals with microfilariae in their blood, (ii) subjects with characteristic filarial syndrome (i.e. swelling and lymphoedema or elephantiasis). The control group consisted of eight subjects living in the same areas but with no clinical or serological evidence of past or current filarial infection. They were also negative in an immunofluorescence antibody test using intact *W. bancrofti* microfilariae (Jayawardene & Wijayaratanam, 1968). This serological test was carried out by the field investigators. Blood samples were allowed to clot and sera were separated by centrifuging at 1,000 g for 10 min. The samples were stored at -20°C and sent to Lille where they were received frozen. No other clinical or biological information were available.

Sera from patients infected with *Loa loa*, *Mansonella perstans*, *Strongyloides stercoralis*, *Ancylostoma duodenale* and *Schistosoma mansoni* were supplied by Dr M. Barbier (Laboratoire de Pathologie Exotique et Parasitaire, Hôpital International de l'Université de Paris, France); concomitant gastrointestinal infections were eliminated by coprological examinations. Sera from patients infected with *Onchocerca volvulus* were supplied by Dr T.R. Guigende (Centre Muraz, Bobodioulasso, Burkina Faso). Sera from hepatitis B patients and from individuals with multisystem immune disease with antinuclear antibodies detected by the immunofluorescence antibody test (IFAT), or rheumatoid factors detected by laser nephelometry (Hyland Diagnostics) were used as additional control sera.

Monoclonal antibody: purification and radiolabelling

The monoclonal antibody (MoAb) designated AA3-44 (Mouse IgM), directed against the surface of *Brugia malayi* microfilariae, has been previously described by Aggarwal *et al.* (1985).

The IgM fraction was purified from ascitic fluid by gel filtration on an Ultrogel ACA 34 column (IBF, Villeneuve la Garenne, France). The buffer used was 20 mM Tris-HCl, 0.35 M NaCl, 0.1% (w/v) NaN_3 . After purification, the IgM immunoglobulins were dialysed against phosphate buffered saline (PBS), 10 mM, pH 7.2 and stored at -70°C .

The purified monoclonal antibodies were labelled with iodine (^{125}I) using the chloramine T procedure described by Hunter & Greenwood (1963). The average specific activity was 1 mCi/mg (37 MBq/mg).

Two-site immunoradiometric assay for the detection of circulating antigen

Flexible polyvinyl plates (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard USA) were coated with 100 μl mouse monoclonal antibody (AA3-44, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluted in 10 mM PBS buffer by incubation for 24 h at 4°C . Unbound monoclonal antibody was removed by five extensive washings of the microplates with PBS containing 0.02% (w/v) Tween 20 (Labosi, Paris, France). Aliquots of 100 μl of the samples diluted 1/2 (v/v) in PBS were added and the plates incubated for 3 h at room temperature. After five washes in PBS-Tween, 100 μl of radioiodinated AA3-44 monoclonal antibody (50,000 ct/min/well) were incubated for 12 h at 4°C . The unbound radioactive antibody was aspirated and the wells were washed five times with 200 μl of PBS-Tween. The radioactivity of each well was measured in a gamma counter (LKB, 1272 Clinigamma, Turku, Finland). Each test was performed in duplicate. The results were expressed as the equivalent dry-weight of a saline extract of *B. malayi* adult worms diluted either in normal serum or urine. The limit of positivity was fixed at 2 s.d. above the mean ct/min value for European sera. Statistical analysis of the results included a one way analysis of variance, Student's *t*-test and the linear correlation test.

Capture test for the determination of the isotypes of the antibodies complexed with filarial antigen

Anti-human IgG, IgM or IgE were used to detect antibodies complexed with the circulating antigen captured by AA3-44 coated on the plates. The first step of the reaction was identical to that of the assay for the detection of circulating antigen (same concentration of the monoclonal antibody coated and same dilution of the serum). Antibodies bound to circulating antigen were detected by overnight incubation at 4°C with radiolabelled monospecific anti-human IgG or IgM (Institut Pasteur Production, Marnes la Coquette, France) or IgE (Pharmacia), 100,000 ct/min/well, with an approximate specific activity of 37 MBq/mg. The plates were then processed as described above. Each test was performed in duplicate. Results were expressed as ct/min value/mean ct/min value of 10 European normal sera. The cut-off binding level was determined as the 95% confidence limit of binding obtained with control sera.

Radiolabelling and immunoprecipitation of radiolabelled surface components of parasite antigens

Radiolabelling of the parasite antigens was carried out using the Iodogen technique (Markwell & Fox, 1978). In the case of L1 *B. malayi* larvae, between 70,000 and 100,000 intact larvae suspended in Hank's balanced salt sodium (HBSS), were incubated with 0.5 mCi (18.5 MBq) ^{125}I sodium iodide (Amersham) in a 1.5 ml Eppendorf centrifuge tube coated with 200 μg Iodogen (Pierce, Rockford, IL). After incubation at room temperature for 10 min, the reaction was stopped with 0.5 M sodium iodide and the microfilariae washed in HBSS containing 1 mM PMSF. The radiolabelling of adult worms and L3 larvae required 100 μg protein and 100 larvae, respectively.

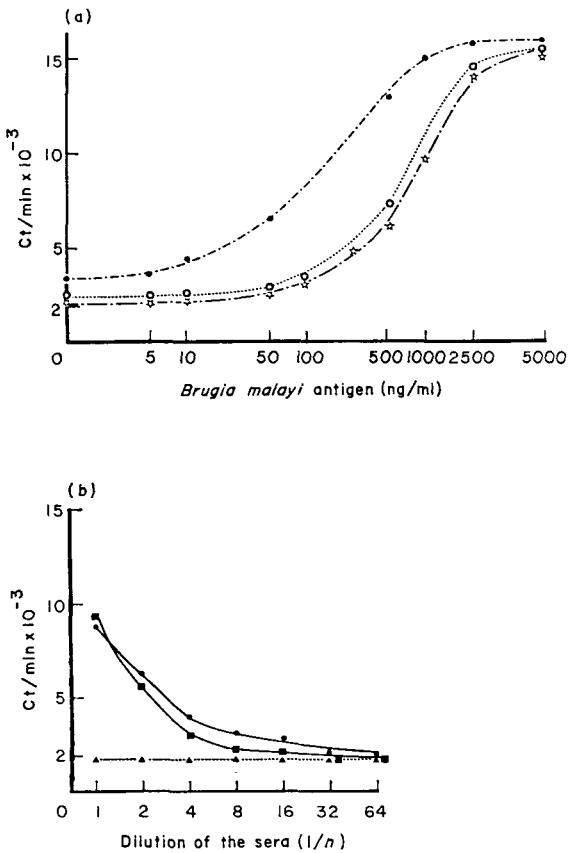


Fig. 1 (a) Standard curves obtained in the 2S-IRMA by using PBS (●), normal non-endemic control serum (☆) and urine (★) to which *B. malayi* antigenic extract (dry weight of lyophilized material) was added. (b) Dilution curves of two *B. malayi* infected sera (■, ●) and one non-endemic control serum (▲) in the 2S-IRMA.

The radiolabelled parasites were solubilized by incubation in 1% Nonidet P-40 in 62.5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM PMSF and 1 mM L-1-tosylamide-2-phenylethyl-chloromethylketone (TPCK) (Sigma) for 30 min at 4°C. Solubilized material was recovered by centrifugation in a microcentrifuge at 10,000 *g* for 10 min at 4°C. Immunoprecipitation with AA3-44 was carried out as previously described (Taylor, Cordingly & Butterworth, 1984). Immunoprecipitated antigens were analysed by electrophoresis under reducing conditions on 13% SDS-polyacrylamide slab gels using the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). The gels were dried and autoradiographed using Kodak X-Omat RP film (Eastman Kodak, Rochester, NY).

RESULTS

Optimization of the two-site immunoradiometric assay for the detection of circulating antigen

Since the AA3-44 MoAb immunoprecipitated *B. malayi* antigen by the Ouchterlony technique, it was concluded that the target molecule of AA3-44 bore repetitive epitopes and that it could be used as both the solid phase and the detecting antibody probe in a two-site immunoradiometric assay (2S-IRMA). Preliminary experiments were carried out to determine the optimal concen-

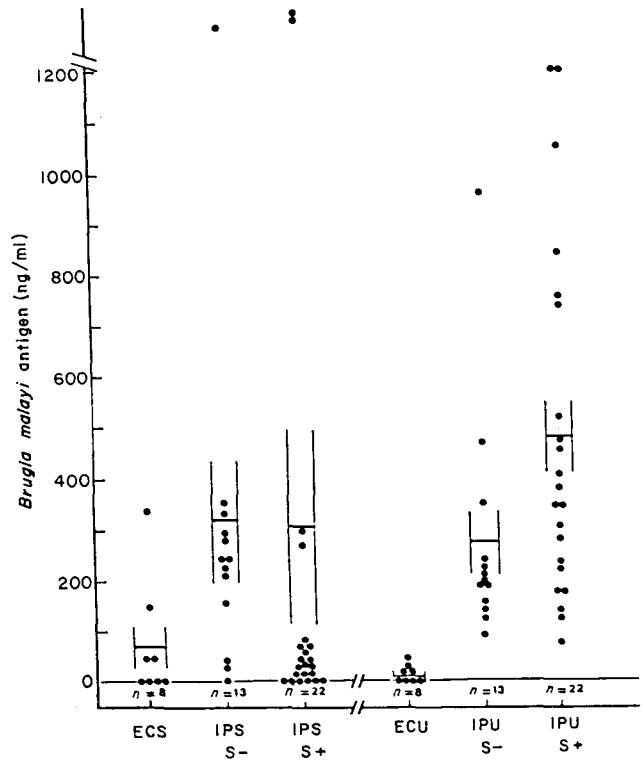


Fig. 2. Detection by 2S-IRMA of filarial antigen in serum (S) and urine (U) from endemic controls (EC) and from *W. bancrofti* infected patients (IP), either asymptomatic/microfilaremic (S-) or symptomatic/microfilaremic (S+).

trations of AA3-44 MoAb coated on the wells, and of the specific activity of radiolabelled AA3-44 used for detection, and the best conditions of time and temperature. Figure 1(a) represents the standard curves obtained with increasing concentrations of antigen added in buffer, serum or urine diluted 1:2 (v/v). Approximately 30% of the 50,000 ct/min used in the assay were bound in the presence of an excess of the *B. malayi* antigen added in the assay. In biological liquids, the maximum sensitivity was obtained in the range 50–2500 ng/ml.

The applicability of the 2S-IRMA assay to the detection of circulating filarial antigen was shown by serial dilutions of two infected human sera (Fig. 1b). Linearity was found down to 1:8 (v/v) and 1:16 (v/v) dilutions. As the background observed with European normal sera was not significant at a dilution of 1:1 (v/v) (20 ± 16 ng/ml, $n = 10$), this dilution was used in the tests. A sample was considered antigen positive when the radioactivity bound was greater than the 95% confidence limit of the apparent *B. malayi* antigen level in the non-endemic control sera tested, i.e. 52 ng/ml.

Filarial antigen was detected in the serum and urine of infected patients

Only 50% of the infected patients had detectable circulating filarial antigen in their serum, although the mean level detected for this group was significantly higher than that of the endemic controls ($x = 305.7$ ng/ml, s.e.m. = 119.4 ng/ml, $n = 35$, range 0–3100 ng/ml; $x = 74.4$ ng/ml, s.e.m. = 43.3, $n = 8$, range 0–350 ng/ml, respectively) (Fig. 2). Two of eight endemic controls had more than 52 ng/ml of circulating antigen (the cut-off value).

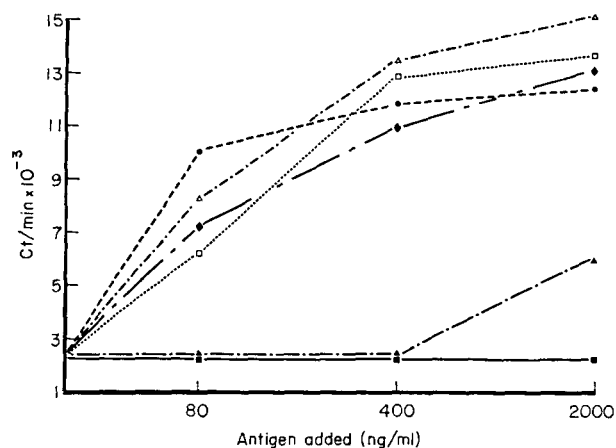


Fig. 3. Specificity of the 2S-IRMA. Increasing quantities of crude soluble extract of *O. volvulus* (Δ), *D. viteae* (\blacklozenge), *A. suum* (\bullet), *F. hepatica* (\blacktriangle), *S. mansoni* (\blacksquare), *E. granulosus* (\blacksquare), *T. saginata* (\blacksquare) and *Toxoplasma gondii* (\blacksquare) were added in PBS instead of *B. malayi* (\square) antigen as in Fig. 1.

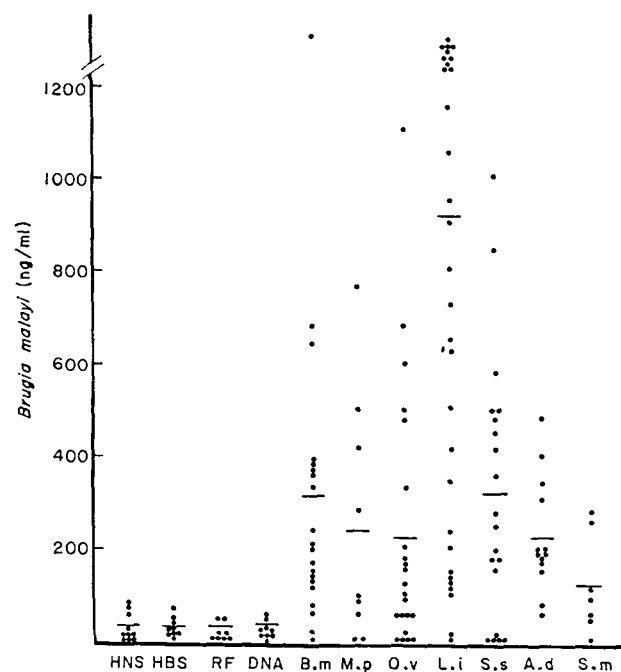


Fig. 4. Specificity of the 2S-IRMA. Detection of circulating antigen in the sera both from European: either healthy (HNS) or infected with hepatitis B (HBS), or with rheumatoid factor (RF) or with anti-DNA antibodies (DNA), and from patients with various parasitic diseases: *Brugia malayi* (B.m.), *Mansonella perstans* (M.p.), *Onchocerca volvulus* (O.v.), *Loa loa* (L.i), *Strongyloides stercoralis* (S.s.), *Ancylostoma duodenale* (A.d.) and *Schistosoma mansoni* (S.m.).

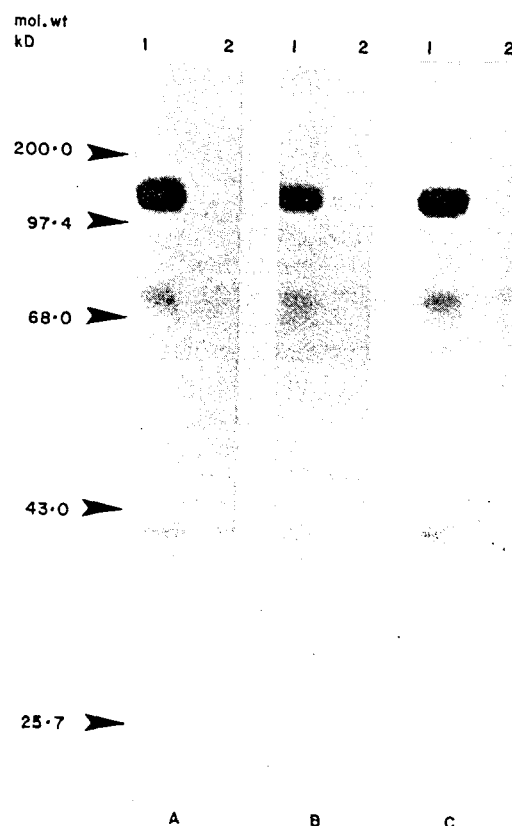


Fig. 5. Immunoprecipitation of radioiodinated surface antigen of various *B. malayi* stages: L1 *in vivo* (A), L1 *in vitro* (B) and L3 (C), by AA3-44 MoAb (1) and a mouse anti-*Leishmania donovani* MoAb (2) as control.

All the urine samples collected from endemic controls had undetectable antigen levels (\bar{x} = 9.2 ng/ml, s.e.m. = 4.5 ng/ml, n = 8) and all those from infected patients were found positive (\bar{x} = 404.1 ng/ml, s.e.m. = 53.4 ng/ml, n = 35, range 80–1200 ng/ml) (Fig. 2). This discrepancy was not attributable to renal dysfunction of the patients since their serum and urinary creatinine levels were within normal limits (data not shown).

Comparing the antigen levels in accordance with the clinical status of the infected patients, we observed that most of the subjects (15/22) with symptoms of lymphatic filariasis (swelling and lymphoedema or elephantiasis) had no detectable circulating antigen (Fig. 2). However, the antigenemia of the symptomatic patients was not significantly different from that of the asymptomatic subjects (\bar{x} = 303.7 ng/ml, s.e.m. = 186.0 ng/ml and \bar{x} = 318.6 ng/ml, s.e.m. = 124.2 ng/ml, respectively) (Fig. 2). In urine, the difference between the antigen concentration of symptomatic patients and the asymptomatic group (\bar{x} = 480.7 ng/ml, s.e.m. = 72.3 ng/ml and \bar{x} = 274.5 ng/ml, s.e.m. = 63.4 ng/ml respectively) was statistically significant (P < 0.05). Nevertheless, no correlation was found between circulating or urinary antigen levels and microfilaremia.

Specificity of the AA3-44/2S-IRMA

We tested the specificity of our AA3-44/2S-IRMA using various filarial and non-filarial parasite saline extracts. As shown in Fig.

Circulating and urinary *Wuchereria bancrofti* antigenTable 1. Detailed data concerning the serial samples from *W. bancrofti* infected patients

| Patient no. | Clinical status | Microfilaræmia per ml | Circulating antigen ng/ml serum | Urinary antigen ng/ml urine | Immunoglobulin complexed with circulating antigen | | | |
|-------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------------|-----------------------------|---|-----|------|----|
| | | | | | IgG | IgM | | |
| 134 | Swelling + Lymphoedema | ND | 13 | 410 | 3.06 | + | 2.21 | + |
| 101 | Swelling + Lymphoedema | 0 | 44 | 380 | 3.04 | + | 2.21 | + |
| 127 | Swelling + Lymphoedema | ND | 68 | 345 | 2.90 | + | 1.70 | + |
| 111 | Swelling + Lymphoedema | ND | 2600 | 225 | 2.89 | + | 4.06 | + |
| 107 | Swelling + Elephantiasis | ND | 0 | 180 | 2.48 | + | 2.28 | + |
| 96 | Swelling + Lymphoedema | 0 | 180 | 270 | 2.42 | + | 2.39 | + |
| 126 | Swelling + Lymphoedema | ND | 40 | 760 | 2.27 | + | 3.20 | + |
| 133 | Swelling + Elephantiasis | ND | 300 | 80 | 2.15 | + | 3.00 | + |
| 84 | Swelling + Elephantiasis | 0 | 15 | 740 | 1.92 | + | 1.99 | + |
| 63 | Asymptomatic | 722 | 240 | 240 | 1.87 | + | 2.51 | + |
| 90 | Asymptomatic | 808 | 350 | 360 | 1.67 | + | 2.20 | + |
| 132 | Swelling + Lymphoedema | ND | 0 | 1050 | 3.12 | + | 0.63 | - |
| 135 | Swelling + Lymphoedema | ND | 0 | 345 | 2.79 | + | 1.29 | - |
| 71 | Swelling + Elephantiasis | ND | 0 | 840 | 2.51 | + | 1.15 | - |
| 34 | Swelling + Lymphoedema | 0 | 56 | 1200 | 2.24 | + | 1.63 | - |
| 123 | Asymptomatic | 12 | 210 | 94 | 1.92 | + | 0.73 | - |
| 103 | Swelling + Lymphoedema | ND | 15 | 1200 | 1.77 | + | 0.54 | - |
| 129 | Swelling + Elephantiasis | ND | 36 | 140 | 1.77 | + | ND | ND |
| 102 | Swelling + Lymphoedema | ND | 0 | 460 | 1.75 | + | 0.19 | - |
| 124 | Asymptomatic | 810 | 240 | 195 | 1.35 | - | 3.35 | + |
| 125 | Asymptomatic | 23 | 280 | 200 | 1.42 | - | 3.20 | + |
| 92 | Asymptomatic | 108 | 330 | 220 | 1.07 | - | 3.17 | + |
| 120 | Asymptomatic | 102 | 290 | 160 | 1.07 | - | 2.87 | + |
| 79 | Asymptomatic | 197 | 37 | 140 | 0.87 | - | 2.69 | + |
| 61 | Asymptomatic | 128 | 220 | 470 | 0.76 | - | 2.42 | + |
| 49 | Swelling + Elephantiasis | 0 | 32 | 310 | 1.34 | - | 2.02 | + |
| 121 | Asymptomatic | 168 | 155 | 125 | 1.55 | - | 1.95 | + |
| 80 | Asymptomatic | 89 | 30 | 210 | 1.50 | - | 1.67 | + |
| 105 | Swelling + Elephantiasis | 0 | 0 | 475 | 1.43 | - | 1.12 | - |
| 122 | Asymptomatic | 1027 | 0 | 195 | 0.97 | - | 1.06 | - |
| 118 | Swelling + Elephantiasis | 0 | 0 | 520 | 0.65 | - | 1.16 | - |
| 02 | Endemic control | 0 | 45 | 0 | 2.35 | + | 2.73 | + |
| 11 | Endemic control | 0 | 50 | 0 | 1.54 | - | 2.84 | + |
| 14 | Endemic control | 0 | 0 | 8 | 1.49 | - | 2.38 | + |
| 19 | Endemic control | 0 | 150 | 0 | 1.47 | - | 3.13 | + |
| 04 | Endemic control | 0 | 0 | 28 | ND | | ND | |
| 08 | Endemic control | 0 | 0 | 8 | ND | | ND | |
| 09 | Endemic control | 0 | 0 | 30 | ND | | ND | |
| 15 | Endemic control | 0 | 350 | 0 | ND | | ND | |

The results of circulating antigen detection were expressed in ng of equivalent dry weight of adult *B. malayi* crude extract. In the assay of complexed filarial antigen, the value of specific immune complexes was calculated as follows:

$$\frac{\text{Net ct/min value}}{\text{Mean ct/min value of 10 healthy European control sera}}$$

The cut-off binding level was determined as the 95% confidence limit of binding with 10 healthy European sera: 1.63 for detection of complexed IgG and 1.66 for complexed IgM.

3, *O. volvulus*, *D. vitae* and *A. suum* adult worm antigen gave curves parallel to the standard established with *B. malayi* adult worm antigen. *Schistosoma mansoni*, *T. saginata* adult worm antigen and *E. granulosus* (hydatid fluid) antigen were not recognized by AA3-44, but *F. hepatica* adult worm antigen seemed to cross-react when high concentrations of protein were used.

As shown in Fig. 4, sera from non-exposed individuals that contained rheumatoid or anti-nuclear auto-antibodies gave apparent levels of filarial antigen below the limit of positivity, but a significantly raised level of detected circulating antigen was observed with sera from patients native to tropical areas and infected by *B. malayi*, *Mansonella perstans*, *O. volvulus*, *Loa loa*, *S. stercoralis*, *A. duodenale* and *S. mansoni*.

Immunoprecipitation of radiolabelled parasite antigens by AA3-44

In this set of experiments, we were able to confirm that the AA3-44 target epitope on circulating antigens was present on the surface of *B. malayi*. Figure 5 shows the surface antigens of L1 *in vivo*, L1 *in vitro*, L3 *B. malayi* larvae immunoprecipitated by AA3-44. This immunoprecipitation yields two bands of approximately 115 kD and 42 kD with L1 (*in vivo* and *in vitro*) and L3.

Assay of complexed filarial antigen by a capture test

Symptomatic patients have undetectable or low levels of antigenemia but excrete a small amount of antigen in the urine, and it is known that such patients have higher anti-filarial antibody levels than do asymptomatic patients (Ottesen *et al.*, 1982). These observations taken together suggested that the circulating antigen was complexed in sera with the corresponding antibodies.

The total level of circulating immune complexes was investigated by the radiolabelled C1q binding test described by Nydegger *et al.* (1974). The results were negative, except for four samples (one from an asymptomatic patient, two from symptomatic patients and one from an endemic control).

Finally, a capture test was devised to analyse the composition of filarial specific immune complexes. Positive results were obtained with infection sera using ¹²⁵I anti-human IgM and IgG, while no complexed IgE could be detected in these conditions. Only four samples among endemic controls and 31 from infected subjects were available at this stage of the study in sufficient quantities to be tested. The detailed results are given in Table 1. The comparison of symptomatic and asymptomatic patients showed that CA-bound IgG were mainly detected in patients with swelling and lymphoedema or elephantiasis, whereas most asymptomatic subjects had CA-bound IgM only.

DISCUSSION

Immunodiagnosis of filarial infections is increasingly focused on efforts to detect and to characterize circulating filarial products, especially in the absence of the direct observation of parasites. In this study, we developed a two-site immunoradiometric assay using an MoAb which has been used to purify filarial excretory antigens (FEA) from the culture medium of *B. malayi* larvae. These FEA were needed to activate diethylcarbamazine (DEC) treated platelets, leading to the killing of *B. malayi* microfilariae (Cesbron *et al.*, 1987). Taken together, these results demonstrate the presence of the same antigenic determinants in the circulat-

ing and excretory antigens, as observed by Maizels, Denham & Sutanto (1985).

The presence of the target epitope on the surface of *B. malayi* larvae was demonstrated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis which revealed two major components of 115 kD and 42 kD. These profiles could be compared with those obtained on *B. malayi* and *P. pahangi* by Selkirk (1986) and Sutanto, Maizels & Denham (1986) respectively who characterized a 100 kD and a 45 kD protein on the surface of adult worms. In addition, a 110 kD molecule could be identified by immunoblotting surface preparations of infective larvae (L3) and adult worms using sera from jirds immunized with microfilariae (L1), whereas sera from jirds infected with L3 larvae recognized a 42 kD surface antigen of microfilariae (Kazura, Cicirello & McCall, 1986). The 115 kD target surface molecule is not likely to be detected in urine, given its molecular weight. However, the antigens detected in urine may well be degradation products of the native molecules.

The cross-reactivity between different parasitic nematodes, particularly within Filarids, and especially *B. malayi* and *W. bancrofti* has been remarked upon for many years (Oliver-Gonzalez & Morales 1945; Capron *et al.*, 1968) and is probably due, in part, to the phosphorylcholine nature of the epitope recognized by the antibodies used (Maizels, Burke & Denham, 1987). The degree of cross-reactivity of the AA3-44 target epitope (Fig. 3) indicated clear cross-reactivity with filarids and the gastrointestinal nematodes but not with the trematodes and the cestodes tested. The positivity of sera from patients with non-nematodal infections (schistosomiasis) (Fig. 4), could be due either to occult filarial infections since they are collected in areas where filarial transmission occurs, or to undiagnosed gastrointestinal nematodes. However, the sera from Sri Lanka were sampled from a homogenous population and it can be assumed that the putative gastrointestinal infections were homogeneously distributed, and could thus not account for the data obtained in relationship with the clinical status of the patients.

Indeed, in the case of subjects living in areas of Sri Lanka where lymphatic filariasis is endemic, circulating antigen was detected in approximately 80% of the microfilaremic/asymptomatic patients, in 20% of the symptomatic (swelling and lymphangitis or elephantiasis) patients and in 25% of the eight endemic controls. The data are comparable to those of similar tests developed with monoclonal antibodies by previous investigators in lymphatic filariasis (Dissanayake *et al.*, 1984; Hamilton, Hussain & Ottesen, 1984; Forsyth *et al.*, 1985).

The fact that the highest percentage of antigen positive sera was in the microfilaremic patient group suggested a relationship between microfilaremia and the level of circulating antigen, as reported by Forsyth *et al.* (1985). However, in our study no significant correlation between antigenemia and microfilaremia was noted, in accordance with the observation of Dissanayake *et al.* (1984) and Hamilton *et al.* (1984). As noted by various authors (Dissanayake *et al.*, 1984; Hamilton *et al.*, 1984; Forsyth *et al.*, 1985), this suggested that the absence of correlation observed in man could be due to the antibody response against circulating antigen.

Since various helminth parasite products have been detected in the urine of experimentally infected animals (Gold, Rosen & Weller, 1969) and humans (Dissanayake *et al.*, 1984; Paranjape *et al.*, 1986; Nogueira-Queiroz *et al.*, 1986), and since antibodies

may be expected not to interfere in this medium in the absence of renal failure, we investigated the presence of circulating antigen in the urines paired to the serum samples. In these conditions, antigen could be readily detected in urines from 35/35 infected individuals, with no false positives in the endemic controls. Moreover, symptomatic patients generally had higher urine antigen levels than the asymptomatic/microfilaremic subjects. The fact that the urines corresponding to the two positive sera among the endemic controls were negative, suggested the presence of immune complexes in slight antibody excess, which could be detected in serum by binding of AA3-44 to some free epitopes, but the size of which was too large to allow a passage through the glomerular filter. This hypothesis was supported by the detection of specific immune complexes in these sera, in accordance with the fact that in the prepatent phase of the disease a significant level of antifilarial antibody is generally found (Ottesen *et al.*, 1982). Another possibility could have been the detection of antiidiotype antibodies by AA3-44. However, the immunoglobulins separated from the complexes were able to recognize *B. malayi* antigen (data not shown).

Since the poor sensitivity of the detection of circulating antigen in serum appeared related to the presence of circulating immune complexes, we studied the isotype of the immunoglobulins in complexes. As IgE is conspicuous in its association with anti-nematode responses, the absence of specific IgE bound to circulating antigen was surprising. The bound antibodies were of the IgM class in the asymptomatic group and mainly IgG antibodies were found in the symptomatic patients. The positive results obtained in the four endemic controls with detectable IgM antibody raised the question of their possible cryptic infection (i.e. asymptomatic-amicrofilaremic). The subclasses of the IgG antibodies have now to be investigated since the IgG4 antibody response has been shown to be particularly marked in filarial infection (Magnusson *et al.*, 1986).

The higher sensitivity of the detection of bound antibodies in immune complexes compared to the detection of circulating antigen by the 2S-IRMA test, is probably due to the higher number of antibody molecules bound to the parasite material than of accessible target epitopes of AA3-44, leading to an amplification of the radiolabelled signal.

These data are in agreement with the epidemiological findings showing that most of the anti-sheath antibodies are IgM, and that IgG anti-sheath antibodies are more prevalent, and in higher titres, in patients with elephantiasis than in those with other stages of filariasis (Ottesen *et al.*, 1982; Piessens *et al.*, 1980). Moreover, in the canine *D. immitis* model, the conversion from IgM to the IgG isotype with chronic infection was recently reported (Gbakima, El-Sadr & Greene, 1986). On the other hand, there are many published indications that IgM antibodies play an essential part in microfilarial clearance (Selkirk *et al.*, 1986; Gbakima *et al.*, 1986; Maizels *et al.*, 1982) and, indeed, the IgM monoclonal antibody used in this report mediated killing of microfilariae by mouse peritoneal macrophages (Aggarwal *et al.*, 1985).

Evidently, the switch from IgM to IgG production is different from that observed in a variety of diseases in which the IgM activity present in early phase of the infection is followed by IgG activity. In fact, several life cycle stages are simultaneously present in individuals living in endemic areas where transmission occurs continually at a low level (Piessens & Mackenzie, 1982). It is noteworthy that no significant difference in the

isotype of the antibody complexed was observed between the symptomatic and asymptomatic groups as a function of their age.

The relationship observed between the isotype complexed to the circulating antigen and the clinical status of the disease, support the hypothesis that the clinical manifestations of filariasis may be due in part to the host's immune reactions, but leaves open the question whether it is the cause or the consequence.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank B. Bonnel and F. Koyalisse for excellent technical assistance, J.P. Gazet for maintaining the *B. malayi* cycle, and M.F. Massard and C. Colson for secretarial assistance. We are indebted to Dr B. Hennache (Biochemistry Laboratory of the Heart Disease Hospital, Lille) for the biochemical analysis of the sera and urines, and to Dr R.J. Pierce for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the International Atomic Energy Agency (3230/R2/TC) and from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ID 860073).

REFERENCES

- AGGARWAL, A., CUNA, W., HAQUE, A., DISSOUS, C. & CAPRON, A. (1985) Resistance against *Brugia malayi* microfilariae by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *Immunology* **54**, 655.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248.
- CAPRON, A., GENTILINI, M. & VERNES, A. (1968) Le diagnostic immunologique des Filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse. *Path.-Biol.* **16**, 1039.
- CESBRON, J.Y., CAPRON, A., VARGAFTIG, B.B., LAGARDE, M., PINCEMAIL, J., BRAQUET, P., TAELEMAN, H. & JOSEPH, M. (1987) Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature* **325**, 533.
- DISSANAYAKE, S., FORSYTH, K.P., ISMAIL, M.M. & MITCHELL, G.F. (1984) Detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis by using a monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**, 1130.
- FORSYTH, K.P., SPARK, R., KAZURA, J., BROWN, G.V., PETERS, P., HEYWOOD, P., DISSANAYAKE, S. & MITCHELL, G.F. (1985) A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis. *J. Immunol.* **134**, 1172.
- GBAKIMA, A.A., EL-SADR, W. & GREENE, B.M. (1986) Delayed isotype switching in *Dirofilaria immitis* infection. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**, 305.
- GOLD, R., ROSEN, F.S. & WELLER, T.H. (1969) A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*: detection of antigens in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**, 545.
- HAMILTON, R.G., HUSSAIN, R. & OTTESEN, E.A. (1984) Immunoradiometric assay for detection of filarial antigens in human serum. *J. Immunol.* **133**, 2237.
- HAQUE, A., LEFEBVRE, M.N., OGILVIE, B.M. & CAPRON, A. (1978) *Dipetalonema vitae* in hamsters: effect of antiserum or immunization with parasite extracts on production of microfilariae. *Parasitology* **76**, 61.
- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. (1963) Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *J. Biochem.* **89**, 114.
- JAYAWARDENE, L.J. & WIJAYARATNAM, V. (1968) The fluorescent antibody test in the serological diagnosis of the causative organisms of tropical pulmonary eosinophilia and filariasis. *J. Helminthol.* **42**, 57.
- KAZURA, J.W., CICIRELLO, H. & MCCALL, J.W. (1986) Induction of

- protection against *Brugia malayi* infection in jirds by microfilarial antigens. *J. Immunol.* **136**, 1422.
- LAEMMLI, V.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.
- MAGNUSSON, C.G., CESBRON, J.Y., DJURUP, R., CAPRON, A. & JOHANSSON, S.G. (1986) Raised serum IgG4 levels in patients with atopy and filariasis: application of an automated particle-counting immunoassay using monoclonal antibody. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **81**, 238.
- MAIZELS, R.M., PHILIPP, M. & OGILVIE, B.M. (1982) Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* **61**, 109.
- MAIZELS, R.M., DENHAM, D.A. & SUTANTO, I. (1985) Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi* analysis of *in vitro* released components and detection of parasite products *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**, 277.
- MAIZELS, R.M., BURKE, J. & DENHAM, D.A. (1987) Phosphorylcholine-bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis of somatic extracts, *in vitro* secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *Brugia pahangi*. *Parasite Immunol.* **9**, 49.
- MARKWELL, M.A.K. & FOX, C.F. (1978) Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eukaryotic cells using 1,3,4,6-tetrachloro-3-6-diphenylglycoluril. *Biochemistry* **17**, 4807.
- NOGUEIRA-QUEIROZ, J.A., LUTSCH, C., CAPRON, M., DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1986) Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by a monoclonal antibody. I. Specificity analysis of a monoclonal antibody with immunodiagnostic capacity. *Clin. exp. Immunol.* **65**, 223.
- NYDEGGER, U.E., LAMBERT, P.H., GERBER, H. & MIESCHER, P.A. (1974) Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. Quantitation by binding to radiolabelled Clq. *J. clin. Invest.* **54**, 279.
- OLIVER-GONZALEZ, J. & MORALES, F.H. (1945) Common antigens among filarial and other nematode parasites in man. *J. infect. Dis.* **79**, 91.
- OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., MILDORD, N.L. & HUSSAIN, R. (1982) Endemic filariasis on a Pacific Island. Immunologic aspects: immunoglobulin, complement and specific anti-filarial IgG, IgM and IgE antibodies. *Am. J. trop. Med. Hyg.* **31**, 953.
- PARANJAPE, R.S., HUSSAIN, R., NUTMAN, T.B., HAMILTON, R. & OTTESEN, E.A. (1986) Identification of circulating parasite antigen in patients with Bancroftian filariasis. *Clin. exp. Immunol.* **63**, 508.
- PIESSENS, W.F., MCGREEVY, P.B., RATIWAYANTO, S., MCGREEVY, M., PIESSENS, P.W., KOIMAN, I., SAROSO, J.S. & DENNIS, D.T. (1980) Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status. *Am. J. trop. Med. Hyg.* **29**, 563.
- PIESSENS, W.F. & MACKENZIE, C.D. (1982) Immunology of lymphatic filariasis and onchocerciasis. In: *Immunology of Parasitic Infections*. (eds S. Cotten & K.S. Warren). p. 622. Blackwell Scientific.
- SÄNGER, I., LÄMMLER, G. & KIMMING, P. (1981) Filarial infections of *Mastomys natalensis* and their relevance for experimental chemotherapy. *Acta Trop.* **38**, 277.
- SELKIRK, M.E., DENHAM, D.A., PARTONO, F., SUTANTO, I. & MAIZELS, R.M. (1986) Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites. *Parasitology* **91**, 15.
- SUTANTO, I., MAIZELS, R.M. & DENHAM, D.A. (1985) Surface antigens of a filarial nematode: analysis of adult *Brugia pahangi* surface components and their use in monoclonal antibody production. *Mol. Biochem. Parasitol.* **15**, 203.
- TANDON, A., ZAHNER, H., SÄNGER, I., MÜLLER, H.A. & REINER, G. (1983) Time courses of antibody levels in *Mastomys natalensis* after infections with *Litosomoides carinii*, *Dipetalonema viteae*, *Brugia malayi* or *B. pahangi*, determined by ELISA. *Z. Parasiten.* **69**, 681.
- TAYLOR, D.W., CORDINGLEY, J.S. & BUTTERWORTH, A.E. (1984) Immunoprecipitation of surface antigen precursors from *Schistosoma mansoni* messenger RNA *in vitro* translation products. *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**, 305.
- WARREN, K.S. & MAHMOUD, A.A. (1983) Filariasis. In: *Tropical and Geographical Medicine*. p. 400. McGraw Hill, New York.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1984) Application of monoclonal antibodies to filarial antigens. *Bull. WHO* **62**, 695.

Article 2

Détection d'antigènes circulants et urinaires chez le rongeur, *Mastomys natalensis*, infesté expérimentalement par les filaires *Brugia malayi*, *B.pahangi* et *Litomosoides carinii*.

Dans les zones d'endémie filarienne, la transmission de l'infection humaine est continue, et divers stades parasitaires (larves L1, L3 et adultes) peuvent être présents simultanément chez ces sujets. Pour mieux appréhender l'évolution des antigènes ES sériques et urinaires au cours d'une infection filarienne, le suivi de ces molécules a été entrepris chez le rongeur, *Mastomys natalensis*, infesté expérimentalement par trois espèces de filaires *B. malayi*, *B. pahangi* et *L. carinii*.

Durant la phase prépatente des infections, avant la maturation complète des vers, **les antigènes filariens ont été mis en évidence 3 à 7 semaines avant l'apparition des microfilaries dans le sang**. A ce stade, la sensibilité du test est supérieure dans l'urine que dans le sérum. Durant la phase patente des infections, les taux d'antigènes circulants et urinaires ainsi que la microfilarémie sont soumis à des variations importantes. Néanmoins, il existe une corrélation positive ($P < 0.05$) entre l'antigénémie et la microfilarémie dans les trois cas.

Dans l'infection par *L. carinii*, **l'antigène filarien subsiste dans le sérum et l'urine même après disparition des microfilaries, 49 semaines après infection**. A ce stade, les molécules filariennes peuvent provenir des microfilaries lysées par le système immunitaire, mais aussi des produits ES des vers adultes qui survivent encore à ce moment là.

Le taux d'antigène sérique semble résulter du nombre de microfilaries mais aussi de la réponse anticorps qui induit la formation de complexes immuns, rendant indétectable les molécules parasitaires en cas d'excès d'anticorps. Au stade prépatent de l'infection, le faible taux d'antigènes circulants peut se trouver saturé en anticorps puisque des anticorps libres et des complexes immuns ont été signalés 2 à 3 semaines post-infection (Tandon *et al.*, 1983; Weiss *et al.*, 1986). Avec la maturation des vers, puis l'apparition des microfilaries, le taux de molécules ES augmente et, à ce stade, le taux d'anticorps est maximum (Tandon *et al.*,

1983). Dans ces conditions, les immuns complexes ne sont probablement pas saturés en anticorps et deviennent facilement accessibles à l'anticorps AA3-44 radiomarqué sur des échantillons sériques.

Le taux d'antigènes urinaires est supérieur au taux sérique durant la phase prépatente alors que cela n'est pas le cas avec l'apparition des microfilaires. Dans le sérum, l'antigène peut être complexé alors qu'il ne l'est pas dans l'urine dans des conditions physiologiques normales.

Si l'on extrapole ces résultats à l'homme, on peut envisager l'utilisation de ce test 2S-IRMA pour le diagnostic de filarioses amicrofilarémiques, ce qui a déjà été réalisé dans l'étude précédente. Sur des échantillons d'urine, ce test pourrait aussi servir au suivi épidémiologique de l'infection filarienne prépatente d'enfants résidents dans des zones d'endémie filarienne où la transmission aurait été stoppée.

Detection of circulating and urinary antigens in *Mastomys natalensis* experimentally infected with *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, or *Litomosoides carinii*

C. Lutsch¹, J.Y. Cesbron¹, H. Zahner², and A. Capron¹

¹ Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, rue du Pr A. Calmette, 59019 Lille Cédex, France

² Institut für Parasitologie, Justus Liebig Universität, D-6300 Giessen, Federal Republic of Germany

Abstract. The time-course of the detection of circulating and urinary filarial antigens was followed with a 2S-IRMA assay, using a mouse monoclonal antibody raised against *Brugia malayi* larvae, in *Mastomys natalensis* experimentally infected with *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*, or *Litomosoides carinii*. In the prepatent phase of the infections, filarial antigen was detected 4–7 weeks before microfilariae appeared in the peripheral blood. Moreover, the sensitivity of the test was greater with urine than with serum. During the patent phase of infection, the level of circulating antigens detected varied considerably. However, there was a positive correlation ($P < 0.05$) between antigenemia and microfilaremia. In *L. carinii* infection, filarial antigen could be easily detected in spite of the disappearance of microfilariae in peripheral blood, 49 weeks post infection. If these results are extrapolated to man, the 2S-IRMA should be useful for epidemiological surveys in endemic areas where transmission has been eliminated.

Research concerning the immunodiagnosis of filarial infections is being increasingly focused on efforts to detect filarial products in serum and in urine, especially in the prepatent phase of disease. However, in areas where such infections are endemic, transmission occurs continually and several life-cycle stages are present simultaneously. For this reason we decided to investigate this question in *M. natalensis* experimentally infected with three filarial species: *Brugia malayi*, a lymphatic-dwell-

ing parasite, *Brugia pahangi*, a blood vessel parasite, and *Litomosoides carinii*, which is a cavity-dwelling parasite. The test used for detection of circulating filarial antigens has recently been described elsewhere (Lutsch et al., 1987); it is a two-site immunoradiometric assay using a mouse monoclonal antibody (IgM, named AA3-44) raised against *B. malayi* larvae (Aggarwal et al. 1985).

Materials and methods

Animals

Multimammate rats *Mastomys natalensis* (Strain GRA Gießen) bred at the Institute of Parasitology (Gießen, FRG) were kept in groups under constant climatic conditions (22° C, 60% relative humidity) in polycarbonate cages on sawdust and fed on a diet developed for Syrian hamsters. Drinking water was available ad libitum.

Infections

Brugia malayi. The subperiodic strain of *B. malayi* was maintained in *M. natalensis* and *Aedes aegypti*. Eleven days after infection, the mosquitoes were stunned by ether and crushed on glass slides. A few drops of Tyrode solution were added. The larvae were isolated and concentrated with a Baerman funnel. Male *M. natalensis* were infected at 6–8 weeks with 70 third-stage larvae injected s.c. in the neck region (Sänger et al. 1981).

B. pahangi. Infective larvae were isolated from *A. aegypti* 11 days after an infective blood meal as described for *B. malayi*. Male *Mastomys* were infected at 8 weeks by s.c. injection of 70 third-stage larvae in the neck region (Sänger et al. 1981).

Litomosoides carinii. Male and female *Mastomys* were infected at 4–6 weeks of age by exposing them to mites (*Ornithonyssus bacoti*) which had been previously fed on infected cotton rats with a high level of microfilaremia (Lämmler et al. 1968).

Urine collection

The animals were placed in twos in metabolite cages. Urine from two animals was pooled after collection, centrifuged (15000 g; 5 min), and stored at –20° C.

Reprint requests to: C. Lutsch

Abbreviations: CA, Circulating antigen; 2S-IRMA, two-site immunoradiometric assay; Mab, monoclonal antibody; p.i., post infection

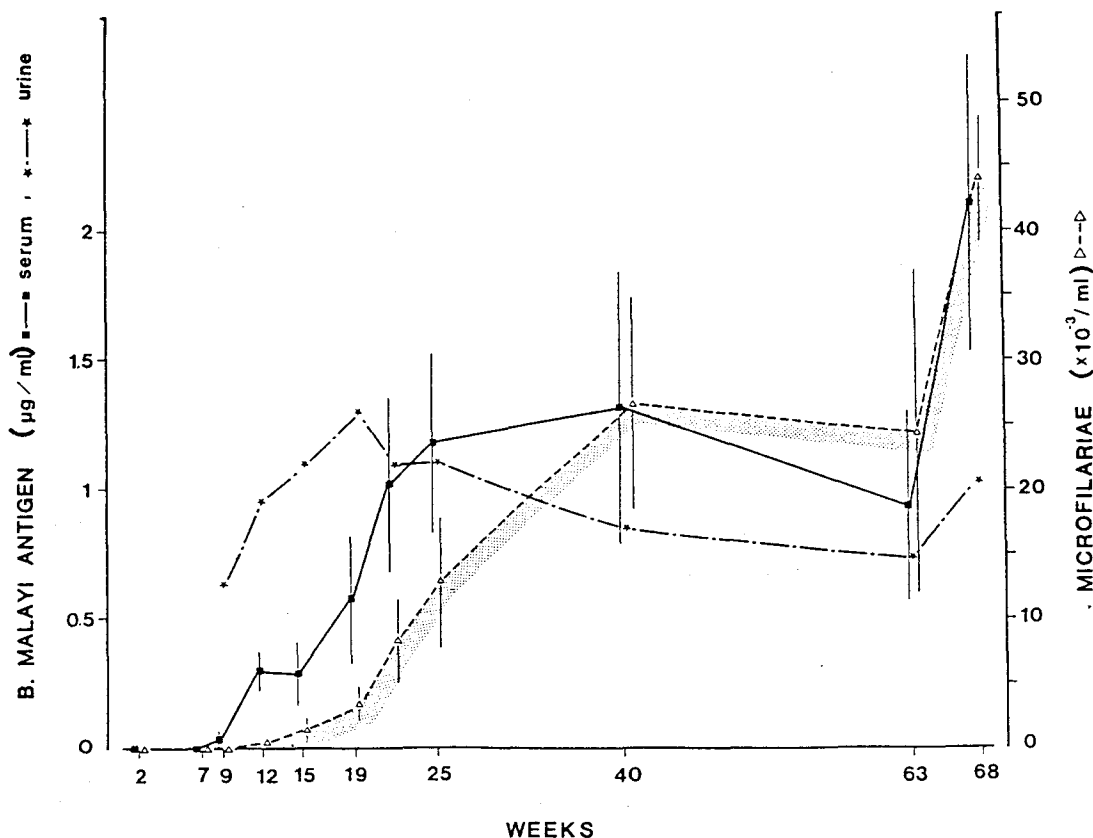


Fig. 1. Levels of circulating and urinary filarial antigens and microfilaria densities in *B. malayi*-infected *M. natalensis* in the course of the experimental infection

Blood and serum samples

Blood was collected from different *Mastomys*, which were usually bled once on a given day after infection from the retroorbital venous plexus for serum collection and counting of microfilariae. Sera were separated after clotting and centrifugation (15000 g; 4 min) and stored at -40°C until used. The density of microfilaremia was determined by a counting chamber method as described earlier (Sänger et al. 1981). The degree of microfilaremia was expressed as number of microfilariae per ml.

Two-site immunoradiometric assay for detection of circulating antigen

The 2S-IRMA has been previously described (Lutsch et al., 1987). Briefly, the Mab (AA3-44) was used as both solid-phase and detecting reagent. Microtiter plates (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, USA) were coated with 100 µl/10 µg/ml Mab diluted in 10 mM phosphate-buffered saline pH 7.4 (PBS) per well, incubated for 24 h at 4°C . Samples (100 µl) diluted 1:2 (v/v) in PBS were then added and incubated for 3 h at 37°C . After 5 washes, 100 µl Mab (50000 cpm/well) radioiodinated by the chloramine T method, were incubated for 12 h at 4°C . After washing, the bound radioactivity of each well was measured in a gamma counter (LKB, 1272 Clinigamma, Turku, Finland). Each test was assessed in duplicate. The results were expressed as an equivalent dry weight of a saline extract of *B. malayi* adult worms.

Statistical analysis

Statistical analysis of the results included the Student's *t*-test and the linear correlation test.

Results

Brugia malayi infection (Fig. 1)

In the prepatent phase of *B. malayi* infection in *M. natalensis*, filarial antigens appeared 9 weeks p.i. in serum and in urine, while microfilariae were observed 3 weeks later. At this time, the antigen concentration was $38\times$ higher in the urine than in the sera. After this period, when microfilaremia increased, filarial antigens continued to be detected both in serum and urine until the end of the experiments, 68 weeks p.i. Moreover, there was a positive correlation ($r=0.605$; $P<0.05$; $n=69$) between the levels of circulating antigens and microfilariae.

Brugia pahangi infection (Fig. 2)

In serum and urine, filarial antigens were demonstrated 10 weeks p.i., and microfilariae were de-

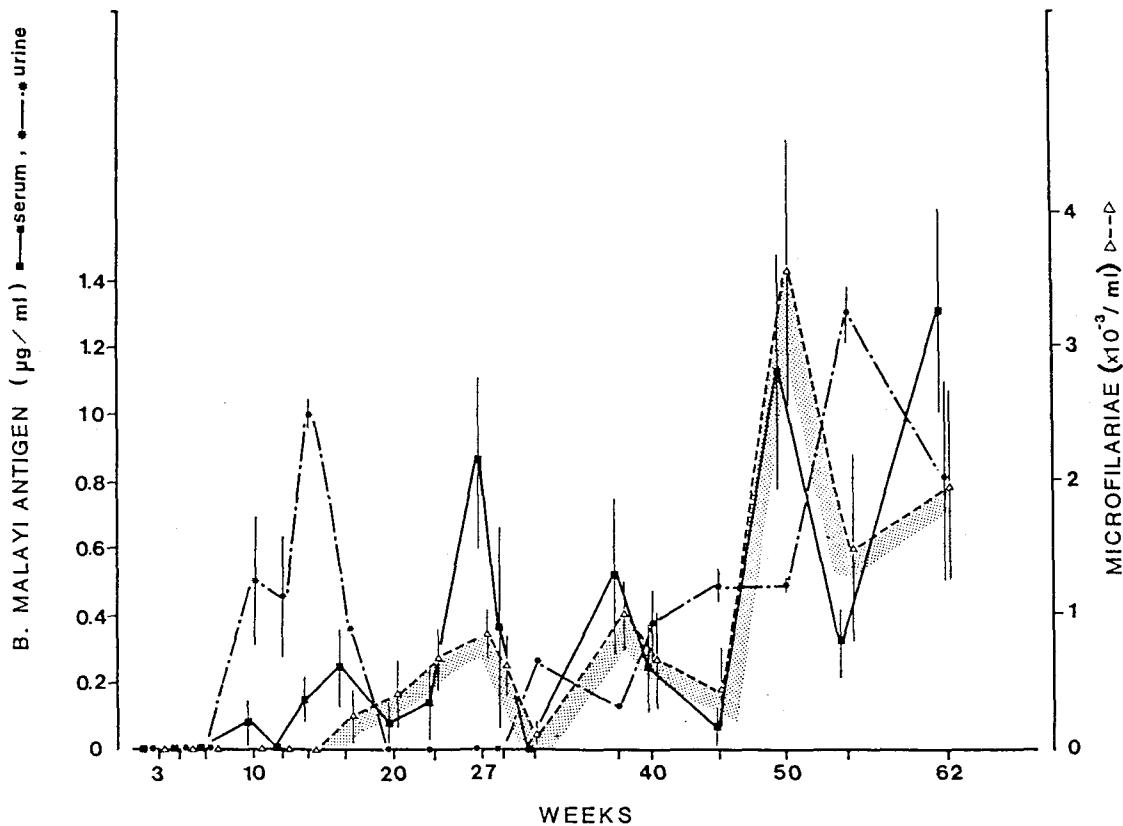


Fig. 2. Levels of circulating and urinary filarial antigens and microfilaria densities in *B. pahangi* infected *M. natalensis* in the course of the experimental infection

tected at week 17. In this model, detected levels of circulating and urinary antigen were very variable, as was microfilariaemia, and there was a positive correlation ($r=0.659$; $P<0.05$; $n=96$) between levels of circulating antigen and microfilariae.

Litomosoides carinii infections (Fig. 3)

Filarial antigens were once again detected in both serum and urine well before (5 weeks p.i.) the rapid and massive appearance of microfilariae (9 weeks p.i.). During the patient infection, high levels of circulating filarial antigens were found and correlated ($r=0.442$; $P<0.05$; $n=118$) with the microfilariaemia. However, in spite of the disappearance of the microfilariae from the peripheral blood after about 31 weeks p.i., circulating and urinary antigens were still present 49 weeks after infection.

Discussion

In a previous paper, the 2S-IRMA used in this study was shown to allow the detection of parasite

molecules in the serum of 50% of *Wuchereria bancrofti*-infected patients from Sri Lanka, and in 100% of urine samples (Lutsch et al. 1987). In addition, it was shown that the poor sensitivity of the detection of circulating antigens appeared to be related to the presence of circulating immune complexes.

However, such work cannot yield unequivocal evidence of the possibility of detecting circulating antigens in human filariasis in the earliest phases of the infection, since in humans living in areas where such infections are endemic several live-cycle stages are present simultaneously. These findings, however, have implications for the design of diagnostic tests, particularly of epidemiological surveys in areas where transmission has been eliminated. Nevertheless, before investigation of this point in the field with a longitudinal study in children, experimental infections could provide a preliminary answer to this question.

Using the 2S-IRMA, we were able to demonstrate the presence of filarial molecules during the prepatent phase of infection, both in serum and in urine from *M. natalensis* infected with *B. malayi*,

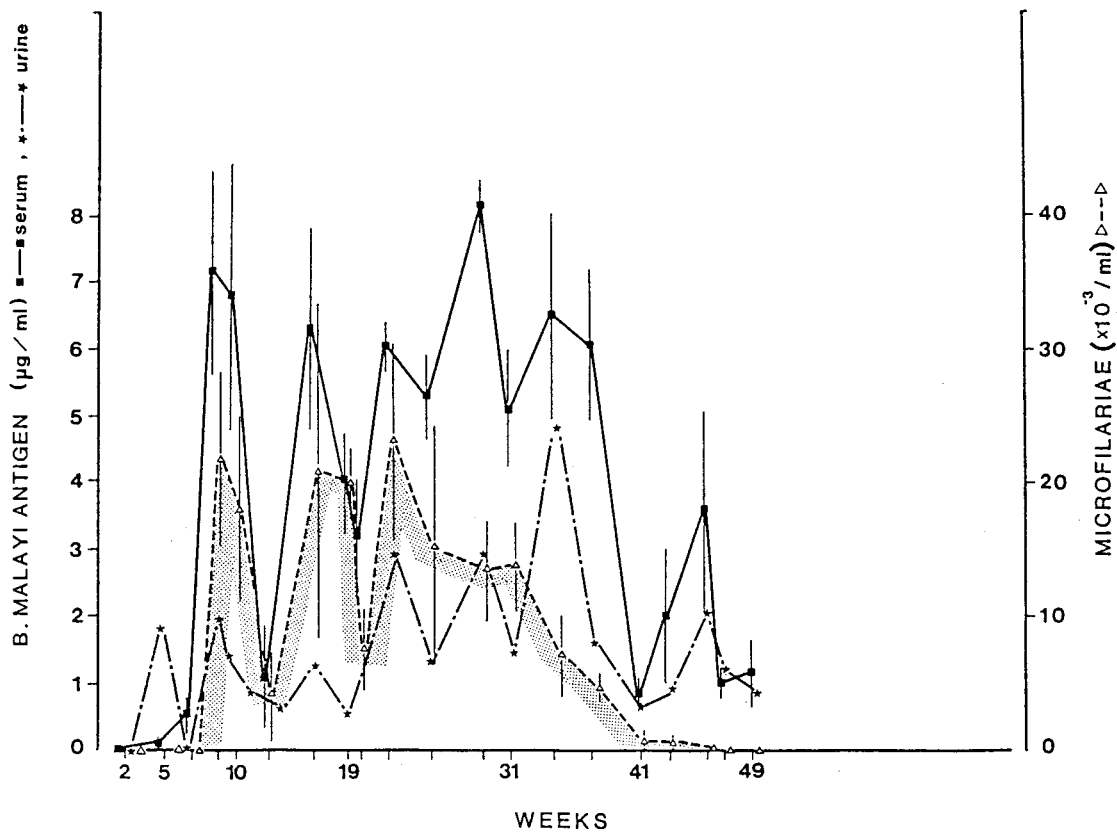


Fig. 3. Levels of circulating and urinary filarial antigen and microfilaria densities in *L. carinii* infected *M. natalensis* in the course of the experimental infection

B. pahangi, or *L. carinii*. The circulating antigen level seemed to result from the number of microfilariae (since a positive correlation was found between these two parameters in the three experimental infections) and the intensity of the antibody response that induced the formation of immune complexes (Weiss et al. 1986), leading to undetectable parasite molecules in conditions of antibody excess (Lutsch et al. 1987). This is probably the case at the beginning of infection, since the antibody response was detectable as early as 2 weeks p.i. (Tandon et al. 1983) and immune complexes were present 3 weeks p.i. (Zahner et al. 1984).

After several weeks, at which time the worms were adult and producing microfilariae, the amounts of released parasite compounds increased. At this time, antibody levels were at their maximum (Tandon et al. 1983). In these conditions, immune complexes are probably not in conditions of antibody excess, and circulating antigens are detectable by the 2S-IRMA.

In the prepatent phase of infection, the level of circulating antigens detected in urine was much higher than that found in serum. This was not the case when microfilariae appeared in peripheral

blood. However, the results obtained in serum and urine were not directly comparable, since in serum the antigen was complexed, whilst in urine the antigen would not be complexed in the absence of renal failure. Thus, the same quantity of antigen would fix much more radiolabeled AA3-44 in urine than in serum, where not all the AA3-44 target epitopes are accessible.

During the period of microfilaraemia, the principal observation was the high degree of individual variation in the levels of both circulating antigens and microfilariae. This probably depended on the fecundity of fully grown females, since an increase in circulating antigen level always followed that of microfilaraemia. Thus, the practical conclusion to be drawn for human diagnosis could be that tests should be repeated at intervals of a few weeks.

The *L. carinii* infection gave us the possibility of confirming that circulating antigens could be easily detected in sera and in urine, in spite of the disappearance of microfilariae from peripheral blood. The origin of these molecules could be the debris of larvae destroyed by the immune system. They could also be excreted/secreted by adults, since it has been possible to detect filarial com-

pound by the 2S-IRMA in the culture medium of male worms maintained in vitro (Lutsch et al. 1987).

The applicability of the 2S-IRMA to the detection of circulating antigens was previously investigated in serum and urine from *W. bancrofti*-infected patients from Sri Lanka (Lutsch et al. 1987). These observations and those described in the present study indicate that longitudinal epidemiological surveys in endemic areas using urine samples are now needed to achieve a reliable diagnosis of prepatent filariasis by the detection of circulating antigens.

Acknowledgements. We thank Karine Schultheiss, D. Henry and J.P. Gazet for excellent technical assistance and C. Colson for secretarial help. We are grateful to Dr R. Pierce for the critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the International Atomic Energy Agency (3230/R2/TC) and from the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ID 860073). Charles Lutsch is supported by the D.G.R.E.S.

References

- Aggarwal A, Cuna W, Haque A, Dissous C, Capron A (1985) Resistance against *Brugia malayi* microfilariae by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *Immunology* 54:655-663
- Lämmle G, Saupe E, Herzog H (1968) Infektionsversuche mit der Baumwollrattenfilariae *Litomosoides carinii* by *Mastomys natalensis* (Smith 1934). *Z Parasitenkd* 32:281-290
- Lutsch C, Cesbron JY, Henry D, Dessaint JP, Wandji K, Ismail M, Capron A (1987) Lymphatic filariasis: detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. *Clin. exp. Immunol.* (in press)
- Sänger I, Lämmle G, Kimmig P (1981) Filarial infections of *Mastomys natalensis* and their relevance for experimental chemotherapy. *Acta Trop* 38:277-288
- Tandon A, Zahner H, Sänger I, Müller HA, Reiner G (1983) Time courses of antibody levels in *Mastomys natalensis* after infections with *Litomosoides carinii*, *Dipetalonema viteae*, *Brugia malayi* or *B. pahangi*, determined by ELISA. *Z Parasitenkd* 69:681-692
- Weiss N, Van den Ende MC, Albiez EJ, Barbiero VK, Forsyth K, Prince AM (1986) Detection of serum antibodies and circulating antigens in a chimpanzee experimentally infected with *Onchocerca volvulus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:587-591
- Zahner H, Reiner G, Pries M, Kapmeyer W (1984) Circulating antigens and immune complexes in the course of experimental filarial infections: levels and composition. *Zbl Bakt Mikrobiol Hyg A* 258:424

Accepted August 17, 1987

Article 3

Valeur diagnostique d'un test de détection d'antigènes circulants dans les filarioses humaines.

Pour évaluer l'intérêt diagnostique/pronostique en milieu hospitalier du test de détection d'antigènes circulants et urinaires filariens, le 2S-IRMA a été utilisé dans le cadre d'une étude multiparamétrique à l'aveugle portant sur près de 600 étudiants en provenance de pays à endémie parasitaire, et examinés dans le Service de Médecine Tropicale et de Parasitologie de l'Hôpital International de l'Université de Paris. Une cure de diéthylcarbamazine (DEC) a été proposée à tous ceux qui présentent un taux significativement élevé d'antigènes circulants et qui sont suspectés d'être des sujets filariens.

Sur 576 sujets, 71 sont positifs en antigènes circulants et/ou urinaires; 39 d'entre eux présentent des signes cliniques, biologiques et/ou parasitologiques d'une infection filarienne évolutive (patients filariens). Après traitement à la DEC, une baisse significative ($P < 0.05$) des taux d'antigènes circulants et urinaires est notée chez les patients filariens. Chez ces patients, les paramètres cliniques, parasitologiques ou biologiques attestent d'une efficacité du traitement.

La présence d'antigènes circulants et/ou urinaires est également établie chez 10 patients parasités par les nématodes intestinaux *Strongyloides stercoralis* ou *Ankylostoma duodenale* (patients strongyloïdiens), et chez 22 autres sujets qui ne présentent aucun signe clinique, parasitologique (recherche de microfilaires et d'oeufs dans les selles) ou biologique (absence d'hyperéosinophilie, non élévation du taux des IgE totales et absence d'anticorps anti-filaires) d'infection filarienne ou de nématodose intestinale. Après traitement, les patients strongyloïdiens ne voient pas diminuer significativement ($P > 0.05$) leur taux d'antigène circulant. En effet, la DEC est inactive sur les nématodes intestinaux comme *S. stercoralis* et *A. duodenale*, et l'origine des antigènes circulants chez ces patients est à rechercher dans la libération de molécules ES par ces nématodes non filariens, lors de leur migration tissulaire. D'ailleurs seulement 55% des patients

strongyloïdiens de cette étude, porteurs de vers adultes, présentent des antigènes circulants.

Une chute significative ($P < 0.05$) des taux d'antigènes circulants et urinaires est également notée après traitement des 22 sujets ne présentant aucun signe d'infection par nématodes, ce qui laisse pourtant suspecter l'existence d'une infection filarienne inapparente. Pour conforter cette hypothèse, un paramètre supplémentaire a été étudié. La présence d'ecdystéroïdes, hormones d'invertébrés, dans le sérum d'hôtes infestés par des helminthes a été proposée comme élément de diagnostic et de suivi du traitement anti-helminthiase (Nirdé *et al.*, 1983 et 1984; Koolman *et al.*, 1984). La détection d'hormones ecdystéroïdes est attestée dans le sérum des patients filariens et strongyloïdiens, ainsi que dans le groupe des sujets suspectés de filariose chez lesquels on note une chute significative ($P < 0.05$) du taux d'ecdystéroïdes après traitement à la DEC. **La présence et la chute des taux d'antigènes circulants et urinaires, et d'hormones ecdystéroïdes après traitement à la DEC chez ces sujets, sont en faveur d'une infection filarienne inapparente, même en l'absence d'anticorps anti-filariens.**

Les filarioses parasitologiquement confirmées ont toutes été dépistées par ce test (4 cas). Par contre, 5 patients considérés comme filariens sur la base de critères cliniques et sérologiques, se sont révélés être négatifs en antigènes circulants/urinaires. La sensibilité du test est de 89% (sujets filariens positifs dans le test / total des patients filariens).

Les performances du test, au regard des autres méthodes immunologiques ou parasitologiques qui sont habituellement utilisées, nous ont donc conduit à la **mise au point d'un test immunoenzymatique sur bandelette (Dot-Elisa) de détection d'antigènes circulants filariens**. La lecture peut être effectuée à l'oeil nu et peut être facilement quantifiée à l'aide d'un densitomètre portable utilisable en dehors des laboratoires. Ainsi, **un tel test "Dot-ELISA" utilisant l'anticorps AA3-44, appliqué aux 71 sujets positifs et à 17 sujets négatifs en 2S-IRMA, montre une corrélation positive entre les taux d'antigènes circulants obtenus dans les deux tests ($r=0.79$, $P < 0.01$, $n=88$).**

La spécificité du test appliqué à la population étudiée est de 93% (sujets sains négatifs dans le test / total des sujets sains). Dans les conditions de l'étude, la seule réactivité croisée appréciable concerne la strongyloïdose évolutive. En dépit de ce manque de spécificité, la

détection d'antigènes circulants et/ou urinaires filariens par l'anticorps AA3-44 s'avère pourtant être un paramètre supplémentaire de diagnostic des filarioses humaines.

**DIAGNOSTIC VALUE OF THE ASSAY OF CIRCULATING
ANTIGENS IN FILARIASIS**

CHARLES LUTSCH¹, JEAN-YVES CESBRON¹, PHILIPPE NIRDE¹,
MICHEL BARBIER², FRANCOISE VIDAL², LIONEL RAFFENE²,
FAISA AJANA³ and ANDRE CAPRON¹

¹ Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire , Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur , 1, rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex, France

² Laboratoire de Pathologie Exotique et Parasitaire, Hôpital International de l'Université de Paris, 42, Boulevard Jourdan, 75014 Paris Cédex, France

³ Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Footnotes: Filariasis, Circulating antigens, Ecdysterone, Diethylcarbamazine treatment, Radioimmunoassay, Dot-enzyme immunoassay.

All correspondence should be adressed to: Charles LUTSCH

ABSTRACT

A two-site immunoradiometric assay using a monoclonal antibody against *Brugia malayi* microfilariae, was used in the detection of filarial antigens in the serum and the urine of 576 students examined in a tropical medicine practice.

Of 71 patients presenting with circulating and/or urinary antigens, 39 were shown to be infected with filarial parasites according to standard clinical, parasitological and serological criteria. Of the remaining patients presenting with filarial antigens, 10 were shown to be suffering from strongyloidiasis, while 22 individuals ("filarial suspected" patients) had no sign of filarial or intestine nematodal infection.

Following an anti-filarial chemotherapy (diethylcarbamazine, DEC), the levels of antigens detected in serum, and in urine of the filarial and "filarial suspected" patients decreased significantly. However, no significant decrease was noticeable in the strongyloidiasis group.

Five patients clinically diagnosed as having filariasis had no filarial antigens before and after treatment.

The detection of invertebrate ecdysteroid hormones in sera of infected patients was used to confirm these results. Among "filarial suspected" patients, the high level of serum ecdysteroid hormones before treatment decreased markedly after treatment. This observation was considered indicative of a cryptic filarial infection, in the absence of anti-filarial antibodies.

Finally, a dot-enzyme immunoassay (DEIA) was developed to replace the 2S-IRMA for laboratories in which this radioimmunoassay cannot be used.

INTRODUCTION

Diagnosis of filarial infections is difficult and often dependent on clinical examinations which are subjective. Infected persons do not always present a well defined clinical picture and, many symptoms are not specific for filariasis.

Parasitological diagnosis is based mainly on the detection of microfilariae in the blood or the skin. However, these tests lack sensitivity especially in pre-patent and post-patent clinical stages where they are often negative (Beaver, 1970). Furthermore, application of these biological tests may be limited by absence of suitably trained personnel: they are also time-consuming and, in some cases, require suspect blood samples to be collected at specific times of the day or night.

Current serological tests based on the detection of anti-filarial antibodies are of limited value since they fail to differentiate active filarial infections from cryptic infections, and antibodies may remain for years after treatment (Toda *et al.*, 1982; Welch & Dobson, 1974).

The detection of parasite-specific materials in biological fluids has been suggested as the most appropriate approach to identification of an active filarial infection (Franks, 1946). Although several investigators have described detection of filarial antigens in the sera, and urine of infected humans and animals using polyclonal (Ouaissi *et al.*, 1981; Hamilton *et al.*, 1984; Dasgupta *et al.*, 1984; Paranjape *et al.*, 1986; Weil *et al.*, 1986a; Prasard *et al.*, 1987) or monoclonal (Des Moutis *et al.*, 1983; Dissanayake *et al.*, 1984; Forsyth *et al.*, 1985; Weil *et al.*, 1985, 1987; Maizels *et al.*, 1985; Huijin *et al.*, 1987; Lal *et al.*, 1987; Wenger *et al.*, 1988) antibodies, a specific diagnostic test has not yet been developed. In this study, we evaluate the potential circulating and urinary antigens for diagnosis of filarial infections (Lutsch *et al.*, 1988) frequently carried out in hospitals.

The presence of ecdysteroid hormones, in the serum of helminth-infected hosts (Koolman *et al.*, 1984) was suggested for diagnosing helminth diseases, and to monitor the efficiency of anti-parasite chemotherapy (Nirdé *et al.*, 1984). A radioimmunoassay for ecdysteroid hormones (Nirdé *et al.*, 1984) was examined as an additional criterion in confirming a filarial infection in individuals who have circulating antigens, in the absence

of anti-filarial antibodies and clinical symptoms.



MATERIALS AND METHODS

Patients and subjects: The preventive Health Authority of the University of Paris examined students from September 1986 to June 1987. A total of 576 patients were interviewed and examined by investigators trained in tropical diseases. Blood and urine samples were collected from all persons who were resident outside of France for more than a year. Patients were selected on the basis of epidemiological and clinical data, and biological arguments such as hypereosinophilia and high serum IgE concentrations which are frequently considered indicative of filarial infections. Sera from all patients were assayed for the presence of anti-filarial antibodies using both an hemagglutination assay (Rosé *et al.*, 1966), and an immunoelectrophoresis test (Capron *et al.*, 1968). The presence of microfilariae was tested using a concentration technique (Ho Thi Sang & Petihory, 1963). The Laboratory of Parasitology at the International Hospital of the University of Paris carried out these tests. Individuals were classified as "normal" i.e. no sign of filariasis, or filariasis positive.

All sera and urine samples were subsequently tested as for the presence of circulating and urinary antigens at the Laboratory of Immunology and Parasite Biology at the Institut Pasteur of Lille. Both filariasis patients, and individuals presenting with circulating or urinary antigens without filariasis symptoms, were recalled for treatment with diethylcarbamazine (DEC). The drug was progressively administered on a daily basis to a maximum 200 mg dosage for 3 weeks. A control group of 12 non infected patients selected at random, were also given DEC. Two to 4 weeks after treatment, the patients were re-examined clinically and parasitologically, and all immunological tests were repeated.

Immunological assays:

Two-site immunoradiometric assay (2S-IRMA) for the detection of circulating antigen: The 2S-IRMA has previously been described (Lutsch *et al.*, 1988). Briefly, a monoclonal antibody (Mab) named AA3-44 (IgM isotype) was used both as solid

phase and as the detecting reagent. Microtiter plates (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, USA) were coated with 100ul of a 1/100 dilution of Mab (1mg/ml) in phosphate buffered saline and incubated for 24h at 4°C. Urine and serum samples (100ul) diluted 1:2 (v/v) in PBS were then added and incubated for 3 hours at 37°C. After 5 washes, radioiodinated Mab (specific activity, 37 kBq/ug), were incubated 12 hours at 4°C. After washes, the bound radioactivity of each well was measured in a gamma counter (LKB, 1272 Clinigamma, Turku, Finland). Each test was assessed in duplicate. The results were expressed as an equivalent dry-weight of a saline extract of *D. vitae* adult worms. The limit of sensitivity was fixed at 2 standard deviations above the mean cpm value for European sera (500 ng/ml).

Ecdysteroid assay: Serum ecdysteroid hormones were assayed by radioimmunoassay (RIA) as previously described (Nirdé *et al.*, 1984). Serum samples (400ul) were taken and added to methanol (800ul). The mixtures were heated at 60°C for 15 min. and centrifuged (800 x g, 10 min.). The supernatants were dried under nitrogen flow and the residues were dissolved in 0.1M citrate buffer, pH 6.1. These extracts were then assayed in the RIA with the coated technology. Briefly, the tubes coated with anti-20-hydroxy-ecdysone monoclonal antibodies (Immunotech, Marseille, France) were filled with 400ul of ¹²⁵I-labelled-20-hydroxy-ecdysone (Immunotech, Marseille, France) and 100ul of biological extract. After 24 h incubation at 4°C, equilibrium was achieved. The tubes were counted in a gamma counter (LKB, 1272 Clinigamma, Turku, Finland) as the total labelled analogue. The tubes were then emptied by aspiration of the fluid and counted as the bound (B) labelled analogue. The ratio of binding was computed as $r = B/T$. The standard curve was made with pure 20-hydroxy-ecdysone (Sigma) from 10^{-7} M - 10^{-12} M. The maximum binding in these conditions was 0.67 ($r_0 = 67\%$). Crude extract bound fractions were then calculated on a PC computer system, with a linear regression of the standard curve (Nirdé *et al.*, 1988). The results were expressed as pico-moles of 20-hydroxy-ecdysone equivalent per ml serum. The limit of positivity was fixed at 2 standard deviations above the mean value for European sera.

Dot enzyme immunoassay (DEIA):

Preparation of alkaline phosphatase-conjugated antibody: The glutaraldehyde method (Avrameas, 1969) for alkaline phosphatase (AP) labelling was used. The AP-conjugated AA3-44 was separated from the free alkaline phosphatase by FPLC gel filtration on a Superose 12 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). After purification, the relevant fraction of the conjugates were pooled, bovine serum albumin (Cohn Fraction V, Bovine Albumin, Sigma, St-Louis, MO) (1mg/ml) was added. The AP-conjugated Mab was stored at -20°C.

Dot-Assay: The dot-enzyme immunoassay as reported by Hawks *et al.* (1986) was modified as follows. Volumes of 1 ul of AA3-44 Mab, diluted in PBS at 3.0 mg/ml, were spotted on individual 2.0 x 0.4 cm nitrocellulose paper strips (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The strips were allowed to dry at room temperature and protein-binding sites were blocked with PBS / 5 % (w:v) powdered milk (Gloria, Paris, France). The strips were washed with PBS and incubated in 1 ml of a 1:10 dilution of each test serum in wells of polystyrene plates (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA) under agitation for 1 hr at room temperature. After washing with PBS, the strips were allowed to react for 1 hr at room temperature under agitation with 1 ml alkaline phosphatase conjugated AA3-44 Mab diluted 1:100 in PBS. The enzyme reaction was made visible using 5-bromo-4-chloro-indoxylphosphate (Calbiochem, San Diego, CA) as chromogen (Blake *et al.*, 1984). One ml of the developing solution (Blake *et al.*, 1984) was added to the nitrocellulose paper and incubated for 15 min at 37°C. The color intensity of the dots was measured with a densitometric scanner (Camag TLC-Scanner, Muttenz, Switzerland) at 600 nm. The peak height was measured in mm and expressed as the relative staining intensity. A standard curve was obtained with increasing concentrations of antigen added in one serum diluted 1:10. The limit of positivity was fixed at 2 S.D. above the mean densitometer reading for European sera (1 ug/ml equivalent dry weight *Dipetalonema vitae* antigen).

Statistical analysis:

Statistical analysis of the results included a one way analysis of variance, the Student's t test and the correlation test.

RESULTS

Of the 71 patients who had filarial antigens in serum and/or urine, 39 were diagnosed as filariasis patients according to parasitological, clinical and serological criteria (Table1). Eight of these patients had circulating and urinary antigens; 28 had antigens only in the blood; and 3 patients had antigens in the urine only. Microfilariae were detected in the blood or skin of only 4 of the 39 patients and these 4 individuals had circulating filarial antigens. The incriminated filarial species were *Loa loa*, *Onchocerca volvulus*, and *Wuchereria bancrofti*.

The 32 other patients whose sera contained circulating antigens, were clinically asymptomatic, serologically negative and amicrofilaraemic: these individuals were described as "false positive" patients (Table 1). Two groups could be distinguished. First, that consisting of 10 individuals, for whom active strongyloidiasis was parasitologically diagnosed (it should be noted that 8 other strongyloidiasis patients had no detectable antigens). Second, that consisting of 22 individuals showing no signs of filarial or intestine nematodal infection (Table1). This group of patients will henceforth be referred to as "filarial suspected" patients and include two patients presenting with circulating and urinary antigens; 6 presenting with only circulating antigens; and 14 presenting with urinary antigens only.

The follow-up of the DEC treatment performed on filariasis patients and on "filarial suspected" patients showed that the antigen concentration markedly decreased after treatment, both in the serum (Table 2) and in the urine (Table3). No significant difference was observed after treatment in the strongyloidiasis group (Table 2 and 3). Neither circulating nor urinary antigens was detected in "normal" controls before or after treatment.

Five patients diagnosed as having filariasis, following the usual clinical and biological examinations, were found not to have filarial antigen in the serum and in the urine (Table1). These individuals belonged to the "false negative" patients. Neither circulating nor urinary antigens were detected in this group after treatment (data not shown).

In order to confirm the results of our immunological test (2S-IRMA), ecdysteroid hormones were assayed in the serum. As shown in Table 4, the "filarial suspected" patients

have a significant high level of serum ecdysteroid which markedly decreased after the DEC treatment .

The levels of circulating antigens in the study population was also investigated in the DEIA. As shown in Fig. 1, we obtained a positive correlation between the DEIA and the 2S-IRMA ($r=0.79$, $p<0.01$, $n=88$).

DISCUSSION

This is the first time the diagnosis of an active human filariasis by detecting circulating antigens has been studied in a large number of patients. By using a monoclonal antibody probe against *Brugia malayi* (Aggarwal *et al.*, 1985) named AA3-44, the 2S-IRMA test (Lutsch *et al.*, 1988) confirmed the diagnosis for 89% of the filariasis patients which was based on clinical, parasitological and serological criteria.

In the "filarial suspected" patients, the presence of circulating and urinary filarial antigens suggested an active filariasis. This conclusion was strongly supported both by the high serum levels of ecdysteroid hormones before treatment, and by their decrease after DEC treatment. The occurrence of ecdysteroid hormones in vertebrate serum has been shown to be a marker of parasite infection (Nirdé *et al.*, 1984). Taken together, these data demonstrated the capacity of the test to detect circulating antigens in cryptic filariasis infections even in the absence of anti-filarial antibodies and clinical symptoms. This observation has potential diagnostic value.

The effect of antifilarial therapy on the level of circulating antigens in animal models has already been reported (Forsyth *et al.*, 1984; Weil *et al.*, 1986b) however similar studies have not yet been performed on human infections. In this report, we observed a significant decrease in the levels of filarial antigens in serum and in urine of infected humans after treatment with DEC. The fact that the level of circulating antigens and ecdysteroid hormones in serum after treatment were not as low as in control samples suggests the persistence of an active infection. This observation may be associate with the failure of DEC to kill adult filarial worms (Mackenzie, 1985) .

Circulating antigens were also detected in 55% of the strongyloidiasis patients.

These individuals were regarded as filariasis patients and as such receive the DEC treatment. However, the stability of antigen levels after treatment, support the existence of cross reactivity in the 2S-IRMA test due to the presence of hookworms not affected by DEC. The presence of circulating nematode products could be related to the phase of tissue migration of hookworm larvae, since not all patients presented with detectable circulating antigens. Because antigenic cross-reactivity between filariasis and intestinal nematodes could be related to the phosphorylcholine (PC) epitope, which has been shown to be an immunodominant molecule in nematode parasites (Gualzate *et al.*, 1986; Maizels *et al.*, 1987), we tested the reactivity of AA3-44 against PC. AA3-44 recognized the PC-coupled to ovalbumin. However, this fact did not constitute sufficient evidence for the presence of the PC epitope on the AA3-44 target antigen in filarial worms, since various anti-PC monoclonal antibodies failed to recognize the target antigen of AA3-44 (previously called FEA: Filarial Excretory Antigen (Cesbron *et al.* 1987)), and conversely, two anti-*Onchocerca volvulus* monoclonal antibodies (Des Moutis *et al.*, 1983; Wandji *et al.*, in press) which recognize FEA failed to recognize the PC-ovalbumin conjugate (S. Avrameas, personal communication). Despite the cross-reactivity observed using anti-nematodal monoclonal antibodies, usually called anti-PC probes, these monoclonal antibodies have proved to be of considerable practical usefulness in filarial infections (Dissanayake *et al.*, 1984; Forsyth *et al.*, 1985; Maizels *et al.*, 1985; Lal *et al.*, 1987; Wenger *et al.*, 1988).

Similar investigations are now required in field conditions. However, radioimmunoassays are not likely to be widely applied in endemic areas. For this reason we developed a dot-immunoassay. The positive correlation with results of 2S-IRMA and the DEIA suggest the dot-assay may be used in the field.

This study provides evidence that the detection of circulating and urinary antigens could be used to diagnosis active filariasis infections. It could also prove useful to monitor the efficiency of antifilarial therapy.

ACKNOWLEDGMENTS: We should like to thank D. Henry for technical assistance, and F. Velge for helpful advice. We are grateful to Dr R. Pierce and Dr. D. Taylor for critical reading of the manuscript. This work was supported by a grant from the UNDP/ World Bank/ WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (ID 860073) and by the INSERM .

REFERENCES

- Aggarwal, A., Cuna, W., Haque, A., Dissous, C. & Capron, A. (1985). Resistance against *Brugia malayi* microfilariae by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *Immunology* , **54**, 655-663.
- Avrameas, S. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry* , **6**, 43-52.
- Beaver, P. C. (1970) . Filariasis without microfilaremia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , **19**, 181-189.
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Jones, G.J. & Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline-conjugated anti-antibody on Western blots. *Analytical Biochemistry* , **136**, 175-179.
- Capron, A., Gentilini, M. & Vernes, A. (1968). Le diagnostic immunologique des Filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse. *Pathologie et Biologie* , **16**, 1039-1045.
- Cesbron, J.Y., Capron, A., Vargaftig, B.B., Lagarde, M., Pincemail, J., Braquet, P., Taelman, H. & Joseph, M. (1987). Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature* , **325**, 533-536.
- Dasgupta, A., Bala, S. & Dutta, S. N. (1984). Lymphatic filariasis in man: demonstration of circulating antigens in *Wuchereria bancrofti* infection. *Parasite Immunology* , **6**, 341-348.
- Des Moutis, I., Ouaisi, A., Grzych, J.M., Yarzabal, L., Haque, A. & Capron A. (1983). *Onchocerca volvulus* : detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , **32**, 533-542.

- Dissanayake, S., Forsyth, K.P., Ismail, M.M. & Mitchell, G. F. (1984). Detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis by using a monoclonal antibody.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene , **33**, 1130-1140.
- Forsyth, K.P. & Mitchell , G.F. (1984). *Onchocerca gibsoni* : increase of circulating egg antigen with chemotherapy in bovines.
Experimental Parasitology , **58**, 41-55.
- Forsyth, K.P., Spark, R., Kazura, J., Brown, G.V., Peters, P., Heywood, P., Dissanayake, S. & Mitchell, G. F. (1985). A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for detection of circulating antigen in bancroftian filariasis. *J ournal of Immunology* , **134**, 1172-1177.
- Franks, M. B. (1946). Specific soluble antigen in the blood of filarial patients.
Journal of Parasitology , **32**, 400-406.
- Gualzate, M., Weiss, N. & Heusser, C.H. (1986). *Dipetalonema vitae* phosphorylcholine and non phosphorylcholine antigenic determinants in infective larvae and adult worms. *Experimental Parasitology* , **61**, 95-102.
- Hamilton, R. G., Hussain, R. & Ottesen, E. A. (1984). Immunoradiometric assay for detection filarial antigens in human serum.
Journal of Immunology , **133**, 2237-2242.
- Hawkes, R. (1986). The dot-immunobinding assay. In *Methods in Enzymology*, Langone, J.J. & Van Vunakis, H. (editors), vol. 121. New-York: Academic Press, pp. 484-497.
- Ho Thi Sang & Petithory, J. (1963). Techniques de concentrations des microfilaires sanguicoles. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique* , **56**, 197-206.
- Huijun, Z., Zhenghou, T., Reddy, M.V.R., Harinath, B.C. & Piessens, W. F. (1987). Parasite antigens in sera and urine of patients with bancroftian and brugian filariasis detected by sandwich ELISA with monoclonal antibodies.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene , **36**, 554-560.

- Koolman, J., Walter, J. & Zahner, H. (1984). Ecdystroids in Helminths. In *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*, Hoffmann, J. & Porchet, M. (editors), Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 324-330.
- Lal, R.B., Paranjape, R.S., Briles, D. E., Nutman, T.B. & Ottesen, E.A. (1987). Circulating parasite antigen (s) in lymphatic filariasis: use of monoclonal antibodies to phosphocholine for immunodiagnosis. *Journal of Immunology*, **138**, 3454-3460.
- Lutsch, C., Cesbron, J.Y., Henry, D., Dessaint, J.P., Wandji, K., Ismail, M. & Capron, A. (1988). Lymphatic filariasis: detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. *Clinical and Experimental Immunology*, **71**, 253-260.
- Mackenzie, C.D. (1985). Diethylcarbamazine: a review of its action in onchocerciasis, lymphatic filariasis and inflammation. *Tropical Diseases Bulletin*, **82**, 1-37.
- Maizels, R.M., Denham, D.A. & Sutanto, I. (1985). Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi*: analysis of in vitro released components and detection of parasite products in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **17**, 277-288.
- Maizels, R.M., Burke, J. & Denham, D.A. (1987). Phosphorylcholine-bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis of somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Parasite Immunology*, **9**, 49-66.
- Nirdé, P., De Reggi, M.L., Tsoupras, G., Torpier, G., Fressancourt, P. & Capron, A. (1984). Excretion of ecdysteroids by schistosomes as a marker of parasite infection. *F.E.B.S. Letters*, **168**, 235-240.
- Nirdé, P. (1988). Les ecdystéroïdes parasitaires. PhD Thesis, University of Lille, France, 215p.
- Ouaissi, A., Kouemeni, L. E., Haque, A., Ridet, P.R., Saint-André, P. & Capron, A. (1981). Detection of circulating antigens in onchocerciasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 1211-1218.

- Paranjape, R.S., Hussain, R., Nutman, T.B., Hamilton, R. & Ottesen, E.A. (1986). Identification of circulating parasite antigen in patients with Bancroftian filariasis. *Clinical and Experimental Immunology*, **63**, 508-516.
- Prasad, G.B., Harinath, B.C. & Hamilton, R.G. (1987). Analysis of paired serum, urine and filter paper blood specimens for presence of filarial antigen by immunoradiometric assay. *Journal of Immunoassay*, **8**, 351-365.
- Rosé, G., Biguet, J., Rosé, F. & D'Haussy, R. (1966). Application d'une réaction d'hémagglutination au diagnostic de l'onchocercose. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique*, **14**, 383-392.
- Toda, I., Otsuji, Y., Harada, R., Mimori, T. & Fukumoto, H. (1982). Skin test study of bancroftian filariasis on Kuroshima Island, Okinawa: A 13-year longitudinal study during a control campaign. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **31**, 962-967.
- Wandji, K., Cesbron, J.Y., Dissous, C., Taylor, D., Haque, A., Lutsch, C. & Capron, A. (1989). Use of monoclonal antibodies for the characterization of *Onchocerca volvulus* antigens. *Tropenmedizin und Parasitologie*, in press.
- Weil, G.J., Malane, M.S., Powers, K.G. & Blair, L.S. (1985). Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of *Dirofilaria immitis* - infected dogs. *Journal of Immunology*, **134**, 1185-1191.
- Weil, G.J., Kumar, H., Santhanam, S., Sethumadhavan, K.V.P. & Jain D.C. (1986a). Detection of parasite antigen in bancroftian filariasis by counterimmunoelectrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **35**, 565-570.
- Weil, G.J., Blair, L.S., Vislocky-Ewanciw, D. & Malatesta, P.F. (1986b). Use of parasite antigen detection to monitor the success of drug therapy in *Dirofilaria immitis* -infected dogs. *Journal of Parasitology*, **72**, 737-740.
- Weil, G.J., Jain, D.C., Santhanam, S., Malhotra, A., Kumar, H., Sethumadhavan, K.V.P., Liftis, F. & Ghosh, T. K. (1987). A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. *Journal of Infectious Diseases*, **156**, 350-355.

- Welch, J. S. & Dobson, C. (1974). Antibodies to *Dirofilaria immitis* in caucasian and aboriginal Australians diagnosed by immunofluorescence and passive arthus hypersensitivity.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **23**, 1037-1045.
- Wenger, J.D., Forsyth, K.P. & Kazura, J.W. (1988). Identification of phosphorylcholine epitope-containing antigens in *Brugia malayi* and relation of serum epitope levels to infection status of jirds with Brugian filariasis.
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, **38**, 133-141.

LEGENDS

Table 1: Classification of the populations investigated with respect to serum and urinary filarial antigens.

A: Filariasis patients

B: False positive patients including (i) "filarial suspected" patients and (ii) strongyloidiasis patients.

C: Filariasis patients designated "false negative" patients.

Table 2: Mean serum filarial antigen level (ng/ml) before and after DEC treatment. The groups of patients were defined as in Table 1.

Table 3: Mean urinary filarial antigen level (ng/ml) before and after DEC treatment. The groups of patients were defined as in Table 1.

Table 4: Serum ecdysteroid level (pMol. 20-hydroxy-ecdysone-equivalent / ml) before and after DEC treatment. The groups of patients were defined as in Table 1.

Fig.1: Correlation between 2S-IRMA and dot-assay. Circulating filarial antigen determination of 88 serum samples (corresponding to group A; B; C as defined in Table 1, plus 12 "normal" individuals). Each point represents the mean of two determinations.

| | | Usual filarial criteria | | |
|--------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|-----|
| | | + | - | |
| Circulating antigens (2S-IRMA) | + | A 39 | B i 22 + 10 ⁱⁱ | 71 |
| | - | C 5 | 500 | 505 |
| | | 44 | 532 | 576 |

Table -1-

| | Before DEC treatment | After DEC treatment | |
|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------|
| FILARIASIS PATIENTS (A) | x= 7171 sem= 1982 n= 39 | x= 2167 sem= 858 n= 29 | P<0.05 |
| STRONGYLOIDIASIS PATIENTS (B ii) | x= 9237 sem= 4880 n= 10 | x= 5198 sem= 2895 n= 4 | P>0.05 |
| FILARIASIS SUSPECTED PATIENTS (B i) | x= 1300 sem= 389 n= 22 | x= 470 sem= 216 n= 21 | P<0.05 |

Table -2-

| | Before DEC treatment | After DEC treatment | |
|-------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|--------|
| FILARIASIS PATIENTS (A) | x= 141.1 sem= 42.4 n= 39 | x= 7.51 sem= 4.2 n= 29 | P<0.05 |
| STRONGYLOIDIASIS PATIENTS (B ii) | x= 5.6 sem= 1.0 n= 10 | x= 8.7 sem= 4.2 n= 4 | P>0.05 |
| FILARIASIS SUSPECTED PATIENTS (B i) | x= 276.3 sem= 43.2 n= 22 | x= 5.3 sem= 0.5 n= 21 | P<0.05 |

Table -3-

| | Before DEC treatment | After DEC treatment | |
|---|--------------------------------|------------------------------|--------|
| FILARIASIS PATIENTS (A) | x= 79.2 sem= 30.8 n= 8 | x= 70.1 sem= 8.7 n= 8 | P>0.05 |
| STRONGYLOIDIASIS PATIENTS (B ii) | x= 63.6 sem= 10.4 n= 13 | ND | ND |
| FILARIASIS SUSPECTED PATIENTS (B i) | x= 144.8 sem= 27.4 n= 13 | x= 58.8 sem= 4.7 n= 15 | P<0.05 |

Table - 4 -

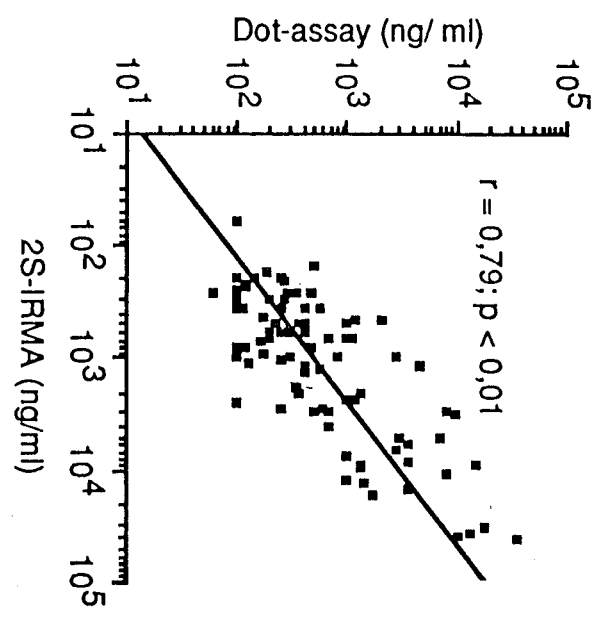


Figure -1-

Travaux non publiés

A. Poids moléculaire des antigènes reconnus par l'anticorps AA3-44 dans le sérum de patients filariens.

Les sérums de trois patients sont adsorbés par l'anticorps AA3-44 couplé à la Sépharose; les antigènes retenus sont élués et analysés en immunoblotting par l'anticorps ^{125}I -AA3-44. L'antigène apparaît sous forme de 4 bandes faiblement marquées à: >200.0, 131.6; 65.8 et 47.5 kDa (Fig. 6).

B. Spécificité de l'anticorps AA3-44.

L'anticorps AA3-44 reconnaît un épitope intervenant dans la destruction immune des formes larvaires L3 de *B. malayi*. L'identification de la nature de cet épitope a été entreprise en collaboration avec Mme le Docteur Ternynck (Laboratoire d'Immunocytochimie de l'Institut Pasteur de Paris; Directeur: Prof. S. Avrameas).

L'anticorps AA3-44 a été testé en ELISA sur des plaques de microtitration sensibilisées avec de l'ovalbumine couplée soit à la phosphorylcholine (PC) soit au trinitrophénol (TNP). Les résultats obtenus montrent que l'AA3-44 ainsi que l'anticorps anti-PC (CB-PC3) reconnaissent la PC et non le TNP (Fig. 7 et 8).

D'autres molécules ont été utilisées pour la caractérisation des déterminants antigéniques reconnus par AA3-44: l'actine, l'ADN, la myoglobine, la myosine, la tubuline, l'ovalbumine et la sérum albumine bovine. Aucune de ces molécules n'est reconnue par l'anticorps AA3-44 (résultats non présentés).

De même, la fixation des antigènes somatiques ou ES de *B. malayi* dans le 2S-IRMA est inhibée par la PC ovalbumine (58% d'inhibition à $1.6 \cdot 10^{-6}\text{M}$) et l'haptène PC (100% d'inhibition à $5 \cdot 10^{-5}\text{M}$) alors que l'actine inhibe la réaction seulement de 20% à $1.6 \cdot 10^{-5}\text{M}$ (Fig. 9).

La recherche de l'épitope PC dans les antigènes ES de *B. malayi* reconnus par AA3-44, s'est pourtant avérée négative par utilisation d'anticorps anti-PC (TEPC 15, HOPC 8 et CB-PC3) (Ternynck, com. pers.).

L'anticorps AA3-44 est un anticorps anti-PC, mais l'épitope reconnu dans les antigènes ES de *B. malayi* ne paraît pas être la PC.

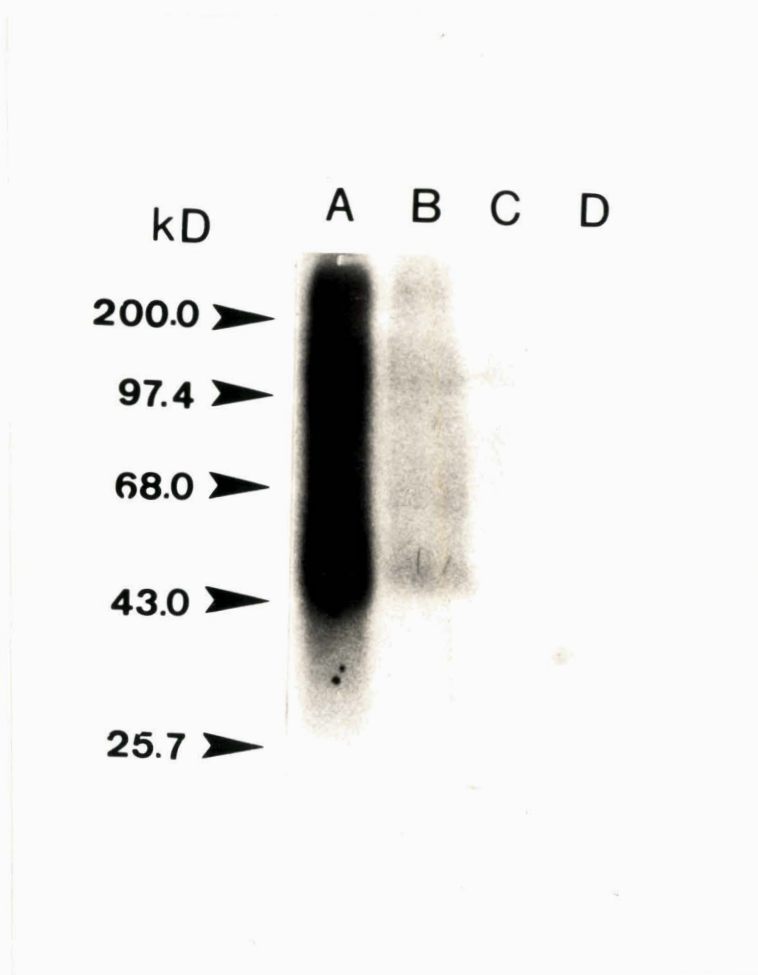


Fig. 6. Profil électrophorétique d'antigènes circulants isolés par l'anticorps AA3-44 dans les sérums de trois patients infestés par *Wuchereria bancrofti* (A, B, C) et d'un sérum humain normal (D) (Autoradiographie d'immunoblotting sur nitrocellulose développée par ^{125}I -AA3-44).

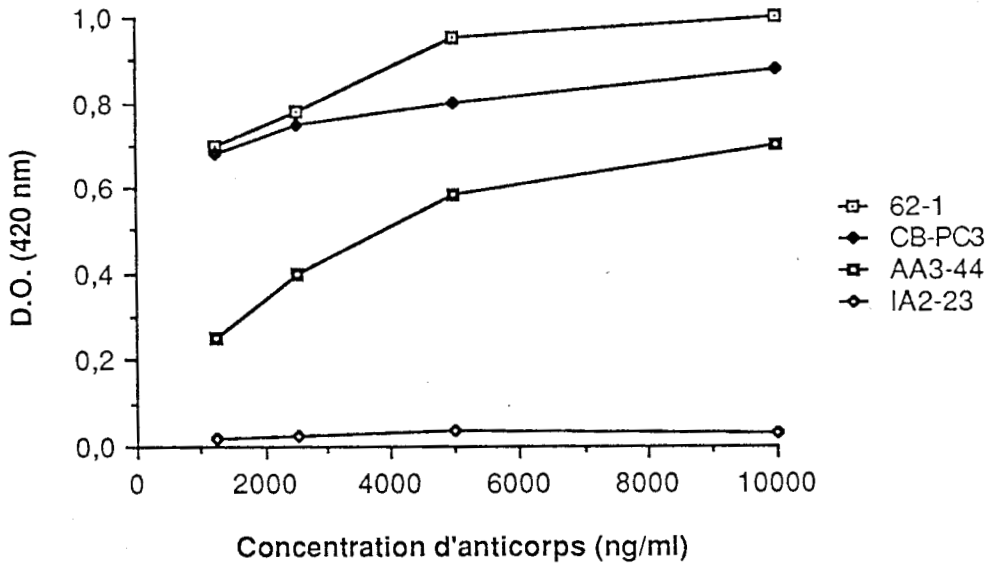


Fig. 7. Reconnaissance dans un test ELISA de la phosphorylcholine (plaque de microtitration présensibilisée par 5 ug/ml de PC-ovalbumine) par quatre anticorps: 62-1 (IgM naturelle polyspécifique), CC-CP3 (IgA anti-PC), AA3-44 (IgM anti-*Brugiamalayi*) et IA2-23 (IgM anti-*Onchocerca volvulus*).

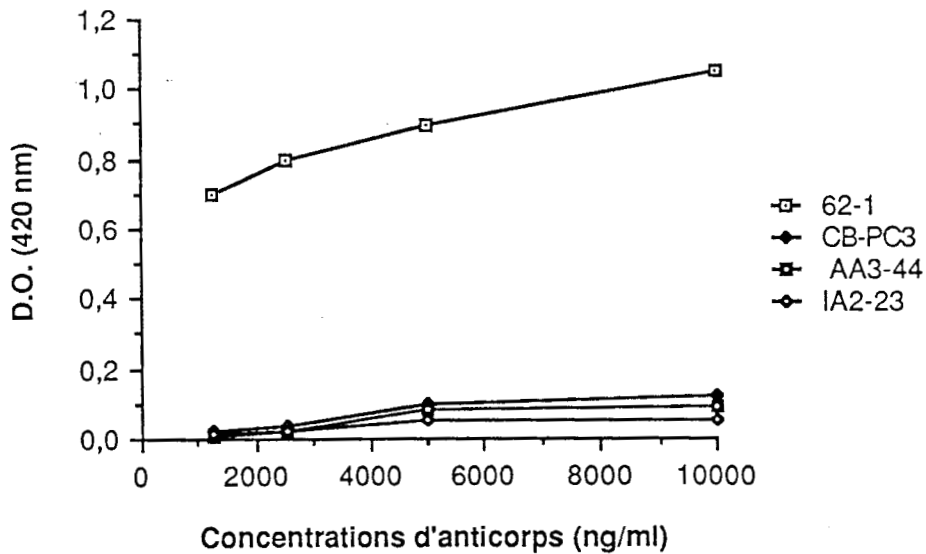


Fig. 8. Reconnaissance dans un test ELISA du trinitrophénol (plaque de microtitration présensibilisée par 5 ug/ml de TNP-ovalbumine) par quatre anticorps: 62-1 (IgM naturelle polyspécifique), CC-CP3 (IgA anti-PC), AA3-44 (IgM anti-*Brugia malayi*) et IA2-23 (IgM anti-*Onchocerca volvulus*).

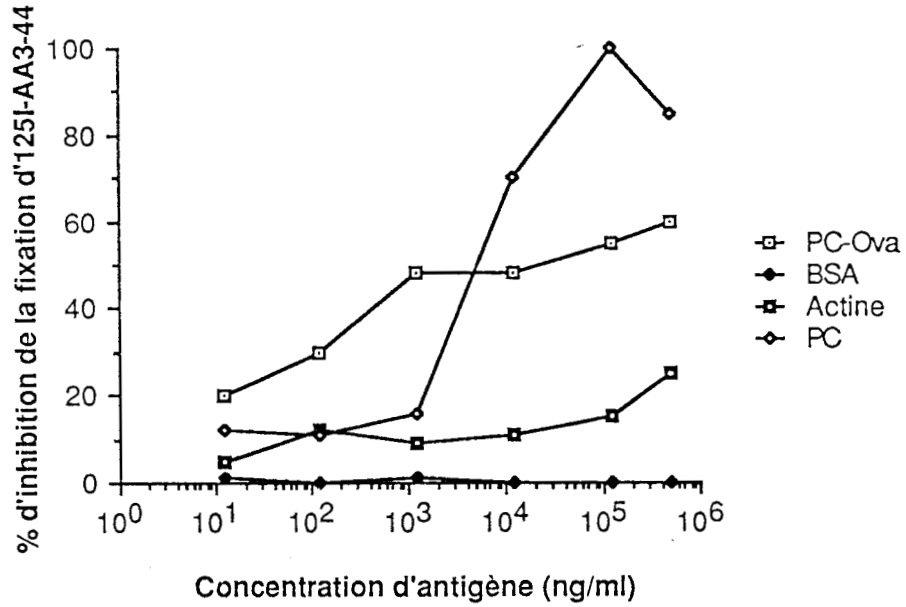


Fig. 9. Inhibition de la reconnaissance des antigènes de *B. malayi* dans le test 2S-IRMA par la PC-ovalbumine (2.9×10^{-11} M à 1.6×10^{-6} M), l'haptène PC (5×10^{-9} M à 2×10^{-4} M), l'actine (2.9×10^{-10} M à 1.6×10^{-5} M) et la sérum albumine bovine (7.4×10^{-6} M à 1.5×10^{-10} M).

C. Etude des antigènes ES de *B. malayi* reconnus par AA3-44.

Le cycle expérimental de *W. bancrofti* n'ayant pas encore été établi, nous avons utilisé l'espèce *B. malayi* maintenue sur le Mériion (*Meriones unguiculatus*), pour l'étude des antigènes ES.

1. Libération *in vitro* des antigènes ES de *B. malayi*.

En vue d'étudier la libération des molécules reconnues par AA3-44, les stades L1, L3, adulte mâle et femelle de *B. malayi* sont maintenus viables *in vitro* dans le milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, New-York, NJ) pendant une période de 36 heures. Comme le montre la figure 10, des antigènes sont détectables déjà au bout d'une heure d'incubation et cela pour tous les stades présents. La concentration d'antigènes filariens augmente pendant 8 heures puis se stabilise. La libération rapide de ces molécules dans les premières heures peut être due au stress lié au changement de milieu. L'origine digestive, de surface et d'excrétion/sécrétion de ces molécules ES n'est pas à exclure; parmi ces molécules ES pourraient figurer les antigènes détectés *in vivo*.

2. Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique des antigènes ES de vers adultes *B. malayi*.

Les produits ES de ver adulte de *B. malayi* sont séparés par chromatographie de filtration sur gel ACA 34 (IBF, Villeneuve-la-Garenne, France). Les fractions d'élution sont ensuite testées dans le 2S-IRMA. Il apparaît qu'une grande variété de molécules de poids moléculaires compris entre 23 et 330 kDa sont reconnues par l'anticorps AA3-44 (Fig. 11). Les points isoélectriques (Pi), analysés par focalisation isoélectrique (O'Farrell, 1975) de ces mêmes antigènes ES sont compris dans deux zones de pH: $3.8 < P_i < 6.2$ et $8.0 < P_i < 9.0$ (Fig. 12).

Cette hétérogénéité dans les Pm et Pi des molécules portant l'épitope reconnu par AA3-44 pourrait être liée à une grande variété de ces molécules, en plus de leur dégradation possible. Cette observation confirme celle des antigènes circulants filariens de poids moléculaires différents.

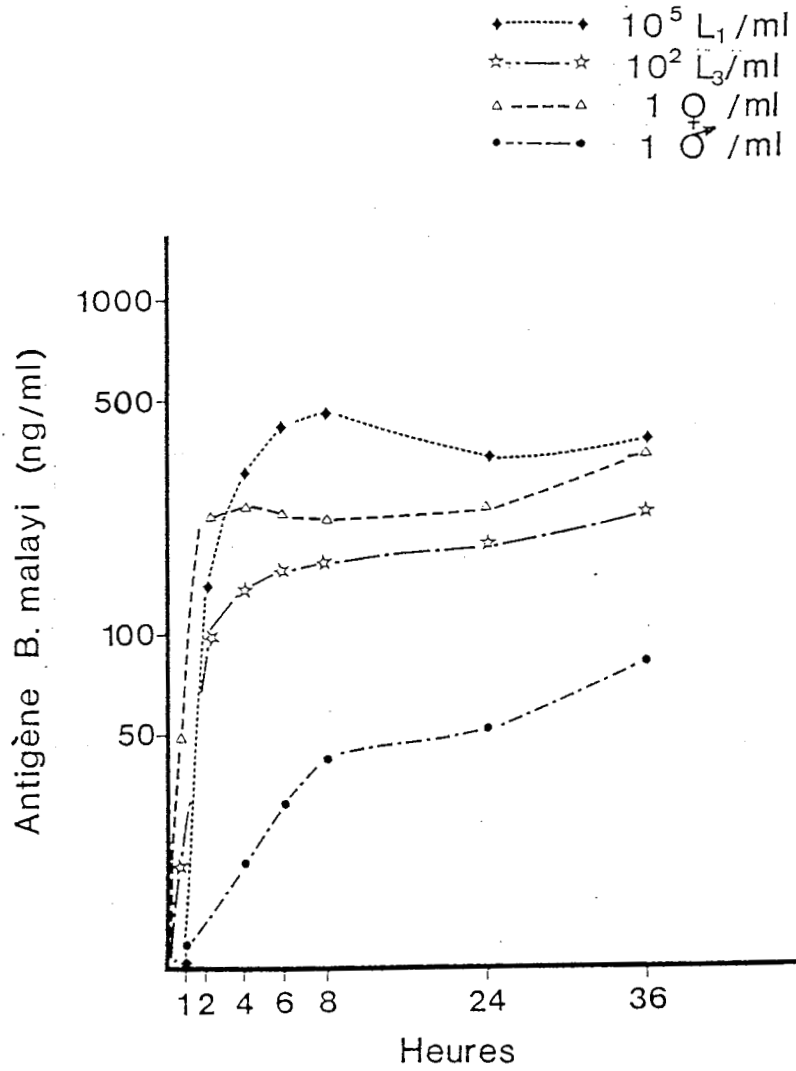


Fig. 10. Détection dans le test 2S-IRMA par l'anticorps AA3-44 des antigènes libérés *in vitro* par les larves L1, L3 et les vers adultes mâles et femelles de *Brugia malayi*.

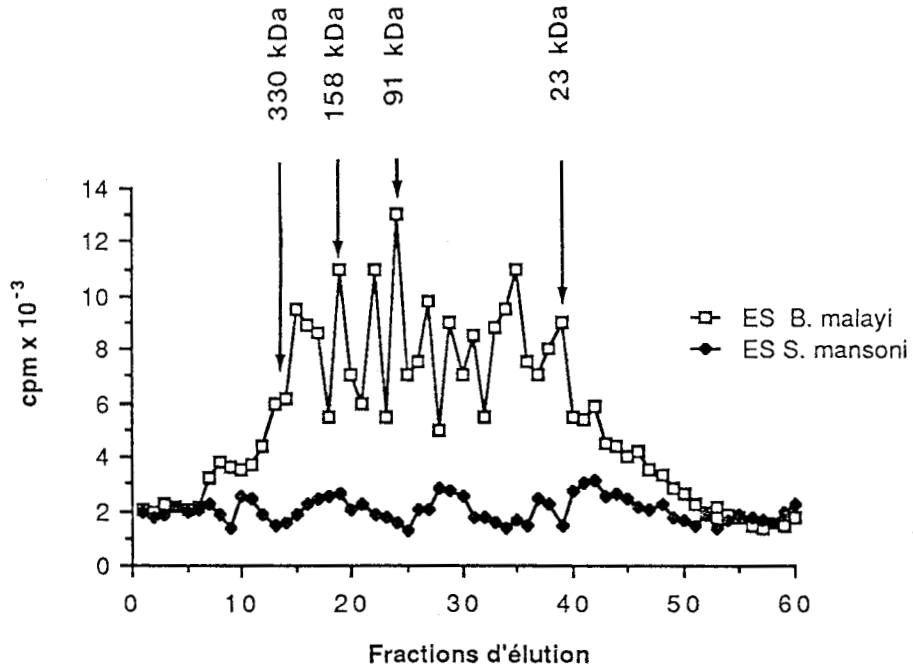


Fig. 11. Séparation par chromatographie de filtration sur gel (ACA 34) et analyse en 2S-IRMA des fractions d'élution des antigènes ES de vers adultes de *Brugia malayi* maintenus *in vitro*. Les produits ES de ver adulte de *Schistosoma mansoni* servent de témoin.

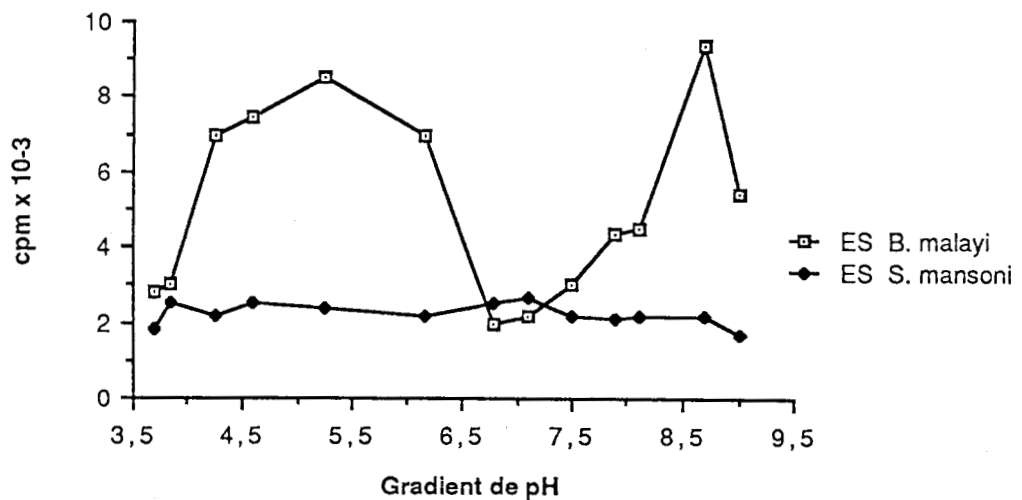


Fig. 12. Analyse en 2S-IRMA des antigènes ES de vers adultes de *Brugia malayi* maintenus *in vitro* après focalisation isoélectrique. Les produits ES de *Schistosoma mansoni* servent de témoin.

3. Résistance des antigènes ES de *B. malayi* au traitement physique, acide et enzymatique.

Les vers adultes (30 femelles et 20 mâles) sont maintenus pendant 30 heures à 37°C dans du milieu RPMI. Ce milieu est filtré (0.22 µm), puis dialysé contre de l'eau puis lyophilisé.

3.1. Action de la température.

Une fraction du lyophilisat est reprise dans de l'eau distillée, puis portée à ébullition pendant 5 à 30 minutes. Après centrifugation pendant 30 min. à 10 000 x g et dialyse, on observe que l'activité du dialysat testé en 2S-IRMA ne varie que sensiblement (Tabl. 3). L'épitope reconnu par AA3-44 est stable à 100°C.

3.2. Action des acides chlorhydrique et trichloracétique et du périodate de sodium.

Un volume de produits ES est additionné de 3 volumes d'acide chlorhydrique, d'acide trichloracétique ou de périodate de sodium aux concentrations indiquées dans le tableau 3. Le mélange est centrifugé 30 min. à 10 000 x g après une heure d'incubation, puis mis à dialyser contre du tampon PBS durant 48 heures à 4°C. L'activité antigénique des molécules ES testée dans le 2S-IRMA n'est pas affectée par ces traitements (Tabl.3).

3.3. Sensibilité aux protéases.

Les produits ES de ver adulte de *B. malayi* ont été incubés en présence de diverses protéases: trypsine, chymotrypsine, protéinase K et pepsine à des concentrations de 0.1, 1 et 10 mg/ml ou pronase de *Streptomyces griseus* à 0.1 et 1 mg/ml. L'action de ces enzymes n'affecte pas la reconnaissance des antigènes ES par l'anticorps AA3-44 (Tabl.3).

4. Adsorption des antigènes ES de *B.malayi* sur les lectines.

Deux chromatographies sur colonne de WGA-Sépharose et ConA-Sépharose (Pharmacia, Les Ulis, France) ont été réalisées afin d'identifier l'existence de structures glucidiques dans les antigènes ES de *B. malayi*.

4.1. Adsorption sur la WGA-Sépharose: une lectine spécifique de la N-acétyl glucosamine. Les résultats montrent que la fraction majoritaire de ces antigènes est retenue et éluée spécifiquement par l'acétyl-glucosamine bien que l'effluent en contienne également un peu (Tabl.4).

| | Durée et Température du traitement | Activité antigénique déterminée par le test 2S-IRMA(%), après traitement |
|-------------------------------|------------------------------------|--|
| Traitement physique | | |
| Chaleur | 5 min. 100°C | 100 |
| | 15 min. 100°C | 96 |
| | 30 min. 100°C | 98 |
| Traitement chimique | | |
| Acide chlorhydrique | 1N | 97 |
| | 0.5N | 88 |
| | 0.1N | 91 |
| Périodate de Sodium | 200mM | 97 |
| | 100mM | 100 |
| | 10mM | 90 |
| | 1mM | 88 |
| Acide trichlor-acétique (TCA) | 20% | 96 |
| | 10% | 97 |
| | 5% | 94 |
| Traitement enzymatique | | |
| Proteinase K | 10mg/ml | 96 |
| | 1mg/ml | 98 |
| | 0.1mg/ml | 100 |
| Pepsine | 10mg/ml | 95 |
| | 1mg/ml | 98 |
| | 0.1mg/ml | 98 |
| Pronase | 1mg/ml | 97 |
| | 0.1mg/ml | 97 |
| Chymotrypsine | 10mg/ml | 98 |
| | 1mg/ml | 97 |
| | 0.1mg/ml | 95 |
| Trypsine | 10mg/ml | 95 |
| | 1mg/ml | 96 |
| | 0.1mg/ml | 92 |

Tabl. 3. Traitement physique, chimique et enzymatique des antigènes ES de ver adulte de *Brugia malayi* et test de l'activité antigénique résultante.

| | | | Activité antigénique dans le 2S-IRMA (CPM) | |
|-------|--|---|--|-------------|
| | | | ES <i>in vitro</i> dans RPMI | RPMI témoin |
| WGA | Effluent | 1 | 2900 | 1400 |
| | | 2 | 2100 | 1360 |
| | Eluat (Acétyl-glucosamine) | 1 | 12800 | 1300 |
| | | 2 | 8300 | 1180 |
| Con A | Effluent | 1 | 6050 | 1300 |
| | | 2 | 3900 | 1450 |
| | Eluat (Méthyl- D-manno- pyrannoside) | 1 | 3900 | 1500 |
| | | 2 | 2850 | 1600 |

Tabl. 4. Affinité des antigènes ES de ver adulte de *Brugia malayi* pour les lectines Con-A (Concanavaline A) et WGA ("Wheat Germ Agglutinin"). Comptage de l'activité antigénique retrouvée dans les effluents successifs 1 et 2 (antigène non fixé à la lectine) et dans les éluats 1 et 2 (antigène fixé et décroché spécifiquement par un glucide).

L'affinité de la WGA pour les antigènes ES de *B.malayi* reconnu par AA3-44 suggère la présence de structures glucidiques dans ces antigènes.

4.2. Adsorption sur la ConA-Sépharose: une lectine spécifique de l' α -mannose et du β -glucose. Les résultats présentés sur le tableau 4 indiquent que la fraction de l'antigène retenue par la ConA est moins importante que celle retenue par la WGA. Dans les conditions expérimentales utilisées, la ConA présente peu d'affinité pour les antigènes ES de *B. malayi* reconnus par AA3-44. Ces derniers sont surtout retrouvés dans l'effluent de la colonne.

5. Marquage des produits ES à l'¹²⁵ iode.

Des essais de marquage à l'¹²⁵ iode des produits ES de ver adulte de *B. malayi* après immunoadsorption par AA3-44 se sont révélés négatifs. L'absence d'acides aminés à noyau tyrosine peut en être la cause.

6. Marquages métaboliques des produits ES.

Le marquage métabolique des produits ES de ver adulte de *B. malayi* par la méthionine ³⁵S a mis en évidence l'existence de molécules marquées de >200.0, 167.9, 103.8, 58.0 et 38.2 kDa. Mais aucune de ces molécules n'est immunoprécipitée par l'anticorps AA3-44, ni par des sérums de patients filariens (résultats non présentés).

Le marquage métabolique par le glucose ³H, le mannose ³H et le fucose ³H n'engendre pas de molécule tritiée excrétée/sécrétée dans le milieu.

7. En conclusion,

- La résistance des molécules ES de *B.malayi* reconnues par AA3-44 à l'ébullition, aux acides et au périodate de sodium,
 - Leur insensibilité aux protéases,
 - Leur affinité pour la lectine WGA
 - L'apparente difficulté de marquage à l'¹²⁵ iode
- suggèrent la nature essentiellement glucidique de ces antigènes ES.

LES ANTIGENES CIRCULANTS DANS LES SCHISTOSOMIASES

Article 4

Valeur immunodiagnostique d'un anticorps monoclonal anti-antigène cathodique "M" de *Schistosoma mansoni* appliqué à la schistosomiase.

Les tests de détection d'antigènes circulants "M" de *S. mansoni* ont initialement utilisés des anticorps polyclonaux (Carlier *et al.*, 1980c; Santoro *et al.*, 1980a). La technologie des hybridomes a rendu possible la production d'anticorps monospécifiques à grande échelle, et a été appliquée à l'obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre les produits ES de ver adulte de *S. mansoni*. Plusieurs anticorps monoclonaux de souris dirigés contre les produits ES de vers adultes de *S. mansoni* ont été obtenus. En immunoélectrophorèse, tous les anticorps révèlent un système précipitant cathodique semblable à l'antigène "M". Parmi eux, l'anticorps 40B1, d'isotype IgG3, immunoprécipite l'antigène circulant cathodique (antigène "M") contenu dans l'urine de hamster infesté par *S. mansoni*. L'anticorps 40B1 est reconnu comme spécifique du genre *Schistosoma* et du stade adulte du ver.

L'utilisation de cet anticorps dans la mise au point d'un test immunoradiométrique (RIPEGA) de détection d'antigènes circulants s'est heurtée à des problèmes de faux positifs parmi les sujets non infestés présentant de forts taux de facteurs rhumatoïdes. Aussi, la mise au point d'un test immunoradiométrique à double site (2S-IRMA) a été envisagé. Dans ces conditions, la sensibilité du test est 10 fois supérieure à celle du RIPEGA, et la présence de forts taux de facteurs rhumatoïdes n'interfère pas dans le dosage. Le test 2S-IRMA appliqué à la recherche d'antigènes bilharzien chez des patients Brésiliens infestés par *S. mansoni*, détecte des taux sériques et urinaires qui sont corrélés significativement ($r=0.69$, $P < 0.01$, $n=29$). De plus, une corrélation positive entre le taux d'antigènes sériques et le comptage d'oeufs dans les selles est notée ($r=0.65$, $P < 0.01$, $n=25$).

Clin. exp. Immunol. (1986) **65**, 223-231.

Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by a monoclonal antibody

I. Specificity analysis of a monoclonal antibody with immunodiagnostic capacity

J. A. NOGUEIRA-QUEIROZ, C. LUTSCH, MONIQUE CAPRON, J. P. DES-
SAINT & A. CAPRON *Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte
INSERM U 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex,
France*

(Accepted for publication 25 February 1986)

SUMMARY

Monoclonal antibodies were obtained after immunization of mice with *Schistosoma mansoni* excretory/secretory antigen, previously shown to contain the circulating cathodic (M) antigen. Among these, the 40:B1 monoclonal antibody proved to be specific for the schistosome genus and to detect only adult worm-derived antigens as shown both by immunoprecipitation and with a two-site immunoradiometric assay using the monoclonal as both the solid-phase and the labelled antibody. The two-site immunoradiometric assay allows a sensitive measurement (detection limit: 5 ng) of circulating schistosome antigen in blood and in urine from patients with schistosomiasis. The amount of circulating schistosome M antigen is correlated with schistosome egg excretion in stool.

Keywords circulating antigens schistosomes radioimmunoassay

INTRODUCTION

A major characteristic of parasitic infections is the presence of a variety of antigens in the circulation of man and other infected hosts. In schistosomiasis, various parasite-derived antigens have been detected in biological fluids in human and experimental infections (Okabe & Tanaka, 1961; Berggren & Weller, 1967; Gold, Rosen & Weller, 1969; Nash, 1974; Carlier *et al.*, 1975; Deelder *et al.*, 1976; Santoro *et al.*, 1978; Abdel-Hafez, Phillips & Zodda, 1984).

Schistosomes excrete or secrete many antigenic specificities in the bloodstream of their hosts. Among these, only a few are suitable for immunodiagnosis, because of their cross-reactivity with other parasites or of their rapid removal and degradation by the host, as it is found with some polysaccharide antigens of short biological half life, eliminated in the urine as non-antigenic materials (Nash, 1982; 1983). This is fortunately not the case for all circulating antigens. A comparison of polysaccharide antigen from schistosomes showed that *Schistosoma mansoni* releases in the host circulation two main molecular species, the circulating anodic antigen (Deelder *et al.*, 1976) and the 'M' antigen (Carlier *et al.*, 1975) with cathodic mobility. *S. japonicum* in contrast was found to produce seven circulating molecules, among which the circulating anodic antigen is the major molecule, but is immunologically identical to the *S. mansoni* anodic antigen (Quian & Deelder, 1983). The circulating cathodic (M) antigen of *S. mansoni* is detected in the urine.

Correspondence: Dr J. P. Dessaint, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille Cédex, France.

serum and milk of infected individuals (Carlier *et al.*, 1975; Santoro *et al.*, 1977; 1978; Carlier *et al.*, 1980b), and has been characterized as a polysaccharide originating from the cells lining the schistosome gut. It is absent in schistosome eggs (Andrade & Sadigursky, 1978; Carlier *et al.*, 1980a).

In the diagnosis of parasitic infections, circulating antigens may represent interesting tools (Mott & Dixon, 1982; Dessaint & Capron, 1982) in two aspects: both qualitatively, because of the difficulties sometimes encountered in the direct detection of the parasite or in the evaluation of the specific immune response of the patient; and also quantitatively, since they may serve as markers of the intensity and severity of the disease, or may indicate the efficiency of chemotherapy.

Polyclonal antibodies were initially used to quantitate circulating cathodic antigen (Carlier *et al.*, 1980b). The preparation of hybridomas which secrete monoclonal antibodies (Köhler & Milstein, 1975) permitted the large-scale production of monospecific reagents without the necessity of using purified antigenic preparations for the immunization. The first monoclonal antibodies against schistosomes were produced by Verwaerde *et al.* (1979), but these antibodies, although recognizing an epitope immunodominant in infected humans (Dissous, Prata & Capron, 1984), were not specific for circulating antigens. Abdel-Hafez *et al.* (1984) and Abdel-Hafez, Phillips and Zodda (1984) prepared mouse monoclonal antibodies which recognized different stages of schistosomes and could specifically detect circulating schistosome antigens, but these antibodies were mainly egg-specific and have not been evaluated in human schistosomiasis.

The present paper describes another strategy, based on the detection of adult worm-derived circulating antigens by monoclonal antibodies produced in the mouse and directed against the circulating cathodic (M) antigen.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and animals. *S. mansoni* (Puerto Rican strain) was maintained by passage in *Biomphalaria glabrata* snails and golden hamsters. Male syngeneic BALB/c mice (Iffa Credo, France) were used for immunization.

Parasite antigens. Excretory/Secretory antigens (ESA) were obtained from adult *S. mansoni* worms incubated for 3 h in a water bath at 37°C according to Capron *et al.* (1968). This preparation previously shown to contain the circulating cathodic (M) antigen (Carlier *et al.*, 1978, 1980a) was used for immunization of mice. *Schistosoma mansoni* polysaccharide antigens were prepared by affinity chromatography on Con-A Sepharose (Capron *et al.* in Mott & Dixon, 1982). Trichloroacetic acid (TCA) soluble extract of *S. mansoni* was prepared as described by Carlier *et al.* (1980a). Urinary *S. mansoni* antigen was obtained from pooled bladder punctures of *S. mansoni* infected hamsters, using normal hamster urine as a control. The urine was centrifuged (2000 g, 10 min), desalted by dialysis against distilled water and lyophilized. It was reconstituted in distilled water to its original volume or concentrated if necessary. Soluble egg antigen of *S. mansoni* was prepared according to the method of Boros and Warren (1970). Soluble antigenic extracts from schistosomes, *Fasciola hepatica*, *Dipetalonema viteae*, *Ascaris suum* and hydatid cyst fluid from *Echinococcus granulosus* were prepared as previously described (Capron *et al.*, 1968). All antigenic preparations were lyophilized. Antigen concentrations are reported as the dry weight of lyophilized materials resuspended in saline or serum.

Immunization of mice. BALB/c mice of 10–12 weeks of age were injected with 200 µl ESA (protein concentration: 0.5 mg/ml) in complete Freund's adjuvant both via the subcutaneous route and into their footpads. Two similar injections were performed at 15 and 25 days after the first immunization. Two mice, selected for their best precipitin response against adult *S. mansoni* antigen in immunodiffusion analysis were injected at day 40 intravenously with 20 µl of the same antigenic preparation (ESA) but without adjuvant. Four days later, the spleens were removed and the cell suspensions prepared for fusion.

Cell fusion and selection of hybrids. Cell fusion between splenic lymphocytes from BALB/c mice immunized with excretory/secretory *S. mansoni* antigens and the non-secreting myeloma cell line SP₂O was used. The hybridization technique was essentially similar to that described by Grzych *et al.* (1982), using PEG as the fusion agent. Hybrid cell culture supernatants from each well were collected and screened by indirect immunofluorescence on cryostat sections of schistosomula and

adult worms of *S. mansoni*, as well as by a radioimmunoassay using soluble antigen (as described below). Cells were cloned by the limiting dilution technique. Positive clones were injected subcutaneously into BALB/c mice to induce solid tumours. After homogenization of these tumours, cells were injected into the peritoneal cavities of BALB/c mice and the ascitic fluids were collected 2 weeks later and stored at -20°C until use.

The purification of the monoclonal antibodies was carried out by using 33% ammonium sulfate precipitation and DEAE ion exchange chromatography.

Determination of antibody subclass and specificity. Ouchterlony and radioimmunoassay tests were carried out with the supernatants of hybrid cells and heavy chain-specific antisera to mouse IgM, IgG1, IgG2a, IgG3 and IgA, purchased from Bionetics Labs (MD, USA).

As some of the monoclonal antibodies were shown to immunoprecipitate schistosome antigens, their specificity was investigated using immunodiffusion in gel techniques, performed with hybrid cell supernatants, ascitic fluids or purified antibodies and various parasite antigens.

Immunofluorescence test. Cryostat sections of *S. mansoni* schistosomula or adult worms were fixed in cold propanone (acetone) for 10 min. Hybrid cell supernatants were concentrated three times by lyophilization and placed (50 μl) on the worm sections for 30 min. After three washings in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, fluorescein-labelled antimouse immunoglobulins (Miles-Yeda, Rehovot, Israel) diluted 1:40 in PBS were added for 30 min. Positive (immune mouse serum) and negative (normal mouse serum or myeloma cell culture supernatants) controls were included in each experiment.

Radiolabelling of the monoclonal antibody. The purified monoclonal antibodies were radioiodinated by the chloramine T technique (Hunter & Greenwood, 1962), modified as follows: 200 μg of purified antibodies were mixed with 0.2 mCi ^{125}I -sodium iodide (Amersham, Les Ulis, France) and chloramine T at 4°C and the iodation was stopped after 2 min by addition of sodium metabisulfite. The radiolabelled antibody was recovered by gel-filtration through PD 10 columns (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The average specific activity was 1 mCi/mg. To check the immunological properties of the labelled monoclonal, radioimmuno-electrophoresis was used as a quality control. Immuno-electrophoresis was performed as described by Capron *et al.* (1968), but by using a mixture of unlabelled polyclonal and radiolabelled monoclonal antibodies (5×10^6 cf/min/well). The plates were then extensively washed, dried and autoradiographed with an X-OMAT AR Film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA).

Radioimmunoprecipitation PEG assay (RIPEGA). The assay was performed as described by Santoro *et al.* (1978). Briefly, different concentrations of urine from schistosome-infected hamsters were dissolved in normal human or mouse serum diluted 1:5 (v:v) in 0.1 M borate buffer, pH 8.4. Equal volumes (200 μl) of urine samples and radioiodinated monoclonal antibody (10^4 ct/min) were mixed. After incubation for 1 h at 37°C , followed by a 4 h incubation at room temperature, 3 ml of 8% (w/v) PEG in borate buffer were added and the samples were incubated overnight at 25°C . After centrifugation (1500 g, 20 min at 4°C) the precipitate was washed in 8% PEG and the radioactivity was measured in a Gamma counter. All tests were done in duplicate. Results were expressed as percentage of radioactivity present in the precipitate.

Two-site immunoradiometric assay. Flexible polyvinyl plates (Falcon, Becton Dickinson, Oxford, UK) were coated with 100 μl mouse monoclonal antibody (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) diluted in 0.05 M carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 by incubation for 3 h at room temperature and further 12 h at 4°C . Unbound monoclonal antibody was removed by eight extensive washings of the microplates in 0.01 M PBS pH 7.6 containing 0.2% Tween (PBS/Tween). Aliquots of 100 μl of the samples diluted 1:2 (v/v) in PBS were added and incubated for 3 h at room temperature. After eight washings in PBS/Tween, 100 μl of radioiodinated monoclonal antibody (10^5 ct/min/well) were incubated 3 h at room temperature. The unbound radioactive antibody was aspirated and the wells were washed five times with 200 μl of PBS/Tween. The radioactivity of each well was measured in a Gamma counter.

Serum and urine samples. *S. mansoni* infected hamsters or mice were bled by retroorbital puncture. Infected patient sera and urines as well as control samples from uninfected humans were obtained from endemic and non-endemic areas from Brazil and Kenya respectively. Serum and urine samples were stored at -20°C . Rheumatoid factor and circulating immune complex (^{125}I -C1q-binding test) levels were measured to assess their influence in the radioimmunoassay results.

Table 1. Immunological properties of monoclonal antibodies against *S. mansoni* excretory/secretory antigen

| Isotype | Structure recognized (IFT)* |
|---------|---|
| IgG3 | κ Adult caecum and somatic antigen |
| IgM | κ Adult tegument |
| IgG1 | κ Adult tegument |
| IgM | κ Adult somatic antigen |
| IgM | κ Adult somatic antigen |
| IgM | κ Adult caecum |

* Indirect fluorescence on cryostat reactions of adult *S. mansoni*.

RESULTS

Production of monoclonal antibodies.

Various monoclonal antibodies were obtained by hybridization of lymphoid cells from ESA-immunized mice and SP₂O cells. Of these, several were shown to recognize an antigen with the properties attributed to the cathodic (M) antigen (Table 1), namely a positive fluorescence reaction on the caecum of adult worms (Fig. 1). Various antibody (sub)classes were found in the hybrid supernatants. Among them, a monoclonal named 40:B1 of the IgG3 κ -subclass was selected.

Species and genus specificity of the monoclonal antibody

An important characteristic of the monoclonal antibody 40:B1 is its capacity to immunoprecipitate

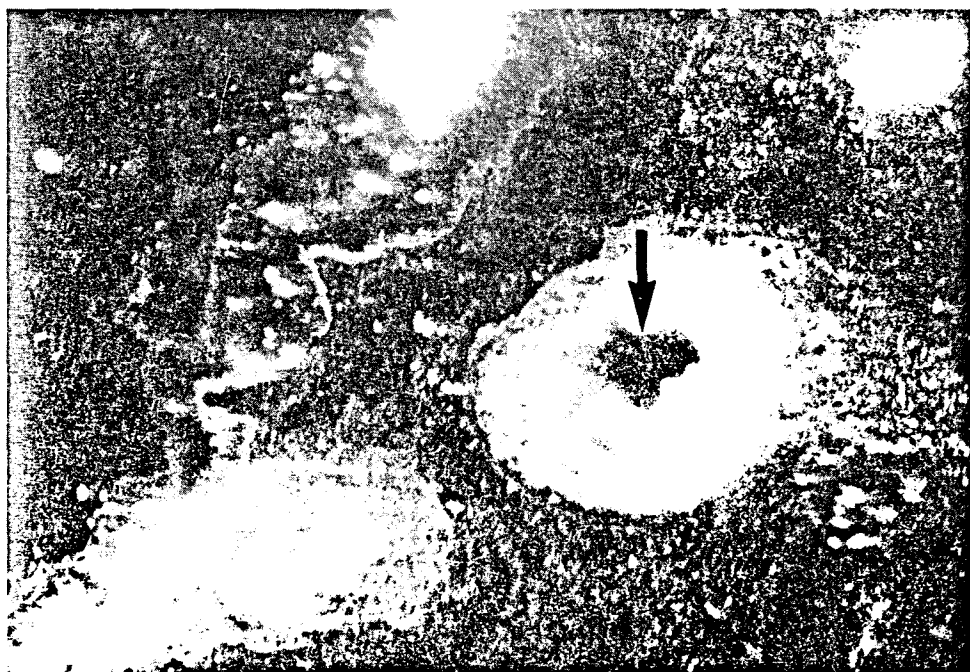


Fig. 1. Indirect fluorescence of 40:B1 monoclonal antibody. Cryostat sections of adult worms were incubated with 40:B1 monoclonal, then with fluorescein-labelled anti-mouse Ig. Staining of the worm caecum is observed.

Circulating antigen in schistosomiasis

227

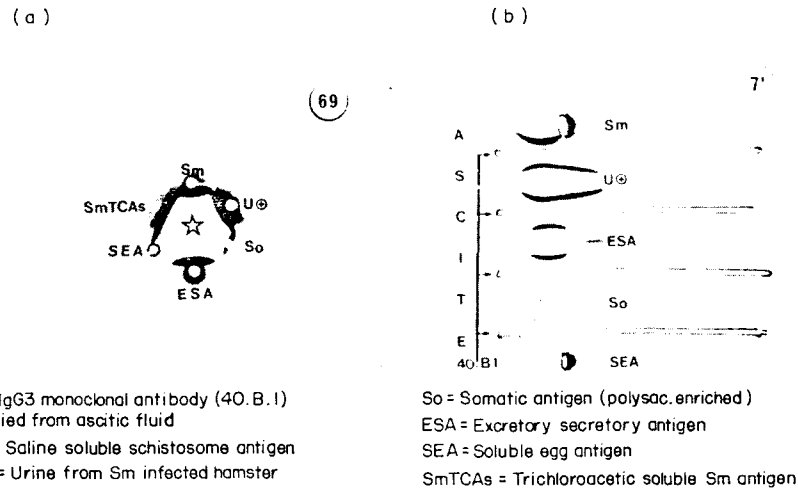


Fig. 2. Specificity of 40: B1 monoclonal antibody as studied by immunodiffusion in gel against various parasite antigens:

(a) Identity reaction with adult *S. mansoni* saline extract (top well) (Sm), TCA-soluble extract (Sm TCAs) and urine of *S. mansoni*-infected hamsters (U⁺) shown by the 40: B1 monoclonal antibody. A precipitin line is also found with excretory/secretory antigens of adult worm (ESA) but not with soluble egg antigen (SEA).

(b) Immunoelectrophoresis of the 40: B1 monoclonal antibody (ascitic fluid) against adult *S. mansoni* antigen (Sm), urine from infected hamster (U⁺), excretory/secretory antigen (ESA), showing the cathodic position of the precipitin line. No reaction is found with SEA. Contrary to Fig. 2a, no precipitation is observed with somatic antigen (So), which was used in immunoelectrophoresis at lower concentration than in the Ouchterlony test of Fig. 2a.

soluble schistosome antigens. By the Ouchterlony technique, a genus and adult stage specificity for schistosomes was found. A reaction of identity was indeed obtained between schistosome antigen in urine from infected hamsters and different preparations of adult schistosomes. As shown both by Ouchterlony test (Fig. 2a) or by immunoelectrophoresis (Fig. 2b), no precipitation was obtained with soluble egg antigen, confirming therefore the anti-M specificity of the monoclonal antibody. None of the antigenic extracts from other parasites reacted with the 40: B1 antibody (not shown).

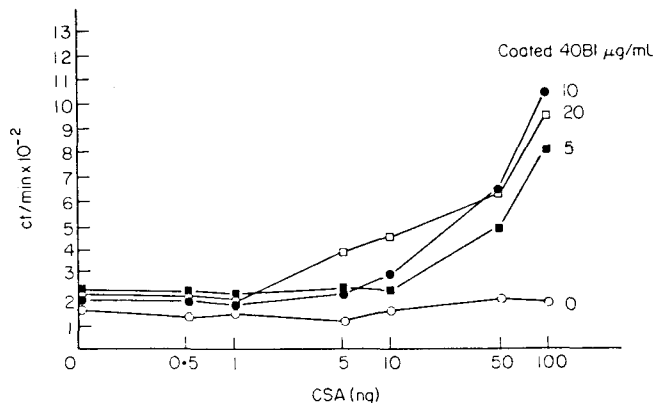


Fig. 3. Two-site immunoradiometric assay using labelled 40: B1 monoclonal antibody. Polystyrene microplates were coated with the 40: monoclonal antibody at the indicated concentration. A standard curve was made by adding the indicated amount of infected hamster urine (lyophilized) as a source of antigen (CSA) resuspended in normal human serum. A concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ monoclonal antibody was chosen for coating in subsequent assays.

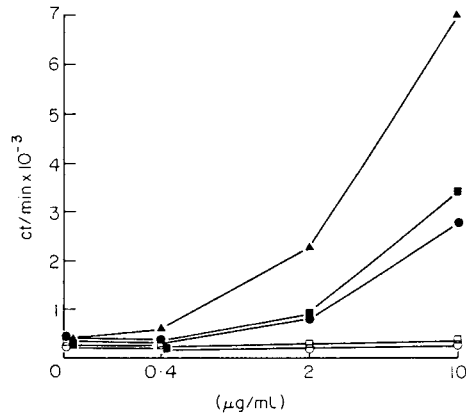


Fig. 4. Specificity of the two-site immunoradiometric assay using the 40:B1 monoclonal. Normal human serum was supplemented with the indicated concentrations of parasite antigens. Only antigenic preparations from adult worms of *S. mansoni* (▲) or *S. bovis* (■) gave positive results in the assay. *S. mansoni* schistosomulum antigen could not be detected (□), as well as extracts from other parasites (*Fasciola hepatica*, *Dipetalonema viteae*, *Ascaris suum* and *Echinococcus granulosus*) (○). (●) *S. mansoni*-infected hamster (urine).

As a control of specificity after radiolabelling, ¹²⁵I-labelled monoclonal 40:B1 antibody was able to precipitate the cathodic (M) antigen after mixing with monospecific polyclonal antibodies. By radioimmunoelectrophoresis, a single cathodic precipitation line was revealed by autoradiography, indicating the immunoreaction of the labelled monoclonal in the immunoprecipitate (not shown).

Radioimmunoassay of circulating Schistosome antigen

The radioimmunoprecipitation PEG assay (RIPEGA) was first used to evaluate the capacity of 40:B1 monoclonal antibody to detect circulating schistosome antigen (CSA) in infected patient sera. The PEG concentration of 8% was found optimal to precipitate the immune complexes without precipitating free mouse IgG3. Various concentrations of urinary *S. mansoni* antigen or ESA (0 to 10 µg/ml) (dry weight of the lyophilized materials) were mixed with normal human serum, and the detection limit was found to be 50 ng of antigen. Although the RIPEGA could detect circulating schistosome antigen in infected patient sera, false positive results were found in endemic controls, and sera from uninfected humans with high levels of rheumatoid factor yielded significant PEG-precipitates not shown. Alternative techniques were thus investigated.

Two-site immunoradiometric assay

Polyvinyl flexible plates coated with several concentrations of the 40:B1 monoclonal antibody were used as the solid phase. As shown in Fig. 3, an antibody concentration of 10 µg/ml appeared optimal for coating the microplate wells. By using infected hamster urine or ESA as a standard for (crude) circulating antigen, a detection limit of between 5 and 10 ng (dry weight) was found. The applicability of the two-site immunoradiometric assay for the detection of circulating schistosome antigen was shown by using serial dilutions of infected human serum, with a progressive decrease in the bound radioactivity.

Conversely, immunoprecipitation of patient sera containing circulating schistosome antigen by an excess of (unlabelled) 40:B1 monoclonal before the assay led predictably to a progressive decrease in the bound radioactivity with the amount of cold monoclonal used, and unrelated monoclonal antibodies had no such reducing effect (data not shown).

The genus specificity of the 40:B1 monoclonal antibody was confirmed using the immunoradiometric assay. As shown in Fig. 4, no other parasite extract could indeed react in the assay at concentration up to 10 µg/ml. Not all schistosome antigens could even be detected in the immunoradiometric assay, and the adult stage specificity already found by immunoprecipitation was confirmed using the more sensitive immunoradiometric assay.

Circulating antigen in schistosomiasis

229

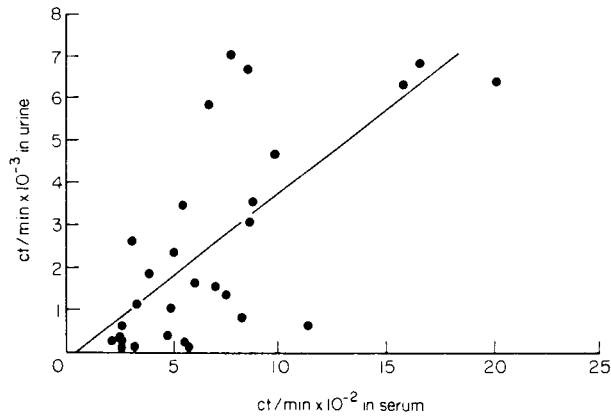


Fig. 5. Results with two-site immunoradiometric assay of urine or serum samples from the same *S. mansoni*-infected patients. The calculated regression line $y = 3.67x - 21.83$ is shown. A positive correlation is found between circulating antigen level in serum and urine ($r = 0.69$, $P < 0.01$).

Studies to detect the presence of circulating schistosome antigen

Studies on application of the immunoradiometric assay to the immunodiagnosis of schistosome infection are detailed in the accompanying report (Feldmeier *et al.*, 1986).

Low binding was obtained using the immunoradiometric assay with sera from uninfected humans, even those containing high levels of rheumatoid factors.

The reproducibility was estimated by repetitive measurements of serum or urine samples containing low, medium or high levels of circulating schistosome antigens. Within assay variation was 8.5%, inter-assay variation was 12.3% ($n = 10$).

Circulating schistosome antigen was detected in serum and urine of infected humans, and a significant correlation was found between serum and urine concentrations (Fig. 5). A correlation was also found between circulating antigen levels and *S. mansoni* egg counts in stools ($r = 0.65$, $P < 0.001$).

DISCUSSION

These studies indicate that an assay using the 40: B1 monoclonal antibody provides a suitable test for detection of the adult schistosome-derived M antigen in the serum or urine of infected hosts.

Two stages of the life cycle of schistosomes, the egg and the adult worm, present lasting antigenic stimuli to their host, and are a source of persistent antigenemia in the circulation. Other immunoassays using polyclonal or monoclonal antibodies have allowed mainly the detection of circulating schistosome egg-derived antigens, in correlation with egg output. These assays cross-reacted with cercarial antigens but adult worm antigen was less efficiently detected (Abdel-Hafez *et al.*, 1983). An alternative approach is to assay antigens released by the adult worm in the circulation of infected animals or humans. Among these excretory/secretory products, the circulating cathodic (M) antigen was selected because of its presence not only in serum, but also in urine from infected hosts (Carlier *et al.*, 1975; Deelder *et al.*, 1976).

Indeed, most of the circulating antigens induce antibody responses in active infection, and the level of free schistosome antigen, i.e. in excess of molecules bound by antibodies, is low in serum. Furthermore, circulating antigen-antibody complexes introduce an additional complication in the assay system, as there is a competition between the antibody reagent of the test and antibodies in host serum, together with variable *in vitro* association-dissociation of complexed antigen depending on the antigen:antibody ratio of the immune complexes and the respective affinities of the reagent and host antibodies. Such interference are expected not to occur, at least with *S. mansoni*, with urine

samples where free antigen can be detected. Mice were immunized with excretory/secretory products from adult *S. mansoni*, which contains the cathodic (M) antigen (Carlier *et al.*, 1978; 1980a). These animals were used as spleen cell donors for the hybridization. Of the monoclonal antibodies produced against schistosomes, two were found specific for the gut, *i.e.* the demonstrated source of the M antigen (Carlier *et al.*, 1980a). The 40:B1 monoclonal was found suitable for measurement of the circulating cathodic (M) antigen. The IgG3 subclass of this antibody can be related to the polysaccharidic nature of the immunogen (Carlier *et al.*, 1980a) since polysaccharides induce a preferential antibody response of this isotype in mice (Perlmutter *et al.*, 1978).

Both by immunoprecipitation and by radioimmunoassay, the 40:B1 monoclonal antibody was found specific for the adult stage of schistosomes, with no recognition of schistosomulum or soluble egg antigens. Although binding homologous *S. mansoni* antigen more efficiently in the radioimmunoassay, the monoclonal was cross-reactive with *S. bovis* which is closely related to *S. haematobium*, but not with other trematode or cestode antigens, and appeared therefore specific for the genus *Schistosoma*. This cross-reactivity among schistosomes cannot allow in principle a precise identification of the present infection in patients from endemic areas where both *S. mansoni* and *S. haematobium* are found, but in fact, circulating cathodic (M) antigen levels appeared to be correlated with *S. mansoni* burden, but not with *S. haematobium*, as shown in the accompanying paper. It should be noted that the circulating anodic antigen of adult schistosomes is also cross-reactive (Qian & Deelder, 1983). Cross-reactivity is found as well with monoclonal antibodies to schistosome egg antigens (Abdel-Hafez *et al.*, 1984).

Two types of radioimmunoassays were investigated with the ¹²⁵I-labelled monoclonal antibody. The RIPEGA allowed the measurement of circulating cathodic (M) antigen in the serum from infected individuals with a detection limit of 50 ng/ml. Despite the adult schistosome specificity of the labelled antibody RIPEGA was found unsuitable for direct immunodiagnosis, because of the false positive results obtained with sera from uninfected patients containing high levels of rheumatoid factor. However, after absorption on IgG-coated dishes, the RIPEGA could detect circulating cathodic (M) antigen in patient sera without rheumatoid factor interference (Feldmeier *et al.*, 1986).

The immunochemical characterization of the M antigen revealed the occurrence of several antigenic moieties with different molecular weights, all recognized by monospecific antisera. The polymeric nature of the M antigen and its immunoprecipitation by the 40 B1 monoclonal suggested the presence of repetitive epitopes, which is suitable for the two-site immunoradiometric assay (Addison & Hales, 1971). By using the 40:B1 monoclonal both as the solid phase and labelled antibody, the M antigen could indeed be detected in excretory/secretory products from *S. mansoni* as well as in the serum and urine from infected hosts. The detection limit was estimated as between 5–10 ng of lyophilized adult *S. mansoni* excretory/secretory products, and a seven-fold difference in binding was observed between control samples and samples supplemented with an excess of this antigen.

Studies with the immunoradiometric assay for immunodiagnosis of schistosome infection are detailed in an accompanying report (Feldmeier *et al.*, 1986), which indicate that the 40:B1 monoclonal represents a sensitive, rapid and technically feasible test to detect the presence of adult schistosome-derived circulating antigen in schistosomiasis mansoni.

Interestingly, a significant correlation ($r = 0.69$) was found between results of the immunoradiometric assay of serum and urine from the same infected individuals. This might be of value for clinical or epidemiological studies, especially in endemic areas where collection of blood samples is often difficult.

Thus, in summary, the two-site immunoradiometric assay using the 40:B1 anti-schistosome monoclonal antibody appears to be a sensitive and feasible technique to detect adult schistosome derived M antigen in serum and urine and to quantify active infection in schistosomiasis patients. Its application to immunodiagnosis of schistosomiasis is presently being evaluated in a collaborative programme with the International Atomic Energy Agency.

This work was supported by the International Atomic Energy Agency (3230 R2 TC). Serum and urine samples from endemic areas were kindly supplied by Professor Prata. The assistance of Mrs M. F. Massard and C. Colson is appreciated.

REFERENCES

- ABDEL-HAFEZ, S.K., PHILLIPS, S.M. & ZODDA, D.M. (1984) *Schistosoma mansoni*: Detection and characterization of schistosome derived antigens by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) utilizing monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* **55**, 219.
- ADDISON, C.M. & HALES, C.N. (1971) Two-site assay of human growth hormone. *Horm. Metab. Res.* **3**, 59.
- ANDRADE, Z.A. & SADIGURSKY, M. (1978) Immunofluorescence studies of schistosome structures which share determinants with circulating schistosome antigens. *Trans. Roy. Soc. trop. med. Hyg.* **72**, 316.
- BERGGREN, W.L. & WELLER, T.H. (1967) Immunoelectrophoretic demonstration of a specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. trop. med. Hyg.* **16**, 606.
- BOROS, D.L. & WARREN, K.S. (1970) Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble factor reaction isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. exp. Med.* **132**, 488.
- CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. & AFCHAIN, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.* **16**, 121.
- CARLIER, Y., BOUT, D., BINA, J.C., CAMUS, D., FIGUEIREDO, J.F.M. & CAPRON, A. (1975) Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. *Am. J. trop. med. Hyg.* **24**, 949.
- CARLIER, Y., BOUT, D. & CAPRON, A. (1978) Further studies on the circulating 'M' antigen in human and experimental *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Immunol. (Paris)* **129C**, 811.
- CARLIER, Y., BOUT, D., STRECKER, G., DEBRAY, H. & CAPRON, A. (1980a) Purification, immunochemical and biologic characterization of the schistosome circulating 'M' antigen. *J. Immunol.* **124**, 2442.
- CARLIER, Y., NZEYIMANA, H., BOUT, D. & CAPRON, A. (1980b) Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni* infected parturients and their newborn children. *Am. J. trop. med. Hyg.* **29**, 74.
- DEELDER, A.M., KLAPPE, H.T.M., VAN DEN AARDWEG, G.J.M.J. & VAN MEERBEKE, E.H.E.M. (1976) *Schistosoma mansoni*: demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Exp. Parasitol.* **40**, 189.
- DEELDER, A.M., KORNELIS, D., VAN MARCK, E.A.E., EVELEIGH, P.C. & EGMOND, J.G. (1980) *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamsters and human infection. *Exp. Parasitol.* **50**, 16.
- DESSAINT, J.P. & CAPRON, A. (1982) Immunoassays of antibodies and circulating antigens in schistosomiasis. *Clinics in Immunology*, **2**, 655.
- DISSOUS, C., PRATA, A. & CAPRON, A. (1984) Human antibody response to *Schistosoma mansoni* surface antigens defined by protection monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* **149**, 227.
- FELDMER, H., NOGUEIRA-QUEIROZ, J.A., PEIXOTO-QUEIROZ, M.A., DOEHRING, E., DESSAINT, J.P., DE ALENCAR, J.E., DAFALLA, A.A. & CAPRON, A. (1986) Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by monoclonal antibody II. The quantification of circulating antigens in human schistosomiasis mansoni and haematobium: relationship to intensity of infection and disease status. *Clin. exp. Immunol.* **65**, 232.
- GOLD, R., ROSEN, F.S. & WELLER, T.H. (1969) A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*: detection of antigens in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am. J. trop. med. Hyg.* **18**, 545.
- GRZYCH, J.M., CAPRON, M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J. Immunol.* **129**, 2739.
- HUNTER, W.M. & GREENWOOD, F.C. (1962) Preparation of iodine ¹³¹labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, **194**, 495.
- KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495.
- MOTT, K.E. & DIXON, H. (1982) Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bull. WHO.* **60**, 729.
- NASH, T.E. (1974) Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. trop. med. Hyg.* **23**, 1085.
- NASH, T.E. (1982) Factors that modulate the clearance and ultimate fate of a specific schistosome antigen (GASP) in schistosome infections. *J. Immunol.* **128**, 1608.
- NASH, T.E. (1983) Fate and mechanisms of clearance of PSAP, a schistosome antigen, in schistosomiasis. *J. Immunol.* **131**, 2520.
- OKABE, K. & TANAKA, T. (1961) Urine precipitation reaction for *Schistosomiasis japonica*. *Kurume Med. J.* **8**, 24.
- PERLMUTTER, R.M., HANSBURG, D., BRILES, D.E., NICOLOTTI, R.A. & DAVIE, J.M. (1978) Subclass restriction of murine anti-carbohydrate antibodies. *J. Immunol.* **121**, 566.
- QIAN, Z.L. & DEELDER, A.M. (1983) *Schistosoma japonicum*: immunological characterization and detection of circulating polysaccharide antigens from adult worms. *Exp. Parasitol.* **55**, 168.
- SANTORO, S., BOROJEVIC, R., BOUT, D., TACHON, P., BINA, C. & CAPRON, A. (1977) Mother-child relationship in human schistosomiasis mansoni. I. Parasitic antigens and antibodies in milk. *Am. J. trop. med. Hyg.* **26**, 1164.
- SANTORO, F., CAPRON, M., JOSEPH, M., ROUSSEAU-PREVOST, R. & CAPRON, A. (1978) Circulating antigens and immune complexes in *Schistosoma mansoni* infected rats. Characterization by radioimmunoprecipitation PEG assay (RIPEGA). *Clin. exp. Immunol.* **32**, 435.
- VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., BAZIN, H., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1979) Production d'anticorps monoclonaux anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire de leur activité biologique. *C.R. Acad. Sci.* **289**, 275.

Travaux non publiés**A. Détection d'antigènes circulants et urinaires bilharziens chez des sujets Kényans infestés par *S. mansoni* .**

Le test 2S-IRMA appliqué à la bilharziose a permis d'explorer 37 enfants Kényans infestés par *S. mansoni* et 49% des patients sont considérés comme positifs en antigène circulant. La valeur moyenne du taux d'antigène sérique ($x = 400.6$ ng/ml, s.e.m = 54.3 ng/ml, $n=37$) est significativement différente ($P < 0.05$) de celle des contrôles endémiques ($x = 173.8$ ng/ml, s.e.m = 62.5, $n = 9$). Un des neuf contrôles endémiques est également positif dans le test (Fig.13). Par contre, 84% des patients et 2 contrôles endémiques sont positifs en antigène urinaire. La valeur moyenne du taux d'antigène urinaire est également significativement différente ($P < 0.05$) de celle des contrôles endémiques ($x = 1819.2$ ng/ml, s.e.m = 239.0, $n = 37$ et $x = 468.8$ ng/ml, s.e.m = 121.2, $n=9$) (Fig. 13).

Les taux d'antigènes sériques et urinaires sont corrélés significativement ($r = 0.44$, $p < 0.05$, $n=37$) (Fig. 14). De même, il existe une corrélation entre le comptage des oeufs et l'antigène bilharzien, dans l'urine ($r = 0.59$, $p < 0.05$, $n=37$; Fig. 15) et dans le sérum ($r=0.29$, $p < 0.05$, $n=37$; Fig. 16).

Tout comme cela a déjà été observé dans le cas des filarioses, la sensibilité du test, supérieure dans l'urine par rapport au sérum, est probablement liée à l'absence d'interférence avec les anticorps dans le liquide biologique.

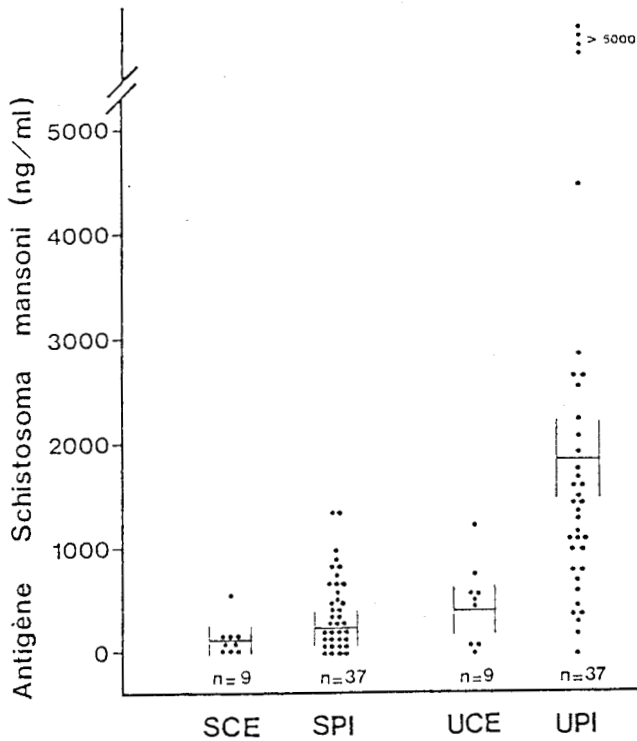


Fig. 13. Détection d'antigènes bilharziens par le test 2S-IRMA dans le sérum (S) et l'urine (U) d'enfants Kényans infestés par *Schistosoma mansoni* (PI) et de contrôles endémiques (CE). Le seuil de positivité est déterminé par la valeur moyenne ($\bar{x} + 2$ s.e.m) des taux d'antigènes bilharziens des contrôles endémiques.

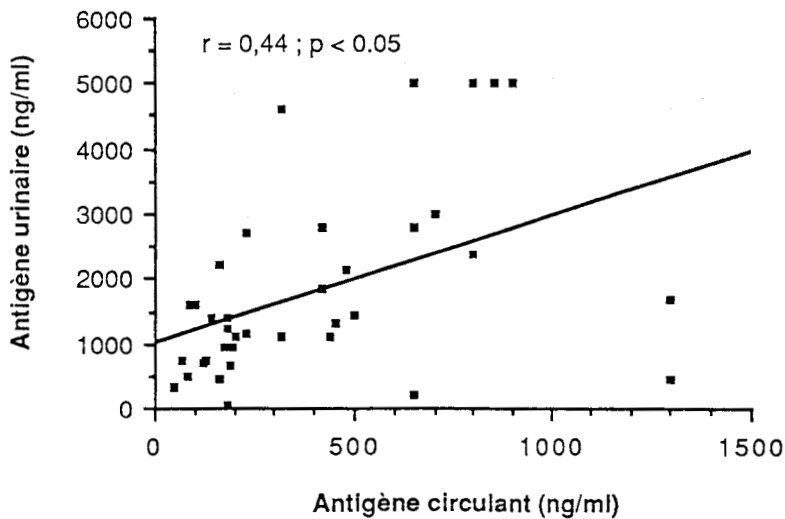


Fig. 14. Comparaison de l'antigénémie et de l'antigénurie de sujets Kényans infestés par *Schistosoma mansoni*. Une corrélation positive existe entre les deux paramètres ($r = 0.44$, $P < 0.05$, $n = 37$).

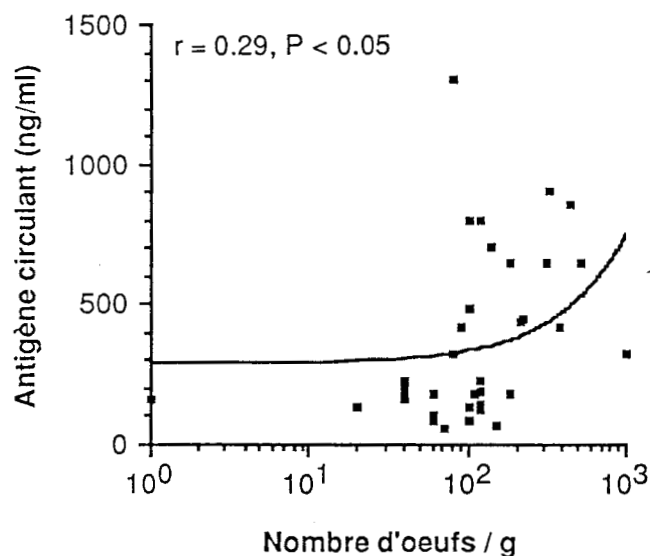


Fig. 15. Analyse de régression entre le comptage d'oeufs de *Schistosoma mansoni* dans les selles et l'antigénémie. Une corrélation significative existe entre les 2 paramètres ($r = 0.29, P < 0.05, n = 37$).

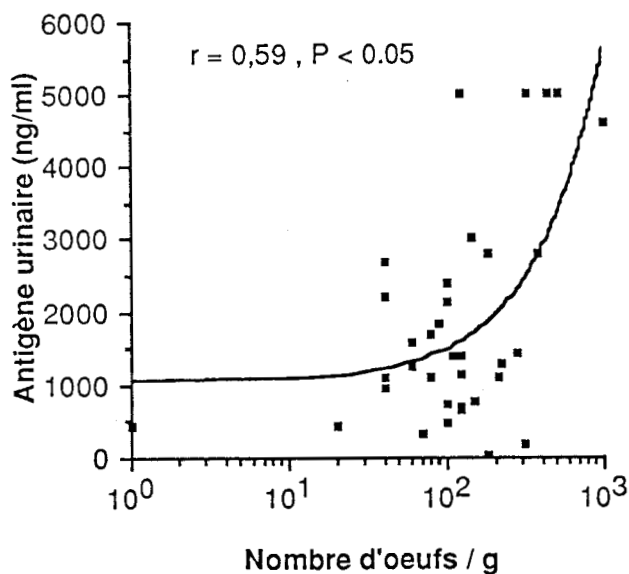


Fig.16. Analyse de régression entre le comptage d'oeufs de *Schistosoma mansoni* dans les selles et l'antigénurie. Une corrélation positive existe entre les 2 paramètres ($r = 0.59, P < 0.05, n = 37$).

B. Valeur diagnostique du test 2S-IRMA de détection d'antigènes bilharziens dans les schistosomiasis humaines.

L'évaluation de la valeur diagnostique en milieu hospitalier du test d'antigène circulant et/ou urinaire bilharzien a été réalisée dans une étude menée en collaboration avec le Docteur Barbier (Hôpital International de l'Université de Paris).

Des étudiants (390) ayant séjournés plus d'un an durant les 5 dernières années dans une zone de grande endémie bilharzienne, sont soumis à une recherche clinique, parasitologique, biologique et sériologique de bilharziose. Sur 25 bilharzioses sûrement évolutives (critère: oeufs viables), seuls 5 sérums présentent des antigènes circulants bilharziens (Tabl. 6). La sensibilité du test appliqué à ce groupe apparaît à première vue faible (20%). Parmi les 5 patients positifs, figurent pourtant 3 cas de non-répondeurs en recherche d'anticorps (ELISA ovulaire et IgE spécifiques) dans les bilharzioses évolutives (Tabl.7), ce qui montre l'intérêt de coupler la recherche d'antigènes circulants avec une technique d'immunodiagnostic classique.

Parmi les autres sujets positifs en antigène circulant et / ou urinaire, 11 (16-5; case A Tabl. 5) possèdent des anticorps spécifiques, et sont considérés comme patients bilharziens. Par contre, 42 autres sujets (case B, Tabl. 5) positifs en antigène bilharzien, sont négatifs en recherche directe du parasite et en recherche d'anticorps spécifiques. Cette forte proportion de faux positifs pose le problème de la spécificité de la recherche d'antigènes circulants en absence d'autres critères (p.ex. chute du taux d'antigènes circulants après traitement, présence d'hormones ecdystéroïdes). Parmi ces sujets, certains pourraient être des bilharziens non-répondeurs dans les tests de recherche d'anticorps et présentant une excrétion faible d'oeufs de schistosomes.

Le test 2S-IRMA détecte des antigènes circulants dans les schistosomiasis à *S.intercalatum*, *S. haematobium* et *S. mansoni*, et la spécificité est de 85% dans la présente étude. La sensibilité quant à elle, ne dépasse pas 15% pour la population étudiée.

| | | Paramètres parasitologique et/ou sérologiques (Anticorps) | | |
|---|---|---|---------|-----|
| | | + | - | |
| Antigène circulant / urinaire bilharzien 2S-IRMA | + | A 16 | B 42 | 58 |
| | - | C 89 | 243 | 332 |
| | | 105 | 285 | 390 |

Tabl. 5. Classification de la population étudiée en rapport avec l'antigène circulant /urinaire bilharzien.

A. Patients bilharziens.

B. Faux positifs.

C. Patients bilharziens considérés comme de faux négatifs.

| | | Paramètres parasitologique (recherche d'oeufs) | | |
|--|---|---|-----|-----|
| | | + | - | |
| Antigène circulant / urinaire bilharzien 2S-IRMA | + | 5 | 53 | 58 |
| | - | 20 | 312 | 332 |
| | | 25 | 365 | 390 |

Tabl. 6. Classification de la population étudiée (porteurs et non-porteurs d'oeufs de *Schistosoma mansoni*) en relation avec l'antigène circulant/urinaire bilharzien.

| | Antigène circulant et/ou urinaire bilharzien 2S-IRMA | | |
|--|--|---|---|
| | + | - | |
| Coprologie + et ELISA ovulaire - IgE spécifiques - | 3 | 3 | 6 |

Tabl. 7. Cas de bilharziose évolutive non-répondeurs en anticorps anti-schistosome en relation avec l'antigène circulant / urinaire bilharzien.

**EFFET DU TRAITEMENT ANTI-PARASITAIRE SUR L'EVOLUTION DES
ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES DANS LA FILARIOSE
LYMPHATIQUE ET LA SCHISTOSOMIASE: VALEUR PRONOSTIQUE DE
LEUR DETECTION.**

Pour évaluer l'efficacité d'un traitement anti-parasitaire, on a recourt habituellement à des méthodes parasitologiques ou sérologiques classiques.

Dans la filariose, bien que le nombre de microfilaries et les titres d'anticorps baissent après un traitement efficace, ces paramètres ne sont pas totalement satisfaisants. Le comptage des microfilaries ne peut être utilisé dans les cas de filarioses amicrofilarémiques, et dans des filarioses microfilarémiques certaines molécules filaricides peuvent n'affecter que les microfilaries et non les vers adultes. La réponse anticorps, quant à elle, décroît lentement après traitement et est soumise à des fluctuations difficiles à analyser.

Dans la schistosomiase, l'absence d'oeufs dans les selles et les urines n'est pas forcément le signe d'une absence de vers adultes viables. De plus, les méthodes de comptage sont relativement lourdes.

Aussi, le suivi des taux d'antigènes parasitaires circulants et urinaires a été proposé pour l'évaluation du traitement des parasites tissulaires.

A. Effet du traitement anti-filarien sur l'évolution des taux d'antigènes filariens.

**1. Traitement par la CGP 20376 de *Mastomys natalensis*)
infestés expérimentalement par *B. pahangi* .**

Cinq *Mastomys* infestés par *B. pahangi* sont traités par une dose unique de 1x25 mg/kg p.o. de CGP 20 376 (un macro- et microfilaricide). Suivant l'animal, la microfilarémie disparaît après 2 à 71 jours (Fig. 17). En parallèle, on note une chute complète totale de l'antigénémie chez 4 animaux sur 5, huit jours post-traitement. L'absence

d'antigènes filariens détectables alors que des microfilaires subsistent est peut-être liée à la présence d'anticorps spécifiques dont la production a été stimulée après lyse des premiers parasites. La présence possible d'antigènes circulants complexés en excès d'anticorps sont alors indétectables dans le test 2S-IRMA. L'activité métabolique des microfilaires et des vers adultes a peut-être été affectée par la DEC et a pour conséquence une chute de la libération des antigènes. Chez le cinquième animal traité, bien que la microfilarémie soit effondrée, l'antigénémie subsiste après une première chute. Cette part d'antigène filarien pourrait revenir aux vers adultes encore vivants.

2. Traitement à la DEC de patients filariens (Article 3: Valeur diagnostique d'un test d'antigènes circulants dans les filarioses humaines).

La recherche d'antigènes filariens avant et 2 à 4 semaines après une cure de DEC chez 35 sujets filariens amicrofilarémiques et 4 sujets microfilarémiques (une wuchérériose et 3 loases) met en évidence une chute significative ($P < 0.05$) des taux sériques ($x = 7171$ ng/ml, s.e.m = 1982 ng/ml, $n = 39$ et $x = 2167$ ng/ml, s.e.m = 858 ng/ml, $n = 29$) et urinaires ($x = 141$ ng/ml, s.e.m = 42 ng/ml, $n = 39$ et $x = 7.5$ ng/ml, s.e.m = 4.2 ng/ml, $n = 29$) après traitement.

La recherche des CIC spécifiques a été réalisée chez 27 des 39 sujets filariens. La présence d'IgM dans les CIC avant traitement est suivie de leur disparition après traitement en même temps que chute l'antigénémie (13 cas). Dans 3 autres cas, cet isotype apparaît dans les CIC après traitement, en même temps que l'antigénémie augmente. Les CIC à IgG deviennent indétectables après traitement dans 5 cas sur 7 et les CIC à IgA dans 3 cas sur 6.

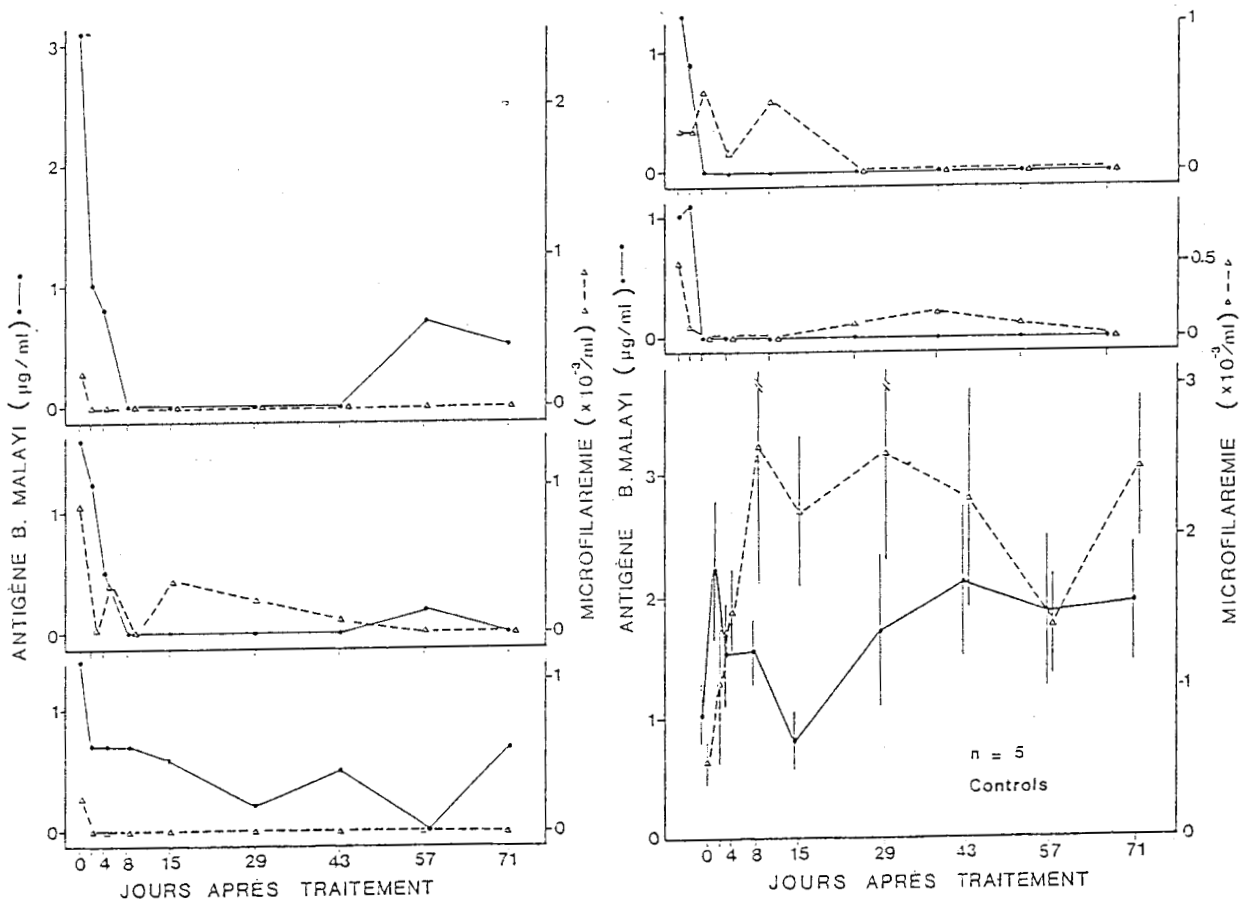


Fig. 17. Evolution de la microfilarémie et de l'antigène circulant chez 5 *Mastomys* infestés par *Brugia pahangi* et traités par une dose de CGP 20 376. Cinq autres animaux infestés et non traités servent de témoin.

| N° du Patient et filariose diagnostiquée | Premier échantillon | | | Second échantillon (après traitement à la DEC) | | | | |
|--|-------------------------------|---------------------------|-----|---|-------------------------------|-----------------------------|-----|-----|
| | Antigène circulant (ng/ml) | Immunoglobine dans CIC | | | Antigène circulant (ng/ml) | Immunoglobuline dans CIC | | |
| | Sérum | IgM | IgG | IgA | Sérum | IgM | IgG | IgA |
| 1 Wuchérériose? | 2400 | - | - | - | 16000 | + | - | ? |
| 2 Wuchérériose? | 1500 | - | + | - | 550 | - | - | - |
| 3 Wuchérériose? | 3400 | + | + | - | 1400 | - | - | - |
| 4 Wuchérériose | 1000 | + | - | - | 100 | - | - | - |
| 5 Wuchérériose | 520 | - | - | - | 150 | - | - | - |
| 6 Loase (mf+) | 20000 | - | - | - | 20000 | - | - | - |
| 7 Loase? | 17000 | + | - | - | 2500 | - | - | ? |
| 8 ? | 2500 | + | + | ? | 300 | - | - | - |
| 9 Onchocercose? | 7000 | + | + | - | 950 | - | - | - |
| 10 Loase? | 8000 | + | - | + | 1200 | - | - | + |
| 11 ? | 4500 | + | + | + | 350 | - | + | - |
| 12 Loase? | 3500 | - | - | - | 100 | - | - | - |
| 13 ? | 3500 | + | - | + | 150 | - | - | + |
| 14 ? prurit | 9500 | + | - | + | 650 | - | - | - |
| 15 Onchocercose? | 2250 | + | + | + | 480 | - | - | + |
| 16 ? | 2600 | + | - | - | 1200 | - | - | - |
| 17 ? | 1100 | + | + | + | 650 | - | + | - |
| 18 ? | 550 | - | - | - | 400 | - | - | - |
| 19 ? | 1000 | - | - | - | 50 | - | - | - |
| 20 Loase | 1300 | - | - | - | 800 | + | - | - |
| 21 Loase | 1200 | - | - | - | 110 | - | - | - |
| 22 ? prurit | 1200 | - | - | - | 1300 | + | - | - |
| 23 ? | 700 | - | - | - | 1150 | + | - | - |
| 24 Onchocercose | 1200 | + | - | - | 450 | - | - | - |

Tabl. 8: Taux d'antigène circulant et présence ou non de complexes immuns spécifiques chez 24 sujets filariens, avant et après traitement à la DEC. Ces 24 sujets font partie des 39 filariens rapportés dans l'article 3: Valeur diagnostique d'un test d'antigènes circulants dans les filarioses humaines.

B. Effet du traitement anti-bilharzien sur la détection d'antigènes circulants bilharziens chez des sujets infestés par *S. haematobium* .

Le test 2S-IRMA de détection d'antigènes circulants bilharziens a été appliqué à 27 enfants Ghanéens infestés par *S. haematobium* et traités au praziquantel. Des comptages d'oeufs dans les urines et la recherche d'antigène circulant ont été effectués avant traitement, puis 2, 4 et 12 semaines après -traitement.

| | | Pré-traitement | 2 semaines post-traitement | 4 semaines post-traitement | 12 semaines post-traitement |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Valeur moyenne pour 27 cas | Antigène circulant (ng/ml) | x = 62.5 sem = 15.6 n = 27 | x = 53.3 sem = 7.4 n = 17 | x = 53.7 sem = 8.0 n = 21 | x = 58.8 sem = 10.7 n = 21 |
| | Nombre d'oeufs/ 5ml | x = 124 sem = 17.3 n = 28 | x = 7.8 sem = 2.3 n = 24 | x = 7.8 sem = 2.5 n = 21 | x = 2.3 sem = 0.9 n = 21 |
| Patient n° 1328 | Antigène circulant (ng/ml) | 450 | 140 | 110 | 260 |
| | Nombre d'oeufs/ 5ml | 152 | 0 | - | 1 |

Tabl.9. Tableau récapitulatif des taux d'antigènes circulants et des comptages d'oeufs dans les urines avant et après traitement chez des patients infestés par *S.haematobium* .

Un faible taux d'antigènes circulants, proche du seuil de détection, est noté avant le traitement et aucune chute significative ($P > 0.05$) de ce taux n'est observée après traitement. Par contre, le nombre d'oeufs chute significativement ($P < 0.05$) jusqu'à 12 semaines après- traitement (Tabl. 9). Le cas du patient 1328, qui présente le plus fort taux d'antigènes circulants, est pourtant intéressant (Tabl. 5). En effet, aucun oeuf n'est retrouvé 2 semaines post-traitement; par contre, un oeuf est noté au bout de 12 semaines. En parallèle, l'antigénémie diminue jusqu'à 4 semaines post-traitement, puis remonte à la douzième semaine, ce qui laisse supposer que certains vers se sont rétablis du traitement et pondent à nouveau.

CHAPITRE IX

DISCUSSION

A. Détection d'antigènes parasitaires sériques et urinaires.

La présente étude montre que les antigènes circulants peuvent être quantifiés dans la schistosomiase et les filarioses lymphatiques, grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux en tests immunoradiométriques à deux sites.

Dans des enquêtes en zone d'endémie parasitaire, l'application de ces tests, a montré que dans l'urine, les dosages d'antigènes parasitaires sont plus sensibles que dans le sérum. Dans la schistosomiase à *S. mansoni*, l'antigénémie positive est déterminée chez la moitié des patients alors que près de 90% d'entre eux excrètent des antigènes urinaires. Dans le test 2S-IRMA de détection d'antigènes circulants anodiques (CAA), 50 à 95% des bilharziens à *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum* excrétant des oeufs sont positifs en antigène bilharzien (Deelder *et al.*, 1980; De Jonge *et al.*, 1988).

Dans la filariose lymphatique, 3/4 des sujets microfilarémiques et à peine 1/3 des patients en phase chronique/amicrofilarémique présentent des taux détectables d'antigène circulant. Une sensibilité similaire est rapportée dans d'autres études utilisant les 2S-IRMA avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux: 50 à 98% de positifs chez les sujets microfilarémiques et 15-60% chez les patients amicrofilarémiques (Hamilton *et al.*, 1984a; Dissanayake *et al.*, 1984; Forsyth *et al.*, 1985; Huijin *et al.*, 1987). Par contre dans l'urine, la spécificité et la sensibilité du dosage sont de 100% dans notre étude. Si la présence des antigènes urinaires est confirmée dans les filarioses lymphatiques (Weil *et al.*, 1986; Dissanayake *et al.*, 1984; Huijin *et al.*, 1987), aucune étude étendue n'a été rapportée sur ce sujet. La détection d'antigènes filariens apparaît donc comme étant le meilleur moyen de confirmation de la filariose lymphatique active dans des cas amicrofilarémiques. De plus, le test 2S-IRMA permet de distinguer entre sujets endémiques infectés et non infectés, ce que les tests de recherche d'anticorps anti-filaires ne peuvent réaliser pour le moment en raison des antigènes utilisés. La détection urinaire des antigènes a également un intérêt pratique quand on sait les difficultés logistiques et culturelles associées à la collecte de prélèvements sanguins en zone d'endémie. Ces tests

de recherche d'antigènes parasitaires circulants ont fait l'objet d'une étude multicentrique par l'Agence Internationale de l'Energie Atomique et nos résultats ont pu être confirmés par divers utilisateurs.

La détermination de la phase prépatente de l'infection filarienne est primordiale pour l'évaluation des campagnes anti-vectorielles et pour déterminer le statut infectieux des enfants amicrofilarémiques ou d'immigrants en zone d'endémie. La recherche d'antigènes circulants et urinaires à l'aide de l'anticorps AA3-44 en phase prépatente s'est avérée fructueuse dans nos modèles expérimentaux. Par contre, l'intérêt des tests de recherche d'antigène circulant aurait mérité d'être vérifié dans des études sur l'animal où l'inoculation répétée d'un faible nombre de larves L3 mime l'infestation humaine en zone d'endémie. Un élément de réponse a été apporté dans une infestation expérimentale de chimpanzé par une faible dose de larves infestantes d'*O. volvulus* : l'anticorps monoclonal Gib 13, dirigé contre les antigènes d'oeufs, détecte des antigènes circulants pendant une courte période de la phase prépatente (Weiss *et al.*, 1986). Ces anticorps disparaissent avec l'apparition des anticorps et restent indétectables par la suite.

En milieu hospitalier, les tests de détection d'antigènes parasitaires circulants ont été appliqués au diagnostic individuel. L'anticorps 40B1 détecte des antigènes circulants dans les bilharzioses à *S. mansoni*, *S. haematobium* et *S. intercalatum*. Si la spécificité du test est satisfaisante, la sensibilité par contre est faible. Dans des situations de faible intensité d'infection il est vraisemblable que l'anticorps 40B1 ne détecte pas ou peu les antigènes bilharziens. De plus, des infestations expérimentales ont montré que l'élimination (la clairance) des antigènes circulants est plus rapide chez des animaux faiblement infestés comparativement à des animaux fortement infestés (Nash *et al.*, 1982).

L'anticorps AA3-44 détecte des antigènes circulants et urinaires dans les filarioses lymphatiques (wuchérériose, brugiose), mais aussi dans d'autres filarioses (loase, onchocercose) et même certaines nématodoses (ankylostomiase, strongyloïdose). La sensibilité du test dans les échantillons d'urine n'a pas été confirmée. L'antigène peut être très dilué dans les urines, aussi l'utilisation d'une technique d'immunofiltration semble plus adaptée que le test 2S-IRMA. L'étude a porté sur 590 personnes, et a montré que la sensibilité (89%) et la spécificité (93%) du test sont très satisfaisantes, en dépit de la réaction croisée avec d'autres nématodes. A notre connaissance, aucune autre évaluation

d'un test de détection d'antigènes circulants filariens chez l'homme n'a été rapportée. Par contre, dans la dirofilariose de chien, cinq tests de type Dot-ELISA ont été comparés (Brunner *et al.*, 1988): leur spécificité varie entre 85 à 100% et leur sensibilité se situe entre 52 et 95%; les faux négatifs se trouvant parmi les animaux amicrofilarémiques.

L'application de tests de recherche d'antigènes parasitaires circulants et urinaires est envisageable. Si les techniques utilisant des radioéléments sont soumises à une législation restrictive, il n'en est pas de même pour les techniques immunoenzymatiques. Aussi l'utilisation d'un test 2S-ELISA, voire même d'un Dot-ELISA, peut être envisagée. Dans ce dernier test, le remplacement du support nitrocellulose, utilisé dans notre étude par une membrane d'immunofiltration, en fera un test de diagnostic rapide utilisable en dehors du laboratoire.

B. Les antigènes parasitaires circulants et urinaires dans l'évaluation du traitement anti-parasitaire.

La chimiothérapie anti-bilharzienne spécifique appliquée à des sujets infestés par *S. mansoni*, provoque une diminution du taux d'antigènes circulants CCA dans le test 2S-IRMA utilisant l'anticorps 40B1 (Feldmeier *et al.*, 1986). Dans des cas individuels, la disparition conjointe de l'antigène circulant CCA et des oeufs excrétés est notée. Dans la schistosomiase expérimentale de souris infestées par *S. mansoni*, l'antigène CAA disparaît après un traitement curatif ou sub-curatif (Shaker *et al.*, soumis). L'effondrement complet de l'antigénémie est observé 1-2 semaines avant l'excrétion des derniers oeufs, que les vers soient totalement ou partiellement éliminés. L'antigène circulant CAA est le premier signe de l'action du traitement sur les vers sans pour autant prévaloir de la survie ou non des parasites. Dans le cas rapporté dans notre étude, concernant la schistosomiase humaine à *S. haematobium*, la chute puis la remontée du taux d'antigènes circulants CCA, 12 semaines après traitement, en même temps que réapparaissent les premiers oeufs, semblent indiquer que l'antigène CCA peut servir de marqueur d'efficacité du traitement et de suivi de l'évolution de la maladie.

Dans les traitements, par la DEC de sujets filariens amicrofilarémiques et par le filaricide CGP 20 376 dans des infestations expérimentales par *B. pahangi*, la chute significative d'antigènes filariens circulants et urinaires après traitement atteste d'une action

des molécules sur les vers adultes et les microfilaires soit par réduction de leur nombre, soit par diminution de leur activité métabolique qui entraîne une chute de la libération de molécules circulantes. Une diminution des complexes immuns spécifiques, détectables après traitement par la DEC, est associée à la chute des taux d'antigènes circulants et urinaires. Les complexes immuns spécifiques et les antigènes filariens constituent des marqueurs d'efficacité du traitement de la filariose et ont été également rapportés comme tel dans la schistosomiase (Jassim *et al.*, 1986; Feldmeier *et al.*, 1988). En cas de réinfection, il est vraisemblable que l'un ou les deux facteurs réapparaissent dans la circulation. La présence de l'épitope, reconnu chez tous les stades de *B. malayi*, permet d'envisager son utilisation pour l'étude du traitement par des molécules macrofilaricides dans les stades chroniques amicrofilarémiques des filarioses lymphatiques. Il reste néanmoins à vérifier si l'anticorps AA3-44, comme Gib 13 (IgM monoclonale anti-*O. volvulus*), un autre anticorps anti-PC, détecte des taux d'antigènes filariens qui sont en corrélation positive avec la charge parasitaire (Wenger *et al.*, 1988).

Le traitement par la DEC a, par ailleurs, permis de suspecter la présence de filaires chez des sujets, résidant en zone d'endémie filarienne, qui sont négatifs en recherche d'anticorps spécifiques mais qui présentent des antigènes filariens circulants et urinaires, des complexes immuns spécifiques et des taux sériques élevés d'hormones ecdystéroïdes; tous ces paramètres chutant après traitement. Une réponse définitive ne pourra être apportée que s'il est possible de visualiser la présence de filaires dans les tissus profonds par scanner.

C. Les antigènes circulants dans l'évaluation de la charge parasitaire.

Dans les infestations bilharziennes chroniques de l'homme, nous observons des corrélations positives d'importance variable entre les taux d'antigènes bilharziens et le comptage des oeufs (un indicateur indirect de la charge parasitaire).

Dans les schistosomiasis expérimentales à *S. mansoni* et *S. japonicum*, il a été montré que le taux d'antigènes circulants est en corrélation positive avec la charge parasitaire (Gold *et al.*, 1969; Quian & Deelder, 1983). La concentration d'antigènes circulants et urinaires n'est pourtant pas forcément l'indicateur de la densité de vers présents. Chez la souris, entre le début de la ponte (6 semaines post-infestation) et 12

semaines après infestation une augmentation d'oeufs morts est notée indiquant le vieillissement des vers, et une diminution du taux d'antigènes circulants anodiques (CAA) est observée en parallèle (Shaker *et al.*, soumis). Les antigènes associés aux intestins peuvent être libérés en plus grand nombre par des jeunes vers au métabolisme important. Le taux de CAA reflète donc la charge parasitaire mais aussi le métabolisme des vers. Aussi dans les zones de forte endémie où la réinfection est fréquente (Soudan, Kenya) des taux plus forts d'antigènes CCA sont détectés par rapport aux zones où la transmission a été interrompue et où la réinfection est quasi nulle (Brésil) (Feldmeier *et al.*, 1986).

Il n'est donc pas établi si l'antigénémie ou l'antigénurie peuvent servir d'indicateur de la charge parasitaire dans les infections chroniques.

D. Les complexes immuns circulants dans la filariose lymphatique.

La présence d'isotypes variables d'immunoglobulines fixées aux antigènes circulants en fonction du statut clinique des patients, peut être en rapport direct avec les mécanismes d'immunopathologie. Dans notre étude, des IgG sont contenues dans des complexes immuns de patients filariens symptomatiques et se retrouvent aussi chez des sujets bilharziens souffrant d'une hépatosplénomégalie sévère (Jassim *et al.*, 1986).

La nature des antigènes circulants peut être la cause de cette différence d'isotypie. Des antigènes issus des CIC de patients filariens symptomatiques et utilisés dans un test de recherche d'anticorps spécifiques, détectent essentiellement des anticorps d'isotype IgM chez des sujets microfilarémiques et IgG chez des patients en phase chronique (Reddy *et al.*, 1986). On sait que chez l'homme, les antigènes polysaccharidiques induisent préférentiellement des anticorps de nature IgM. Aussi, les différences d'isotype d'anticorps retrouvées chez les sujets filariens, sont peut-être liées aux réponses du système immunitaire à différents épitopes présents sur les molécules circulantes.

E. Spécificité et sensibilité des tests 2S-IRMA.

Dans les tests immunoradiométriques, spécificité n'est pas toujours synonyme de sensibilité. La bonne spécificité du test 2S-IRMA, appliqué à la bilharziose, est entachée d'une sensibilité variable en fonction des échantillons analysés. On sait qu'il n'est pas évident que l'utilisation des anticorps monoclonaux présente plus d'avantages que les

anticorps polyclonaux. Si la spécificité de détection peut être améliorée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, la sensibilité par contre n'augmente pas nécessairement. Il est possible que l'utilisation d'un mélange de plusieurs anticorps monoclonaux réunisse les avantages d'une spécificité connue à ceux d'une meilleure reconnaissance de l'antigène. Une autre solution, pour remédier au manque de sensibilité, est d'utiliser un test de dosage par inhibition. Comme l'antigène CCA est essentiellement de nature glucidique, son marquage à l'¹²⁵iode ne sera pas forcément couronné de succès. Aussi, le remplacement de cet antigène par un anticorps anti-idiotypique de nature protéique est plus adapté au marquage et peut servir dans un test d'inhibition (Potocnjak *et al.*, 1982). La tentative de produire un tel anticorps monoclonal anti-idiotype vis-à-vis d'IgG3 n'a pas abouti.

L'épitope reconnu par l'anticorps AA3-44 est présent dans les antigènes somatiques de divers nématodes et reconnaît la phosphorylcholine (PC). Comme la PC semble absente des antigènes ES de *B. malayi*, les réactions croisées observées avec cet anticorps peuvent être causées par la polyspécificité de celui-ci. La polyspécificité peut être due à des identités partielles d'épitopes (PC, PC "like") ou des interactions indéterminées qui sont souvent observées chez des anticorps IgM possédant une faible affinité et une forte avidité en raison de leur multivalence. L'anticorps AA3-44 est une IgM anti-PC qui détecte des taux plus importants d'antigènes ES de *B. malayi* que des anticorps non anti-PC dirigés contre *O. volvulus* (IA2-23: Des Moutis *et al.*, 1983 et K1-143: Wandji *et al.*, 1988). La bonne sensibilité du test 2S-IRMA utilisant AA3-44 est peut-être due à la présence de nombreux épitopes PC "like", dans des molécules de poids moléculaires variés dans la circulation. Cette abondance d'épitopes pose la question de leur rôle immunologique *in vivo* : rôle immunosuppresseur et interaction avec la CRP (C-reactive-protéine).

Chez la souris, les antigènes polysaccharidiques induisent plus particulièrement des isotypes IgM et IgG3. L'anticorps monoclonal AA3-44 est une IgM dirigée contre la partie glucidique de l'antigène ES de *B. malayi* et l'anticorps monoclonal 40B1 dirigé contre l'antigène circulant cathodique de *S. mansoni* est d'isotype IgG3. Ce sont aussi les antigènes polysaccharidiques qui possèdent d'habitude des épitopes répétitifs; ils sont donc susceptibles d'être détectés dans un test 2S-IRMA. Dans la filariose, la production d'anticorps monoclonaux de spécificité restreinte nécessitera peut-être l'utilisation d'antigènes déglycosylés ou la sélection. Le seul anticorps dirigé contre *B. malayi*,

spécifique de stade et d'espèce, est une IgM dirigé contre un épitope peptidique de la larve L3 de *B. malayi* (Carlow *et al.*, 1987).

F. Intérêt des autres tests.

Si les tests de recherche d'antigènes circulants dans les helminthiases sont indiquées pour la détection des parasitoses actives en zone d'endémie, les tests de détection d'anticorps spécifiques sont utilisables chez des sujets, résidant habituellement en dehors des zones d'endémie, et qui sont à l'abris d'une infestation permanente, notamment dans le cas des filarioses. Les tests sérologiques de recherche d'anticorps s'appliquent difficilement au diagnostic des helminthiases, en raison de la complexité antigénique de ces parasites et des difficultés rencontrées lors des tentatives d'isolement de fractions antigéniques spécifiques, la production de protéines recombinantes, par des techniques de biologie moléculaire, correspondant à des anticorps représentatifs de la maladie humaine, représente une voie intéressante pour améliorer la spécificité et la sensibilité des tests immunologiques de diagnostic de certaines parasitoses. Dans la schistosomiase à *S. mansoni* (Newport *et al.*, 1988) et dans le cas de *B. malayi* (Arasu *et al.*, 1986) des antigènes recombinants des formes adultes ont été exprimés chez *E. coli*, mais aucune de ces protéines n'a encore été produite à large échelle pour des applications diagnostiques. Mieux encore, la synthèse peptidique peut être utilisée pour la fabrication d'épitopes antigéniques de protéines s'avérant intéressantes pour le diagnostic, comme cela a été réalisé dans le paludisme pour *Plasmodium falciparum* (Zavala *et al.*, 1986; Del Guidice *et al.*, 1987). L'identification d'épitopes induisant *in vivo* des anticorps neutralisants, facilitant ou ayant une activité immunosuppressive pourrait déboucher sur des tests ayant une valeur pronostique.

Les sondes nucléiques ont également trouvé leur application dans le domaine de la parasitologie. En matière de taxonomie et d'épidémiologie, des sondes DNA permettent d'identifier spécifiquement chez les moustiques vecteurs les larves infectieuses de la filaire *B. malayi* (Sim *et al.*, 1986). Dans le domaine du diagnostic direct de certaines maladies parasitaires à l'aide de sondes DNA des développements ont été réalisés pour les maladies à protozoaires. Ce type de test est envisageable pour le diagnostic parasitologique des filarioses par la recherche des microfilaries dans des prélèvements sanguins à l'aide de

sondes spécifiques d'espèce -comme il en existe déjà pour *B. malayi* et *B. pahangi* (Williams *et al.*, 1988), dans les cas de microfilarémies de faible intensité.

G. Conclusion.

Dans la schistosomiase et les filarioses humaines, si les tests de quantification des antigènes circulants/ urinaires peuvent s'appliquer:

- au diagnostic des affections aiguës,
- au diagnostic des affections chroniques en absence de paramètre parasitologique,
- à l'évaluation du traitement anti-parasitaire,

leur intérêt dans la mise en évidence d'infestations prépatentes ou d'une réexposition récente à des larves infestantes, ainsi que dans l'évaluation de la charge parasitaire, reste à être confirmé.

Des tests complémentaires seraient intéressants en clinique, dans la recherche des syndromes d'origine parasitaire possible (arthrite, myocardopathies dans les filarioses). Et, en épidémiologie, l'intérêt de ces tests réside dans la distinction entre les états de résistance et l'évaluation des mesures de lutte, de plus, il serait bon de disposer de méthodes fiables pour identifier les filaires parasitant l'homme et les animaux qui sont présents chez des vecteurs ou des hôtes réservoirs.

Des tests de détection d'antigènes circulants/urinaires parasites, de recherche de molécules génomiques utilisant les sondes nucléiques et de dosage d'anticorps anti-parasitaires, chaque type de recherche s'applique à une situation donnée, mais sont tous les trois complémentaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel-Hafez S.K., Phillips S.M. & D.M. Zodda, 1984. *Schistosoma mansoni*: detection and characterization of schistosome derived antigens by inhibition enzyme-linked immunosorbent assay (IELISA) utilizing monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* **70**: 105-117.
- Aceti A., Pennica A., Celestino D., Paparo S., Caferro M., Sanguigni S., Marangi M. & A. Sebastiani, 1988. A new serological technique, time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA), for the immunological diagnosis of urinary schistosomiasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **82**: 445-447.
- Adler S. & A.E. Gunders, 1964. Secretion of antigen in cultures of leptomonads and hamster spleen infected with *Leishmania*. *J. Protozool.* **11**: 42.
- Aggarwal A., Cuna W., Haque A., Dissous C. & A. Capron, 1985. Resistance against *Brugia malayi* microfilariae by a monoclonal antibody which promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). *Immunology* **54**: 655-663.
- Ali-Khan Z., Jothy S. & R. Siboo, 1982. Amyloidosis in experimental murine alveolar hydatidosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 169-171.
- Ambroise-Thomas P., 1974. Immunological diagnosis of human filariasis: present possibilities, difficulties and limitations (a review). *Act. Trop.* **31**: 108.
- Ambroise-Thomas P. & F. Kien Truong, 1974. Application of the indirect fluorescent antibody test on sections of adult filariae to the serodiagnosis, epidemiology and post-therapeutic surveillance of human filariasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **68**: 435-452.
- Ambroise-Thomas P., 1975. Etude critique des procédés diagnostiques, parasitologiques et immunologiques des filarioses humaines. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **55**: 497-504.
- Ambroise-Thomas P., Daveau C. & P. Desgeorges, 1980. Séro-diagnostic de l'onchocercose par micro-ELISA. Etude de 450 sérums et comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. *Bull. Soc. Path. Exot.* **73**: 430-442.
- Anders R.D., Brown G.V. & A. Edwards, 1983. Characterization of an S antigen synthesized by several isolates of *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 6652-6656.
- Andrade Z.A. & M. Sadigursky, 1978. Immunofluorescence studies of schistosome structures which share determinants with circulating schistosome antigens. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 316-318.
- Antes U., Heinz H.P. & M. Loos, 1987. Detection of C1q-bearing immune complexes by a monoclonal anti-C1q ELISA system. *J. Immunol. Methods.* **102**: 149.
- Arasu P., Carlow C., Philipp M. & F. Perler, 1986. Molecular cloning and characterization of antigens detected by antisera against the infective larvae of the human filarial nematode, *Brugia malayi*. *J. Cell. Biochem.* **10A** suppl: 143.
- Araujo F.G., Handman E. & J.S. Remington, 1980. Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immun.* **30**: 12-16.
- Araujo F.G., E. Chiari & J.C.P. Dias, 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet* **i**: 246-249.

- Araujo F.G., 1982. Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **76**: 25-36.
- Asai T., Kim T., Kobayashi M. & S. Kojima, 1987. Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**: 1332-1335.
- Au A.C., Denham D.A., Steward M.W., Draper C.C., Ismail M.M., Rao C.K. & J.W. Mak, 1981. Detection of circulating antigens and immune complexes in feline and human lymphatic filariasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **12**:492-498.
- Au A.C., Denham D.A. & C.C. Draper, 1982. Detection of antibodies in *Brugia pahangi*-infected cats by counterimmunoelectrophoresis, indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Z. Parasit.* **68**: 313-320.
- Auriault C., Joseph M., Dessaint J.P. & A. Capron, 1980. Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by schistosomula larvae proteases. *Immunol. Letters* **2**: 135-139.
- Auriault C., Ouaisi M.A., Torpier G., Eisen H. & A. Capron, 1981a. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* **3**: 33-44.
- Auriault C., Pestel J., Joseph M., Dessaint J.P. & A. Capron, 1981b. Interaction between macrophage and *Schistosoma mansoni* schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of B-glucuronidase release and cytotoxicity against schistosomula. *Cell. Immunol.* **62**: 15-27.
- Auriault C., Capron M. & A. Capron, 1982. Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Cell. Immunol.* **66**: 59-69.
- Auriault C., Dessaint J.P., Mazingue C., Loyens A. & A. Capron, 1984. Nonspecific potentiation of T and B lymphocyte proliferation at the early stage of infection by *Schistosoma mansoni*: role of factors secreted by the larvae. *Parasite Immunol.* **6**: 119-129.
- Badley J.E., Grieve R.B., Rockey J.H. & L.T. Glickman, 1987. Immune-mediated adherence of eosinophils to *Toxocara canis* infective larvae: the role of excretory-secretory antigens. *Parasite Immunol.* **9**: 133-143.
- Baldo B.A., Krilis S. & T.C. Fletcher, 1979. Phosphorylcholine-containing allergens. *Naturwissenschaften* **66**: 623-625.
- Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvalho D., Lecocq J.P. & A. Capron, 1987. Molecular cloning of a protective antigen against schistosomiasis. *Nature*, **326**: 149-153.
- Becquet R., 1974. Diagnostic parasitologique des bilharzioses intestinales. In *Diagnosis of Parasitic Diseases*, pp. 57-64. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp, 6-8 December 1974.
- Bekhti A., Schaaps J.P., Capron M., Dessaint J.P., Santoro F. & A. Capron, 1977. Treatment of hepatic hydatid disease with mebendazole. Preliminary results in four cases. *Br. Med. J.* **2**: 1047-1051.
- Bell D.R., 1974. Diagnosis of parasitic diseases by filtration. In *Diagnosis of Parasitic Diseases*, pp.111-118. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp, 6-8 December 1974.

- Berggren W.L. & T.H. Weller, 1967. Immuno-electrophoretic demonstration of a specific circulating antigen in animals infected with *Schistosoma mansoni*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. **16**: 606-612.
- Biguet J., D'Haussy R., Capron A., Tran Van Ky P. & M. Aubry, 1962a. Les antigènes de *Onchocerca volvulus*. I.- Etudes immunoélectrophorétique préliminaire.
Bull. Soc. Path. Exot. **55**: 845-855.
- Biguet J., Capron A. & P. Tran Van Ky, 1962b. Les antigènes de *Schistosoma mansoni*. I. Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques. *Ann. Inst. Past.* **103**: 763.
- Boscato L.M., Egan G.M. & M.C. Stuart, 1989. Specificity of two-site immunoassays.
J. Immunol Methods **117**: 221-229.
- Boros D.C. & K.S. Warren, 1970. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.* **132**: 488-507.
- Bout D., Carlier Y., Dessaint J.P. & A. Capron, 1977a. Characterization and purification of *S. mansoni* antigens. Les colloques de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Immunity in parasitic diseases. INSERM **72**: 71-86.
- Bout D., Santora F., Carlier Y., Bina J.C. & A. Capron, 1977b. Circulating immune complexes in schistosomiasis. *Immunology* **33**: 17-22.
- Bowman D.D., Mika-Grieve M. & R.B. Grieve, 1987. Circulating excretory-secretory antigen levels and specific antibody responses in mice infected with *Toxocara canis*.
Am. J. Trop. Med. Hyg. **36**: 75-82.
- Brunner C., Hendrix C., Blagburn B. & L. Hanrahan, 1988. Comparison of serologic tests for detection of antigen in canine heartworm infections. *JAVMA* **192**: 1423-1427.
- Burger C.J., Rikihisa Y. & Y.C. Lin, 1986. *Taenia taeniaeformis* inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin 2 production in rat splenocytes by larval *in-vitro* products. *Exp. Parasitol.* **62**: 216-222.
- Butterworth A.E., Remold H.G., Houba V., David J.R., Franks D., David P.H. & R.F. Sturrock, 1977. Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* **118**: 2230-2236.
- Butterworth A.E., Capron M., Cordingley J.S., Dalton P.R., Dunne D.W., Kariuki H.C., Kimani G., Koech D., Mugambi M., Ouma J.H., Prentice M.A., Richardson B.A., Arap Siongok T.K., Sturrock R.F. & D.W. Taylor, 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **79**: 393-408.
- Butterworth A.E., Bensted-Smith R., Capron A., Capron M., Dalton P.R., Dunne D.W., Grzych J.M., Kariuki H.C., Khalife J., Koech D., Mugambi M., Ouma J.H., Arap-Siongok T.K. & R.F. Sturrock, 1987. Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children.
Parasitology **94**: 281-300.
- Butterworth A.E., Dunne D., Fulford A., Capron M., Capron A., Koech D., Ouma J.H. & R. Sturrock, 1988. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity.
Biochimie, in press.

- Camus D., Nosseir A., Mazingue C. & A. Capron, 1981. Immunoregulation by *Schistosoma mansoni*. *Immunopharmacology* 3: 193-204.
- Candolfi E., Derouin F. & T. Kien, 1987. Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6: 44-48.
- Canlas M.M. & W.F. Piessens, 1984. Stage-specific and common antigens of *Brugia malayi* identified with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132: 3138-3141.
- Capron A., Vernes A., Biguet J., Rosé F., Clay A. & L. Denis, 1966. Les précipitines sériques dans les bilharzioses humaines et expérimentales à *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium* et *S. japonicum*. *Ann. Parasitol.* 41: 123-186.
- Capron A., Vernes A., Biguet J. & P. Tran Van Ky, 1967. Apport de l'immunoélectrophorèse à l'étude immunologique des bilharzioses (essai de synthèse). *Ann. Soc. belge Méd. Trop.* 47: 127-142.
- Capron A., Gentilini M. & A. Vernes, 1968a. Le diagnostic immunologique des Filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse. *Pathol. Biol.* 16: 1039-1045.
- Capron A., Biguet J., Vernes A. & D. Afchain, 1968b. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path.-Biol.* 16: 121-138.
- Capron A., Wattré P., Capron M. & M.N. Lefebvre, 1972a. Le diagnostic biologique moderne des parasitoses humaines. *Rev. Prat.* 22: 3661-3674.
- Capron A., Bout D. & J.C. Dugimont, 1972b. Apport des méthodes immunoenzymologiques utilisant des antigènes purifiés au diagnostic spécifique et automatisé des infections parasitaires. In *Diagnosis of Parasitic Diseases*, p. 65-76. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp, 6-8 December 1974.
- Capron A., Capron M. & J.P. Dessaint, 1980. ADCC as primary mechanisms of defense against metazoan parasites. In *Immunology 80, Progress in Immunology*. IV International Congress of Immunology, M. Fougereau and J. Dausset, Eds. Academic Press, New-York, pp. 782-793.
- Capron A., Dessaint J.P. & J. Pestel, 1982. Complexes immuns et activation des cellules effectrices. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 133: 229-238.
- Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Ouma J.H. & A.E. Butterworth, 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science* 238: 1065-1072.
- Capron A. & J.P. Dessaint, 1988. Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur/ Immunol.* 139: 109-117.
- Capron M., Torpier G. & A. Capron, 1979. *In vitro* killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. *J. Immunol.* 123: 2220-2230.
- Capron M., Carlier Y., Nzeyimana H., Minoprio P., Santoro F., Sellin B. & A. Capron, 1980. *In vitro* study of immunological events in human and experimental schistosomiasis: relationship between cytotoxic antibodies and circulating schistosoma antigens. *Parasit. Immunol.* 2: 223-235.

- Capron M., Spiegelberg H.L., Prin L., Bennich H., Butterworth A.E., Pierce R.J., Ouaiissi M.A. & A. Capron, 1984. Role of IgE receptors in effector function of human eosinophils. *J. Immunol.* **132**: 462-468.
- Carlier Y., 1975. Les antigènes circulants dans la schistosomiase. Mise en évidence d'un antigène parasite dans les urines de patients infestés par *Schistosoma mansoni*. Thèse médecine, Lille, p. 206.
- Carlier Y., Bout D. & A. Capron, 1978. Further studies on the circulating "M" antigen in human and experimental *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* **129 c**: 811-818.
- Carlier Y., 1980a. Detection of *Schistosoma mansoni* "M" antigen in circulating immune-complexes and in kidneys of infected hamsters. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74** : 534-538.
- Carlier Y., Bout D., Strecker G., Debray H. & A. Capron, 1980b. Purification, immunochemical and biological characterization of the *Schistosoma* circulating "M" antigen. *J. Immunol.* **124** : 2442-2450.
- Carlier Y., Nzeyimana H., Bout D. & A. Capron, 1980c. Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni* infected parturients and their newborn children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 74-81.
- Casali P., Bossus A., Carpentier N.A. & P.H. Lambert, 1977. Solid-phase enzyme immunoassay or radioimmunoassay for the detection of immune complexes based on their recognition by conglutinin. Conglutinin binding test. *Clin. Exp. Immunol.* **29**: 342.
- Casoni T., 1911. La diagnosi biologica de l'echinococcosi umana mediante l'intradermoreazione. *Fol. Clin. Chem. Microbiol.* **4**: 5.
- Caulfield J.P., Korman G. & J.C. Samuelson, 1982. Human neutrophils endocytose multivalent ligands from the surface of schistosomula of *Schistosoma mansoni* before membrane fusion. *J. Cell Biol.* **94**: 370-378.
- Cesbron J.Y., Capron A., Vargaftig B.B., Lagarde M., Pincemail J., Braquet P., Taelman H. & M. Joseph, 1987. Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature*, **325**: 533-536.
- Chapman C.B. & G.F. Mitchell, 1982. Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Veterinar. Parasitol.* **11**: 165-178.
- Chensue S.W., Boros D.L. & C.S. David, 1983. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. II. T-suppressor cell-derived, I-C subregion-coded soluble suppressor factor mediates regulation of lymphokine production. *J. Exp. Med.* **157**: 219.
- Chularerk P. & R.S. Desowitz, 1970. A simplified membrane technique for the diagnosis of microfilaraemia. *J. Parasit.* **56**: 623-624.
- Ciferri F., Kestel J.F., Lewis W.P. & S. Rieber, 1965. Immunological studies in onchocerciasis and Bancroftian filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **14**: 263-268.
- Corral R., Freilij H., Montemayor A. & S. Grinstein, 1984. *Trypanosoma cruzi* antigens in urine from patients with Chagas'disease. *IRCS (Int. Res. Commun. Syst.) Med. Sci.* **12**: 1034-1035.

- Craig P.S., 1984. Circulating antigens, antibodies and immune complexes in experimental *Taenia pisiformis* infections of rabbits. *Parasitology* **89**: 121-131.
- Craig P.S., 1986. Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme-immunoassay. *Parasite Immunol.* **8**: 171-188.
- Crandall C.A. & R.B. Crandall, 1971. *Ascaris suum* : immunoglobulin responses in mice. *Exp. Parasitol.* **30**: 426.
- Creighton W.D., P.H. Lambert & P.A. Miescher, 1973. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.* **111**: 1219-1227.
- Dammoneville M., Auriault C., Thorel T., Verwaerde C., Pierce A., Strecker G. & A. Capron, 1986. Induction of a protective immune IgE response in rats by injection of defined antigens of schistosomulum-released products: immunochemical properties of the target antigens. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **79**: 320-328.
- Dammoneville M., Velge F., Verwaerde C., Pestel J., Auriault C. & A. Capron, 1987. Generation and functional analysis of T cell lines and clones specific for schistosomula released products (SRP-A). *Clin. Exp. Immunol.* **69**: 299-307.
- Dasgupta A., Bala S. & S.N. Dutta, 1984. Lymphatic filariasis in man: demonstration of circulating antigens in *Wuchereria bancrofti* infection. *Parasite Immunol.* **6**: 341-348.
- Dasgupta A., Shukal B. & S.N. Dutta, 1987. Cellular unresponsiveness in patients with soluble circulating antigens in Bancroftian filariasis. *Indian J. Med. Res.* **85**: 136-139.
- Das M.K., Subramanyam V.P., Ravindran B. & N.M. Pattnaik, 1987. A study of the antigen, antibody and immunocomplex levels in *Wuchereria bancrofti* filariasis with reference to clinical status. *J. Trop. Med. Hyg.* **90**: 135-141.
- Daveau C. & P. Ambroise-Thomas, 1982. Séro-diagnostic de l'onchocercose par micro-ELISA face à des antigènes homologues somatiques et métaboliques (excrétés-sécrétés). Comparaison à l'immunofluorescence indirecte. *Méd. Trop.* **42**: 513-519.
- Davies A.M. & M. Eliakim, 1954. The value of different antigens in the diagnosis of chronic bilharziasis by the skin and complement fixation tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 728.
- De Jonge N., Schommer G., Frijger F.W., Feldmeier H., Zwingenberger K., Steiner A., Bienzle U. & A.M. Deelder, 1989. Presence of circulating anodic antigen in serum of *Schistosoma intercalatum* -infected patients from Gabon. *Act. Trop.* **46**: 115-120.
- De Savigny D.H., 1975. *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 larval migrans. *J. Parasit.* **61**: 781-782.
- Del Guidice G., Engers H.D., Tougne C., Biro S.S., Weiss N., Verdini A.S., Pessi A., Degremont A.A., Freyvogel T.A., Lambert P.H. & M. Tanner, 1987. Antibodies to the repetitive epitope of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in a rural Tanzanian community: a longitudinal study of 132 children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**: 203-212.
- Deelder A.M., Klappe H.T., Van den Aardweg G.J. & E.H. Van Meerbeke, 1976. *Schistosoma mansoni* : demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. *Exp. Parasitol.* **40**: 189-197.

- Deelder A.M. & P.C. Eveleigh, 1978. An indirect haemagglutination reaction for the demonstration of *Schistosoma mansoni* circulating anodic antigen. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **72**: 178-180.
- Deelder A.M., Van Dalen D.P. & J.C. Van Egmond, 1978. *Schistosoma mansoni*: microfluorometric determination of circulating anodic antigen and antigen-antibody complexes in infected hamster serum. *Exp. Parasitol.* **44**: 216-224.
- Deelder A.M., Kornelis D., Van Marck E.A., Eveleigh P.C. & J.G. Van Egmond, 1980. *Schistosoma mansoni* : characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamsters and human infections. *Exp. Parasitol.* **50**: 16-32.
- Deelder A.M. & W. Van Den Berge, 1981. Detection of antibodies against circulating cathodic antigen of *Schistosoma mansoni* using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Parasit. Res.* **64**: 179-186.
- Deelder A.M., El-Dosoky I., Van Marck E.A. & Z.I. Qian, 1985. Immunofluorescent localization of *Schistosoma mansoni* circulating cathodic antigen in tissues of infected mice using monoclonal antibody. *Parasitol. Res.* **71**: 317-323.
- Delplace P., Dubremetz J.F., Fortier B. & A. Vernes, 1985. A 50 kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum* . *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**: 239-251.
- Delplace P., Fortier B., Tronchin G., Dubremetz J.F. & A. Vernes, 1987. Localization, biosynthesis, processing and isolation of a major 126 kDa antigen of the parasitophorous vacuole of *Plasmodium falciparum* . *Mol. Biochem. Parasitol.* **23**: 193-201.
- Denis R.D.W., 1977. On ecdysone binding proteins and ecdysone-like material in nematodes. *In. J. Parasitol.* **7**: 181-188.
- Des Moutis I., Ouaisi A., Grzych J.M., Yarzabal L., Haque A. & A. Capron , 1983. *Onchocerca volvulus* : detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 533-542.
- Dessaint J.P., Bout D., Wattre P. & A. Capron, 1975a. Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in patients with hydatid disease. *Immunology* **29**: 813-823.
- Dessaint J.P., Capron M., Bout D. & A. Capron, 1975b. Quantitative determination of specific IgE antibodies to schistosome antigens and serum IgE levels in patients with schistosomiasis (*S. mansoni* or *S. haematobium*). *Clin. Exp. Immunol.* **20**: 427-436 .
- Dessaint J.P., Camus D., Fischer E. & A. Capron, 1977. Inhibition of lymphocyte proliferation by factors produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* **7**: 219-225.
- Dessaint J.P. & A. Capron, 1980. Immunoglobuline E, hypersensibilité immédiate et immunité au cours des parasitoses. *Med. et Hyg.* **38**: 98-104.
- Dissanayake S. & M.M. Ismail, 1980a. Antigens of *Seratia digitana* : cross-reaction with surface antigens of *Wucheraria bancrofti* -infected subjects. *Bull. W.H.O.* **58**: 649.
- Dissanayake S., De Silva L.V. & M.M. Ismail, 1980b. IgM antibodies to filarial antibodies in human cord blood: possibility of transplacental infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **74**: 541-544.

- Dissanayake S., Galahitiyawa S.C. & M.M. Ismail, 1982. Immune complexes in *Wuchereria bancrofti* infection in man. *Bull. W.H.O.* **60**: 919-927.
- Dissanayake S., Galahitiyawa S.C. & M.M. Ismail, 1983. Further characterization of filarial antigens by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. W.H.O.* **61**: 725-730.
- Dissanayake S., Forsyth K.P., Ismail M.M. & G.F. Mitchell, 1984. Detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis by using a monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33** : 1130-1140.
- Dissous C. & A. Capron, 1983. *Schistosoma mansoni* : antigenic community between schistosomula surface and adult worm incubation products as a support for concomitant immunity. *FEBS letters* **162**: 355-359.
- Dondero T.J., Mullin S.W. & S. Balasingam, 1972. Early clinical manifestations in filariasis due to *Brugia malayi* : observations on experimental infections in man. *South-East Asian J. Trop. Med. Public Health* **3**: 569-575.
- Dondero T.J., Bhattacharya N.C., Black H.R., Chowdhury A.B., Gubler D.J., Inui T.S., & M. Mukerjee, 1976. Clinical manifestations of Bancroftian filariasis in a suburb of Calcutta, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **25**: 64-73.
- Dos Santos L.G., Santos D.S. & R. Azevedo, 1976. Diagnosis of *Wuchereria bancrofti* filariasis by immunofluorescence using microfilariae as antigen. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **70**: 219-225.
- Duffus W.P. & D. Franks, 1980. *In vitro* effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. Exp. Immunol.* **41**: 430-440.
- Dunne D.W., Bickle Q.D., Butterworth A.E. & B.A. Richardson, 1987. The blocking antibody-dependent, eosinophil-mediated killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by monoclonal antibodies which cross-react with a polysaccharide-containing egg antigen. *Parasitology* **94**: 269-280.
- Dunne D.W., Grabowska A.M., Fulford A.J., Butterworth A.E., Sturrock R.F., Koech D. & J.H. Ouma, 1988. Human antibody responses to *Schistosoma mansoni* : the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. *Eur. J. Immunol.* **18**: 123-131.
- Edge A.S., Faltynek C.R., Hof L., Reichert L.E. & P. Weber, 1981. Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Analyt. Biochem.* **118**: 131-137.
- Edwards A.J., Burt J.S. & B.M. Olgivie, 1971. The effect of immunity upon some enzymes of the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology* **62**: 339-347.
- Egwang T.G. & J.W. Kazura, 1987. Immunochemical characterization and biosynthesis of major antigens of iodo-bead surface-labelled *Brugia malayi* microfilariae. *Mol. Biochem. Parasitol.* **22**: 159-168.
- El-Dosoky I., Van Marck E.A. & A.M. Deelder, 1984. Presence of *Schistosoma mansoni* antigens in liver, spleen and kidney of infected mice: a sequential study. *Parasitol. Res.* **70**: 491-497.
- Engwall E. & P. Perlman, 1972: Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. *J. Immunol.* **109**: 129.

- Feldmeier H., Gastl G.A., Poggensee U., Kortmann C., Dafalla A.A. & H.H. Peter, 1985a. Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. I. Lymphocyte subpopulations and specific antibody responses. *Clin. Exp. Immunol.* **60**: 225-233.
- Feldmeier H., Gastl G.A., Poggensee U., Kortmann C., Dafalla A.A. & H.H. Peter, 1985b. Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. II. NK cell activity and *in vitro* lymphocyte proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **60**: 234-240.
- Feldmeier H., Nogueira-Queiroz J. A., Peixoto-Queiroz M.A., Doehring E., Dessaint J.P., De Alencar J.E., Daffalla A.A. & Capron A. , 1986. Detection and quantification of circulating antigen in schistosomiasis by monoclonal antibody. II. The quantification of circulating antigens in human schistosomiasis mansoni and haematobium: relationship to intensity of infection and disease status. *Clin. Exp. Immunol.* **65**: 232-243.
- Feldmeier H., Gastl G.A., Poggensee U., Dafalla A.A., Nogueira-Queiroz J. A., Capron A. & H.H. Peter, 1988. Immune response in chronic schistosomiasis haematobium and mansoni. Reversibility of alterations after anti-parasite treatment with praziquantel. *Scand. J. Immunol.* **28**: 147-155.
- Forsyth K.P., Copeman D.B., Anders R.F. & G.F. Mitchell, 1981. The major radiolabeled cuticular antigens of *Onchocerca gibsoni* microfilariae are neither species nor onchocerca specific. *Act. Trop.* **38**, 343-352.
- Forsyth K.P., Mitchell G.F. & D.B. Copeman, 1984. *Onchocerca gibsoni* : increase of circulating egg antigen with chemotherapy in bovines. *Exp. Parasitol.* **58**: 41-55.
- Forsyth K.P., Spark R., Kazura J., Brown G.V., Peters P., Heywood P., Dissanaiké, S. & G.F. Mitchell, 1985. A monoclonal antibody-based immunoradiometric assay for detection of circulating antigen in Bancroftian filariasis. *J. Immunol.* **134** : 1172-1177.
- Franks M B., 1947. Specific soluble antigen in the blood of filarial patients. *J. Parasit.* **32**: 400-406.
- Freilij H.L., Corral R.S., Katzin A.M. & S. Grinstein, 1987. Antigenuria in infants with acute congenital Chagas'disease. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 133-137.
- Fujino T., M. Hirata, Ishii Y. & H. Tsutsumi, 1985. Immunocytochemical localization of gut-associated circulating anodic antigen in *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Res.* **71**: 739-746.
- Fujita K., Tanaka M., Sasa M., Schichinohe K., Asai Y. & K. Kurokawa, 1970. Cross-reactions among filarial species in hemagglutination. *Jpn. J. Exp. Med.* **40**: 667.
- Galvo-Castro B., Bina J.C., Prata A. & P.H. Lambert, 1981. Correlation of circulating immune complexes and complement breakdown products with the severity of the disease in human schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**:1238-1246.
- Gentilini M., Pinon J.M. & G. Niel, 1972. Immunoélectrodiffusion sur membrane d'acétate de cellulose. Applications diagnostiques en parasitologie. *Bull. Soc. Path. Exot.* **65**: 60-65.
- Gidel R., Brengues J. & F. Rodhain, 1969. Essais de deux tests immunologiques (intradermoréaction et réaction de fixation du complément) pour le dépistage des filarioses dans des populations de Haute-Volta où coexistent *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus* et *Dipetalonema perstans*. *Bull. O.M.S.* **40**: 831-842.

- Gold R., Rosen F.S. & T.H. Weller, 1969. A specific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni*. Detection of antigens in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **18**: 545-552.
- Goodger B.V., 1973. *Babesia argentina*: Intraerythrocytic location of babesial antigen extracted from parasite suspensions. *Int. J. Parasitol.* **3**: 387-391.
- Goodger B. V., 1976. *Babesia argentina*: Studies on the nature of an antigen associated with infection. *Int. J. Parasitol.* **6**: 213-216.
- Gottstein B., 1984. An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 1185-1191.
- Grauer G.F., Culham C.A., Bowman D.D., Grieve M. & R.B. Grieve, 1988. Parasite excretory-secretory antigen and antibody to excretory-secretory antigen in body fluids and kidney tissue of *Dirofilaria immitis* infected dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 380-387.
- Grove D.I., Cabrera D.B., Valeza F.S., Guinto R.S., Ash L.R. & K.S. Warren, 1977. Sensitivity and specificity of skin reactivity to *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis* antigens in bancroftian and malayan filariasis in the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 220-229.
- Grzych J.M., Capron M., Dissous C. & A. Capron, 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **133**: 998-1004.
- Grzych J.M., Capron M., Lambert P.H., Dissous C., Torres S. & A. Capron, 1985. An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* **316**: 74-76.
- Grzych J.M., Dissous C. & A. Capron, 1987. *Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with freshwater keyhole limpet hemocyanin. *J. Exp. Med.* **165**: 865-878.
- Gualzata M., N. Weiss & C.H. Heusser, 1986. *Dipetalonema vitae*: phosphorylcholine and non-phosphorylcholine antigenic determinants in infective larvae and adult worms. *Exp. Immunol.* **61**: 95-102.
- Haber E., Donahoe P. & Ehrlich, 1981. Resolving antigenic sites and purifying proteins with monoclonal antibodies. In: R.E. Fellows & G.S. Eisenbarth (Eds.), *Monoclonal antibodies in endocrine research*. Raven Press, New York, p.1.
- Hagan P., Wilkins H.A., Blumenthal U.J., Hayes R.J. & B.M. Greenwood, 1985. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. *Parasit. Immun.* **7**: 625-632.
- Hamilton R.G., Hussain R. & E.A. Ottesen, 1984a. Immunoradiometric assay for detection filarial antigens in human serum. *J. Immunol.* **133**: 2237-42.
- Hamilton R.G., Hussain R., Alexander E. & N.F. Adkinson, 1984b. Limitations of the radioimmunoprecipitation polyethylene glycol assay (RIPEGA) for detection of filarial antigens in serum. *J. Immunol. Methods* **68**: 349.
- Hammerberg B. & J.F. Williams, 1978a. Interaction between *Taenia taeniaformis* and the complement system. *J. Immunol.* **120**: 1033-1038.
- Hammerberg B. & J.F. Williams, 1978b. Physicochemical characterization of complement interacting factors from *Taenia taeniaformis*. *J. Immunol.* **120**: 1039-10454.

- Hang L.M., Warren K.S. & D.L. Boros, 1974. *Schistosoma mansoni* : antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. *Exp. Parasitol.* **35**: 288-298.
- Hanna R.E., 1980. *Fasciola hepatica* : glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. *Exp. Parasitol.* **50**: 103-114.
- Haque A., Camus D., Ogilvie B.M., Capron M., Bazin H. & A. Capron, 1981. *Dipetalonema vitae* infective larvae reach reproductive maturity in rats immunodepressed by prior exposure to *Schistosoma mansoni* or its products and in congenitally athymic rats. *Clin. Exp. Immunol.* **43**: 1-9.
- Haque A. & A. Capron, 1982. Transplacental transfer of rodent microfilariae induces antigen-specific tolerance in rats. *Nature* **229**: 361-363.
- Haque A., Aggarwal A., Cuna W., Ovlaque G., Cesbron J.Y. & A. Capron, 1985. The use of monoclonal antibodies in studies of filarial parasite antigens. *Develop. Biol. Standard.* **59** : 63-68.
- Haque A. & A. Capron, 1986. Filariasis: antigens and host-parasite interactions. In *Parasite antigens. Toward new strategies for vaccines*, pp. 317-401,(T.W. Reardon, ed.). Marcel Dekker, New- York.
- Harnett W., Meghji M., Worms M.J. & R.M.E. Parkhouse, 1986. Quantitative and qualitative changes in production of excretions/secretions by *Litomosoides carinii* during development in the jird (*Meriones inguiculatus*). *Parasitology* **93**: 317-331.
- Himmi E.H., Auriault C., Pierce R., Joseph M., Tartar A. & A. Capron, 1985. Regulatory role of a peptide from the second constant domain of immunoglobulin G. II. *In vitro* effect on granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs. *Int. J. Immunopharmacol.* **7**: 231-238.
- Hommel M., 1977. New approaches in experimental leishmaniasis, PhD thesis, University of Liverpool.
- Horn D.H., Wilkie J.S. & J.A. Thomson, 1974. Isolation of ecdysone from parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*. *Experientia* **30**: 1109-1110.
- Hoshimo-Shimizu S., Brito T., Canto A.L., Kanamura H.Y. & L.C. Silva, 1975. Detection of schistosomal antigen (*S.mansoni*) in human kidneys obtained at autopsy. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **17**: 394.
- Houba V., Koech D.H., Sturrock R.F., Butterworth A.E., Kusel J.R. & A.A. Mahmoud, 1976. Soluble antigens and antibodies in sera from baboons infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **117**: 705-707.
- Hughes H.P.A., 1985. Toxoplasmosis: the need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment. *Microbiol. Immunol.* **120**:105-139.
- Huijun Z., Zhenghou T., Reddy M.V.R., Harinath B.C. & W.F. Piessens, 1987. Parasite antigens in sera and urine of patients with bancroftian and brugian filariasis detected by sandwich ELISA with monoclonal antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **36**: 554-560.
- Huntington R.W., Fogel R.H., Eichold A. & J.G. Dickinson, 1944. Filariasis among American troops in a South Pacific Island group. *Yale J. Biol. Med.* **16**: 529-537.
- Hussain R., Hamilton R.G., Kumaraswami V., Adkinson N.K. & E.A. Ottesen, 1981. IgE responses in human filariasis. I. Quantification of filaria-specific IgE. *J. Immunol.* **127**: 1623-1629.

- Hussain R. & E.A. Ottesen, 1985. IgE responses in human filariasis. III. Specificities of IgE and IgG antibodies compared by immunoblot analysis. *J. Immunol.* **135**: 1415-1420.
- Hussain R. & E.A. Ottesen, 1986. IgE responses in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition by IgE and IgG4 subclass antibodies. *J. Immunol.* **136**: 1859-1863.
- Ismail M.M., James C. & G. Webbe, 1981. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of circulating antigen and antibody in *Schistosoma haematobium* -infected baboons. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **75**: 542-548.
- Ito K., Sawada T. & S. Sato, 1972. Increased serum IgE level in individuals infected with *Schistosoma japonicum*, *Wuchereria bancrofti* or hookworm, and the changes treatment in schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.* **42**: 115.
- Jarrett E.E., 1972. Potentiation of reaginic (IgE) antibody to ovalbumin in the rat following sequential Trematode and Nematode infections. *Immunology* **22**:1099-1001.
- Joseph M., Capron A., Butterworth A.E., Sturrock R.F. & V. Houba, 1978. Cytotoxicity of human and baboon mononuclear phagocytes against schistosomula *in vitro*: induction by immune complexes containing IgE and *Schistosoma mansoni* antigens. *Clin. Exp. Immunol.* **33**:48-56.
- Joseph M., Auriault C., Capron A., Vorng H. & P. Viens, 1983. A new function for platelets: IgE dependent killing of schistosomes. *Nature* **303**: 810-812.
- Kagan I.G., 1963. A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. *J. Parasit.* **49**: 773-780.
- Kagan I.G., Norman L. & D.S. Allain, 1963. An evaluation of the Bentonite flocculation and indirect haemagglutination tests for the diagnosis of filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **12**: 548-553.
- Kagan I.G. & I. Norman, 1974. In *Manual of Clinical Microbiology*, (E.H. Bennett, E.H. Spaulding, and J.P. Tiaunt, eds). American Society for Microbiology, Washington, p.645.
- Khalife J., Capron M., Capron A., Grzych J.M., Butterworth A.E., Dunne D.W. & J.H. Ouma, 1986. Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* **164**: 1626-1640.
- Kaliraj P., Ghirnikar S.N. & B.C. Harinath, 1979. Detection of filarial antigen in Bancroftian filariasis. *Ind. J. Exp. Biol.* **17**: 1148-49.
- Katzin A.M., Marcipar A., Freilij H., Corral R. & J.F. Yanovsky, 1989. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic chagas disease by agglutination test. *Exp. Parasitol.* **68**: 208-215.
- Kaushal N.A., Hussain R., Nash T.E. & E.A. Ottesen, 1982. Identification and characterization of excretory-secretory products of *Brugia malayi*, adult filarial parasites. *J. Immunol.* **129**: 338-343.
- Kaushal N.A., Hussain R. & E.A. Ottesen 1984. Excretory-secretory and somatic antigens in the diagnosis of human filariasis. *Clin. Exp. Immunol.* **56**: 567-576.
- Kazura J.W. & Meshnick S.R., 1984. Scavenger enzymes and resistance to oxygen mediated damage in *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **10**: 1-10.

- Kelsoe G.H. & T.H. Weller, 1978. Immunodiagnosis of infection with *Schistosoma mansoni*: enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibody to circulating antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 5715-5717.
- Khalife J., Capron M., Capron A., Grzych J.M., Buterworth A.E., Dunne D.W. & J.H. Ouma, 1986. Immunity in schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. exp. Med.* **164**: 1626-1640.
- Kharat I., Harinath B.C. & S.N. Ghirnikar, 1982. Antibody analysis in human filarial sera by ELISA using *Wuchereria bancrofti* microfilariae culture antigens. *Ind. J. Exp. Biol.* **20**: 378-380.
- Klei T.R., Mc Call J.W. & Malone J.B., 1980. Evidence of increased susceptibility of *Brugia pahangi*-infected jirds to subsequent homologous infections. *J. Helminthol.* **54**:161-165.
- Kohanteb J., Ardehali S.M. & H.R. Rezai, 1987. Detection of *Leishmania donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**, 578-580.
- Kojima S., Yogogawa M. & T. Tada, 1972. Raised levels of serum IgE in human helminthiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **21**: 913.
- Koolman J., Walter J. & H. Zahner, 1984. Ecdysteroids in helminths. In *Biosynthesis, Metabolism and mode of action of Invertebrate Hormones* (J. Hoffman & M. Porchet Eds.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 323-330.
- Lal R.B., Paranjape R.S., Briles D.E., Nutman T.B. & E.A. Ottesen, 1987. Circulating parasite antigen(s) in lymphatic filariasis: use of monoclonal antibodies to phosphocholine for immunodiagnosis. *J. Immunol.* **138**: 3454-3460.
- Lal R.B. & E.A. Ottesen, 1988. Characterization of stage-specific antigens of infective larvae of the filarial parasite *Brugia malayi*. *J. Immunol.* **140**: 2032-2038.
- Lambert P.H., Morel P.A., Renversez J.C. & M. Goldman, 1983. Idiotypic interactions and immune complexes in infectious diseases. *Progress Immunol.* **5**: 1343-1346.
- Lammie P.J., Linette G.P. & S.M. Philipps, 1985. Characterization of *Schistosoma mansoni* antigen-reactive T cell clones that form granulomas *in vitro*. *J. Immunol.* **134**: 4170-4175.
- Lanar D., Pearce E.J., James S.L., et al., 1986. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* **234**: 593-596.
- Leikina E.S., Kovrova E.A. & N.N. Krasovskaya, 1982. Detection of circulating antigens in the bloodstream of patients with hydatid disease, alveococcosis and trichinosis. *Meditinskaya Parazitologiya in Parazitarnye Bolozni* **60**: 7-15.
- Lichtenberg F.V., Bawden M.P. & S.H. Shealey, 1974. Origin of circulating antigen from the schistosome gut. An immunofluorescent study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**: 1088-1091.
- Lie K.J., 1962. Occult filariasis: its relationship with tropical pulmonary eosinophilia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **11**: 646-652.

- Lighthowers M.W., Rickard M.D. & G.F. Mitchell, 1986. *Taenia taeniaeformis* in mice: passive transfer of protection with sera from infected or vaccinated mice and analysis of serum antibodies to oncospherical antigens. *Int. J. Parasitol.* **16**: 297-306.
- Lima M.S., Gazzinelli G., Nascimento E., Carvalho Parra J., Montesano M.A. & D.G. Colley, 1986. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. Evidence for anti-idiotypic T lymphocyte responsiveness. *J. Clin. Invest.* **78**: 983-988.
- Linder E., 1986. Identification of schistosomal eggs. Description of an immunological spot assay for hatch fluid antigen. *J. Immunol. Methods* **88**: 137-140.
- Liu M.K. & T.W. Pearson, 1987. Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. *Parasitology* **95**: 277-290.
- Luft B.J. & J.S. Remington, 1988. Toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **157**: 1-6.
- Lunde M.N., Paranjape R., Lawley T.S. & E.A. Ottesen, 1988. Filarial antigen in immune complexes from patients with *Wuchereria bancrofti* filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 366-371.
- Mackenzie C.D., Preston P.M. & B.M. Ogilvie, 1978. Immunological properties of the surface of parasitic nematodes. *Nature* **276**: 826-828.
- Mackey L.J., Mc Greror I.A., Paounova N. & P.H. Lambert, 1982. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infection in man: detection of parasite antigen by ELISA. *Bull. W.H.O.* **60**: 69-75
- Magalhaes-Filho A., Krupp I.M. & E.A. Malek, 1965. Localization of antigens and presence of antibody in tissues of mice infected with *Schistosoma mansoni* as indirect immunofluorescent antibody technique. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **14**: 84-99.
- Maizels R.M., Partono F., Oemijati S., Denham D.A. & B.M. Olgivie, 1983a. Cross-reactive surface antigens on three stages of *Brugia malayi*, *B. pahangi* and *B. timori*. *Parasitology* **87**: 249-263.
- Maizels R.M., Partono F., Oemijati S. & B.M. Olgivie, 1983b. Antigenic analysis of *Brugia timori*, a filarial nematode of man: initial characterization by surface radioiodination and evaluation of diagnostic potential. *Clin. Exp. Immunol.* **51**: 269-277.
- Maizels R.M., Sutanto I., Gomez-Priego A., Lillywhite J. & D.A. Denham, 1985a. Specificity of surface molecules of adult *Brugia* parasites: cross-reactivity with antibody from *Wuchereria*, *Onchocerca* and other human filarial infections. *Trop. Med. and Parasitol.* **36**: 233.
- Maizels R.M., Denham D.A. & I. Sutanto, 1985b. Secreted and circulating antigens of the filarial parasite *Brugia pahangi* analysis of *in vitro* released components and detection of parasite products *in vivo*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **17**: 277-288.
- Maizels R.M., Burke J. & D.A. Denham, 1987. Phosphorylcholine-bearing antigens in filarial nematode parasites: analysis of somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from *Brugia malayi* and *B. pahangi*. *Parasite Immunol.* **9**: 49-66.
- Marcipar A., Barnes S., Lentwojt E. & G. Brown, 1982. Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **7**: 459-462.
- Martin L. & P. Beawer, 1968. Evaluation of Kato thick-smear technique for quantitative diagnosis of helminth infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **17**: 382-391.

- Mazingue C., Camus D., Dessaint J.P., Capron M. & A. Capron, 1980. *In vitro* and *in vivo* inhibition of mast cell degranulation by a factor from *Schistosoma mansoni*. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **63**: 178-189.
- Mazingue C., Dessaint J.P., Schmitt-Verhulst A.M., Cerottini J.C. & A. Capron, 1983. Inhibition of cytotoxic T lymphocytes by a Schistosome-Derived Inhibitory Factor is independant of an inhibition of the production of interleukin 2. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **72**: 22-29.
- Mazingue C., Stadler B.M., Quatannens B., Capron A. & A de Weck, 1986. Schistosome-Derived Inhibitory Factor: an immunosuppressive agent preferentially active on T lymphocytes. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **80**: 347-354.
- Mazingue C., Walker C., Domzig W., A. Capron & A. de Weck, 1987. Effect of Schistosome-Derived Inhibitory Factor on the cell cycle of T lymphocytes. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **83**: 12-18.
- Mc Greevy P.B., Ratiwayanto S., Tuti S., Mc Greevy M. & D.T. Dennis, 1980. *Brugia malayi* : relationship between antisheath antibodies and amicrofilaremia in natives living in an endemic area of South Kalimantan, Borneo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 553-562.
- Mc Gregor I.A., Turner M.W., Williams K. & P. Hall, 1968. Soluble antigens in the blood of African patients with severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **i**: 881-884.
- Mitchell G.F. & H.M. Lewers, 1977. Studies on immune responses to parasite antigens in mice. IV. Inhibition of an anti-DNP antibody response with the antigen DNP-ficoll containing phosphorylcholine. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **52**: 235-240.
- Mitchell G.F., Hogarth-Scott R.S., Edwards R.D., Lewers H.H., Cousins M. & T. Moore, 1977a. Studies on immune responses to parasite antigens in mice. I. *Ascaris suum* larvae numbers and antiphosphorylcholine responses in infected mice of various strains and in hypothyimic nu/nu mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **52**: 64-78.
- Mitchell G.F., Goding J.W. & Rickard M.D., 1977b. Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyimic mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Australian J. Exp. Biol. Med. Sc.* **55**: 165-186.
- Mitchell G.F., Cruise K.M., Garcia E.G. & R.F. Anders, 1981. Hybridoma-derived antibody with immunodiagnostic potentiel for schistosomiasis japonica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3165-3169.
- Mitchell G.F., 1989. Gluthathione S-transferases-potential-components of anti-schistosoma vaccines? *Parasitology Today* **5**: 34-37.
- Morgan T.M., Sutanto I., Purnomo, Sukartono, Partono F. & R.M. Maizels, 1986. Antigenic characterization of adult *Wuchereria bancrofti* filarial nematodes. *Parasitology* **93**: 559-569.
- Mott K.E. & H. Dixon, 1982. Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bull. W.H.O.* **60**: 729-753.
- Musoke A.J. & J.F. Williams, 1975. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis* . V. Sequence of appearance of protective immunoglobulins and the mechanism of action of 7Sg 2a. *Immunology* **29**: 855-866.
- Nantulya V.M., 1989. An antigen detection immunoassay for the diagnosis of *rhodesiense* sleeping sickness. *Parasite Immunol.* **11**: 69-75.

- Nash T.E., 1974. Localization of the circulating antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **23**: 1085-1087.
- Nash T.E., Nasir-Ud-Din & R.W. Jeanloz, 1977. Further purification and characterization of a circulating antigen in schistosomiasis. *J. Immunol.* **119**: 1627-1633.
- Nash T.E., 1978. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. I. Sensitivity and specificity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 938-943.
- Nash T.E., Ottesen E.A. & A.W. Cheever, 1978. Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. II. Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**: 944-950.
- Nash T.E., Lunde M.N. & A.W. Cheever, 1981. Analysis and antigenic activity of a carbohydrate fraction derived from adult *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **126**: 805-810.
- Nash T.E., 1982. Factors that modulate clearance and ultimate fate of a specific schistosome antigen (GASP) in schistosome infections. *J. Immunol.* **128**: 1608-1613.
- Nash T.E., 1983. Fate and mechanism of clearance of PSAP, a schistosome antigen, in schistosomiasis. *J. Immunol.* **131**: 2520-2523.
- Nash T.E., Garcia-Coyco C., Ruiz-Tiben E., Nazario-Lopez H.A. Vasquez G. & A. Torres-Borges, 1983. Differentiation of acute and chronic schistosomiasis by antibody responses to specific schistosome antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 776-784.
- Nash T.E. & A.M. Deelder, 1985. Comparison of four schistosome excretory-secretory antigens: phenol sulfuric test active peak, cathodic circulating antigen, gut-associated proteoglycan and circulating anodic antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 236-241.
- Neva F.A., Keplan A.P., Pachico G., Gray L. & T.J. Damaraj, 1975. A human model of parasitic immunopathology with observations on serum IgE levels before and after treatment. *J. Allergy Clin. Immunol.* **55**: 422.
- Newport G.R., Hedstrom R. C., Kallestad J., Tarr P., Klebanoff S. & N. Agabian, 1988. Identification, molecular cloning and expression of a schistosome antigen displaying diagnostic potential. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 540-546.
- Ngu J.L., Neba G.A., Leke R., Titanji V., Asonganyi T. & P. Ndumbe, 1981. Selective recovery of living microfilariae from *Onchocerca volvulus* nodules. Determination of optimal conditions for their culture in vitro for excretory/secretory products. *Acta Trop.* **38**: 261-266.
- Niel G., Gentilini M., Couture J., Pinin J.M. & M. Danis, 1972. Application des extraits antigéniques d'*Ascaris suum* au diagnostic des filarioses en double diffusion. Valeur comparée à celle des antigènes *Onchocerca volvulus* et *Dipetalonema vitae*. *Bull. Soc. Path. Exot.* **4**: 569-580.
- Nirdé P., Torpier G., De Reggi M. & A. Capron, 1983. Ecdysone and 20-hydroxyecdysone: new hormones for the human parasite *Schistosoma mansoni*. *FEBS Letters* **151**: 223-227.
- Nirdé P., De Reggi M., Tsoupras G., Torpier G., Fressancourt P. & A. Capron, 1984. Excretion of ecdysteroids by schistosomes as a marker of parasite infection. *FEBS Letters* **168**: 235-240.
- Nirdé P., 1988. Les ecdystéroïdes parasitaires. Thèse, Université de Lille I, 206p.

- Nirdé P., Lutsch C., Cesbron J.Y. & A. Capron, 1989. Ecdysteroids in the biological fluids of vertebrates infected with *Brugia malayi*. Soumis.
- Nutman T.B., Ottesen E.A., Fauci A.S. & D.J. Volkman, 1984. Parasite antigen-specific T cell lines and clones: major histocompatibility complex restriction and B cell helper function. *J. Clin. Invest.* **73**: 1754-1762.
- Nydegger U.E., Lambert P.H., Gerber H. & P.E Miescher, 1974. Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. *J. Clin. Invest.* **54**: 297-309.
- O' Farrell P., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007-4021.
- O'Hanlon G.M., Howarth O.W. & H.H. Ress, 1987. Identification of ecdysone 25-O-beta-D-glucopyranoside as a new metabolite of ecdysone in nematode *Parascaris equorum*. *Biochem. J.* **248**: 305-307.
- Okabe K. & T. Kanaka, 1961. Urin precipitation reaction from schistosomiasis Japonica. *Kurume Med. J.* **8**: 24-37.
- Oliver-Gonzalez J. & J.T. Bercovitz, 1944. Precipitin reactions antigen prepared from microfilariae of *Wuchereria bancrofti* (Preliminary report). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 315.
- Oliver-Gonzalez J. & F.H. Morales, 1945. Common antigens among filarial and other nematode parasites in man . *J. Infect. Dis.* **79**:91.
- O.M.S., 1967. Détermination de l'importance de la bilharziose pour la santé publique. Rapport d'un groupe scientifique de l'O.M.S. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Série de rapports techniques **349**.
- O.M.S., 1984a . Filariose lymphatique. Quatrième rapport du comité OMS d'experts de la filariose . Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Série de rapports techniques **702**.
- O.M.S., 1984b . Filariasis Scientific Working Group of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Report of a laboratory workshop on the application of monoclonal antibodies to immunodiagnosis and studies of antigens in filariasis. Institut Pasteur, Lille, November 14-18, 1983.
- O.M.S., 1985. Lutte contre la schistosomiase. Rapport d'un comité d'experts. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, Série des rapports techniques **728**.
- Ottesen E.A., Weller P.F. & L. Heck, 1977. Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *Immunology* **33**: 413-421.
- Ottesen E. A., Neva F.A., Paranjape R.S., Tripathy S.P., Thiruvengadm K.V. & M.A. Beaven, 1979. Specific allergic sensitization to filarial antigens in tropical eosinophilia syndrome. *Lancet* **1**: 1158.
- Ottesen E.A., 1980. Immunopathology of lymphatic filariasis in man. *Springer Semin. Immunopathol.* **2**: 373-385.
- Ottesen E. A., Kumarasawmi V., Paranjape R., Poindexter R.W. & S.P. Tripathy, 1981. Naturally occurring blocking antibodies modulate immediate hypersensitivity responses in human filariasis. *J. Immunol.* **127**: 2014-2020.

- Ottesen E.A., Weller P.F., Lunde M.N. & R. Hussain, 1982. Endemic filariasis on a Pacific Island II. Immunologic aspects: immunoglobulin, complement, and specific antifilarial IgG, IgM and IgE antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **31**: 953-961.
- Ouaissi A., Kouemeri L. E., Haque A., Ridet P.R., Saint-André P. & A. Capron, 1981. Detection of circulating antigens in onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **30**: 1211-1218.
- Ouaissi A., Des Moutis I., Cornette J., Pierce R. & A. Capron, 1983. Detection of IgE antibodies in Onchocerciasis using a semi-purified fraction from *Dipetalonema viteae* total antigen. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **70**: 231-237.
- Pacheco G. & T.J. Tanaraj, 1966. Indirect hemagglutination with extracts of various helminths in eosinophilic lung (tropical eosinophilia). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **24**: 315.
- Paranjape R.S., Kumaraswami V., Prabhakar P., Subramaniam S. & P.R. Narayanan, 1985. Anti-filarial IgG antibodies in patients with Bancroftian filariasis and tropical pulmonary eosinophilia. *Indian J. Exp. Biol.* **23**: 676-678.
- Paranjape R.S., Hussain R., Nutman T.B., Hamilton R. & E.A. Ottesen, 1986. Identification of circulating parasite antigen in patients with Bancroftian filariasis. *Clin. Exp. Immunol.* **63** : 508-516.
- Parkhe K., Prasard G., Das A., Harinath B., Roebber M. & R. Hamilton, 1986. Disc/stick ELISA for diagnosis of Bancroftian filariasis. *Ind. J. Exp. Biol.* **24**: 437-439.
- Partono F., Oemijati S., Hudojo *et al*, 1977. Malayan filariasis in Central Sulawesi (Celebes), Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **8**: 452-458.
- Pautrizel R., Tribouley J. & J. Duret, 1963. Diagnostic sérologique de la bilharziose à *Schistosoma mansoni*, à l'aide d'une réaction de fixation du complément utilisant un antigène délipidé. *Ann. Inst. Pasteur* **104**: 502.
- Pearce E.J., Basch P.F. & A. Sher, 1986. Evidence that the reduced antigenicity of developing *Schistosoma mansoni* schistosomula is due to antigen shedding rather than host molecule acquisition. *Parasite Immunol.* **8**: 79-94.
- Pellegrino J., Brener Z. & J.M.P. Memoria, 1959. A comparative study of intradermal tests and stool examination in epidemiological surveys on schistosomiasis mansoni. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **8**: 307.
- Pelley R.P. & R.J. Pelley, 1976. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens. VI. Biochemistry and immunochemistry of major serological antigens with particular emphasis on MSA1. In *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships* (ed. H. Van den Bossche), pp. 283-290.
- Pelley R.P., Pelley R.J., Hamburger J., Peters P.A. & K.S. Warren, 1976. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens. I. Identification and purification of three major antigens and the employment of radioimmunoassay for their further characterization. *J. Immunol.* **117**: 1553-1560.
- Penttinen K., Vaheri A. & G. Myllylä, 1971. Detection and characterization of immune complexes by the platelets aggregation test. I. Complexes formed *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* **8**: 389.
- Pery P., Petit A., Poulain J. & G. Luffau, 1974. Phosphorylcholine-bearing components in homogenates of nematodes. *Eur. J. Immunol.* **4**: 637-639.

- Pery P., Luffau G., Charely J., Petit A., Rouze P. & S. Bernard, 1979. Phosphorylcholine antigens from *Nippostrongylus brasiliensis*. 1. Anti-phosphorylcholine antibodies in infected rat and location of phosphorylcholine antigens. *Ann. Immunol.* **130C**: 879-888.
- Pestel J., Dissous C., Dessaint J.P., Louis J., Engers H. & A. Capron, 1985. Specific *Schistosoma mansoni* rat T cell clones. I. Generation and functional analysis *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **134**: 4132-4139.
- Petralanda I., Yarzabal L. & W.F. Piessens, 1986. Studies on a filarial antigen with collagenase activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* **19**: 51-59.
- Petralanda I., Yarzabal L. & W.F. Piessens, 1988. Parasite antigens in breast milk of women infected with *Onchocerca volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**: 372-379.
- Piessens W.F., Mc Greevy P.B., Piessens P.W., Mc Greevy M., Koiman I., Saroso J.S. & D.T. Dennis, 1980a. Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: specific cellular unresponsiveness to filarial antigens. *J. Clin. Invest.* **65**: 172-179.
- Piessens W.F., Mc Greevy P.B., Ratiwayanto S., Mc Greevy M., Piessens P.W., Koiman I., Saroso J.S. & D.T. Dennis, 1980b. Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 563-570.
- Piessens W.F., Ratiwayanto S. & S. Tuti, 1980c. Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis with *Brugia malayi*. *N. Engl. J. Med.* **302**: 833-837.
- Piessens W.F., Partono F., Hoffman S.L., Ratiwayanto S., Piessens P.W., Palmeir J.R., Koiman I., Dennis D.T. & W.P. Carney, 1982. Antigen-specific suppressor T lymphocytes in human lymphatic filariasis. *N. Engl. J. Med.* **307**: 144-148.
- Piessens W.F., Hoffman S.L., Ratiwayanto S. *et al.*, 1983. Opposing effects of filariasis and chronic malaria on immunoregulatory T lymphocytes. *Diagn. Immunol.* **1**: 257-260.
- Piessens W.F., Wadee A.A. & L. Kurianawan, 1987. Regulation of immune responses in lymphatic filariasis. In *Ciba Foundation Symposium* 127, pp.164-179. Eds. J.Wiley & Sons, Chichester.
- Pino-Heiss S., Petit M., Beckstead J.H. & J.H. McKerrow, 1986. Preparation of mouse monoclonal antibodies and evidence for a host immune response to the preacetabular gland proteinase of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 536-543.
- Philipp M., Gomez-Priego A., Parkhouse R.M., Davies M.W., Clark N.W., Ogilvie B.M. & F. Beltran-Hernandez, 1984. Identification of an antigen of *Onchocerca volvulus* of possible diagnostic use. *Parasitology* **89**: 295-309.
- Potocnjak P., Zavala F., Nussenzweig R. & V. Nussenzweig, 1982. Inhibition of idiotype anti-idiotype interaction for detection of a parasite antigen: a new immunoassay. *Science* **215**: 1637-1639
- Powell M.R. & D.G. Colley, 1985. Demonstration of splenic auto-anti-idiotypic plaque-forming cells in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **134**: 4140-4145.
- Prasad G.B. & B.C. Harinath, 1988. Analysis, characterization and diagnostic utility of filarial antigen fractions isolated from immune complexes in Bancroftian filariasis. *Diagn. Clin. Immunol.* **5**: 269-275.

- Prou O. & P. Deletoille, 1987. Diagnostic rapide des antigènes particuliers de *Plasmodium falciparum* par MONOFLUO^R kit P. FALCIPARUM. Etude de 441 échantillons, 1988, en cours de publication.
- Qian Z.L. & A.M. Deelder, 1983. *Schistosoma japonicum* : immunological response to circulating polysaccharide antigens in rabbits with a light infection. *Exp. Parasitol.* **55**: 394-403.
- Rajasekariah G.R., Mitchell G.F. & M.D. Rickard, 1980a. *Taenia taeniaeformis* in mice: protective immunization with oncospheres and their products. *Int. J. Parasitol.* **10**: 155-160.
- Rajasekariah G.R., Rickard M.D. & G.F. Mitchell, 1980b. Immunization of mice against infection with *Taenia taeniaeformis* using various antigens prepared from eggs, oncospheres, developing larvae and strobilocerci. *Int. J. Parasitol.* **10**: 315-324.
- Ranjit R. & C.G. Asoke, 1985. Somatic and excretory polysaccharide antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc.* **63**: 411-422.
- Rathaur S., Robertson B.D., Selkirk M.E. & R.M. Maizels, 1987. Secretory acetylcholinesterases from *Brugia malayi* adult and microfilarial parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **26**: 257-265.
- Reddy M.V., Malhorta A. & B.C. Harinath, 1984. Detection of circulating antigen in bancroftian filariasis by sandwich ELISA using filarial serum IgG. *J. Helminthol.* **58**: 259-262.
- Reddy M.V., Prasard G.B. & B.C. Harinath, 1986. Isolation and evaluation of antigens from microfilaraemia plasma and immune complexes for diagnosis of Bancroftian filariasis. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **29**: 179-189.
- Reidlinger J., Grecis R.K. & D. Wakelin (1986). Antigen-specific T-cell lines transfer protective immunity against *Trichinella spiralis* in vivo. *Immunology* **58**: 57-61.
- Rickard M.D. & K.J. Bell, 1971. Successful vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens produced during *in vitro* cultivation of the larval stages. *Res. Veterin. Sc.* **12**: 401-402.
- Rickard M.D. & M.J. Howell, 1987. Helminth vaccines. In *In vitro Methods for Parasite Cultivation* (ed. A.E.R. Taylor and J.R. Baker). London: Academic Press. Sous presse.
- Rhoads M.L., 1982. *Trichinella spiralis* : identification and purification of superoxide dismutase. *Exp. Parasitol.* **56**: 41-54.
- Richard-Lenoble D., Kombila M., Rupp E.A., Pappayliou E., Gaxotte P., Nguiri C. & M.A. Aziz, 1988. Ivermectin in Loiasis and concomitant *O. volvulus* and *M. perstans* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 480-483.
- Ridley D.S., 1956. The complement fixation test in filariasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **50**: 255-257.
- Rodhain J. & F. Van den Branden, 1916. Recherches diverses sur la Filaria (*Onchocerca volvulus*). *Bull. Soc. Path. Exot.* **9**: 186.
- Robertson B.D., Burkot T.R., Gillespie S.H., Kennedy M.W., Wambai Z. & R.M. Maizels, 1988. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin. Exp. Immunol.* **74**: 236-241.

- Ruiz-Tiben E., Hillyer G.V., Knight W.B., Gomez de Rios I. & J.P. Woodall, 1979. Intensity of infection with *Schistosoma mansoni* : its relation to the sensitivity and specificity of serologic tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **28**: 230-236.
- Ruppel A., Diesfeld H.J. & U. Rother, 1985. Immunoblot of *Schistosoma mansoni* antigens with sera of schistosomiasis patients: diagnostic potential of an adult schistosome polypeptide. *Clin. exp. Immunol.* **62**: 499-506.
- Salama M.M., Aronstein W.S., Weiss J.B. & M. Strand, 1984. Monoclonal antibody identification of protein antigens in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 608-620.
- Santoro F., Borojevic R., Bout D., Tachon P., Bina J.C. & A. Capron, 1977a. Mother child relationship in human schistosomiasis mansoni. I-Parasitic antigens and antibodies in milk. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 1164-1168.
- Santoro F., Carlier Y., Borojevic R., Bout D., Tachon P. & A. Capron, 1977b. Parasite "M" antigen in milk from mothers infected with *Schistosoma mansoni* (Preliminary report). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **71**: 121-123.
- Santoro F., Capron M., Joseph M., Rousseaux-Prevost R. & A. Capron, 1978 a. Circulating antigens and immune complexes in *Schistosoma mansoni* infected rats. Characterization by radioimmunoprecipitation PEG assay (RIPEGA). *Clin. Exp. Immunol.* **32**: 435-442.
- Santoro F., Vandemeulebroucke B. & A. Capron, 1978b. The use of the radioimmunoprecipitation-PEG-assay (RIPEGA) to quantify circulating antigens in human and experimental schistosomiasis. *J. Immunol. Methods* **24**: 229-237.
- Santoro F., Pestel J., Lepresle T., Liebart M.C. & A. Capron, 1980a. *Schistosoma mansoni* anticomplementary antigens (SACA). Detection in schistosomula and adult worms. *Immunol. Letters.* **2**: 43-46.
- Santoro F., Prata A., Castro C.N., Fischer E. & A. Capron, 1980a. Circulating antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis: relationship with *Schistosoma mansoni* egg output. *Clin. Exp. Immunol.* **42**: 219-225.
- Scherif A.F., 1956. A new intradermal antigen for the diagnosis of schistosomiasis. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **50**: 105.
- Schiller E.L., D'Antonio R. & H.F. Marroquin, 1980. Intradermal reactivity of excretory and secretory products of onchocercal microfilariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **29**: 1215-1219.
- Schnur L.F., Zuckerman A. & C.L. Greenblatt , 1972. Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted *in vitro* and *in vivo*. *Isr. J. Med. Sci.* **8**: 932.
- Schrater A.F., Spielman A. & W.F. Piessens, 1983. Predisposition of *Brugia malayi* microfilaremia in progeny of infected gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 1306-1308.
- Selkirk M.E., Denham D.A., Partono F., Sutanto I. & R.M. Maizels, 1986. Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasites. In *Parasites and Molecular Biology: applications of new techniques*, vol.23 (ed. A.J.G. Simpson). *Parasitology* **92** suppl. S15-S38.
- Shaker Z.A., Hassanein H.I., Hamed R.R., Botros S.S., Mahmoud F.S., De Jonge N. & A.M. Deelder, 1989. detection of circulating antigen (CAA) in experimental murine schistosomiasis mansoni by avidin-biotin ELISA (AB-ELISA). Soumis.

- Silberstein D.S. & D.D. Despommier, 1984. Antigens from *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *J. immunol.* **132**: 898-904.
- Silberstein D.S. & D.D. Despommier, 1985. Effects of *Trichinella spiralis* that induce a protective response in the mouse. *Science* **227**: 948-950.
- Sim B., Mak J., Cheong W., Sutanto I., Kurniawan L., Marwoto H., Franke E., Campell J. & D. Wirth, 1986. Identification of *Brugia malayi* in vectors with a species-specific DNA probe. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 559-564.
- Sisley B.M., Mackenzie C.D., Steward M.W., William J.F., O'Day J., Luty A.J., Braga M. & H. El Sheikh, 1987. Associations between clinical disease, circulating antibodies and C1q-binding immune complexes in human onchocerciasis. *Parasite Immunol.* **9**: 447-463.
- Smith R.D., James M.A. & M. Ristic, 1981. Bovine Babesiosis: protection of cattle with culture-derived soluble *Babesia bovis* antigen. *Science* **212**: 335-338.
- Sogandares-Bernal F., Race M.C., Dennis M.V & M. Voge, 1981. Circulating antigens in infections of mice by tetrathyridia of *Mesocestoides corti*. *Parasitol. Res.* **64**: 157-167.
- Southgate B.A., 1974. A quantitative approach to parasitological techniques in bancroftian filariasis and its effect on epidemiological understanding. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **68**: 177-186.
- Subrahmanyam D., Mehta K., Nelson D.S., Rayo Y.V. & C.K.Rano, 1978. Immune reactions in human filariasis. *J. Clin. Microbiol.* **8**: 228-238.
- Tada I., Otsuji Y., Harada T., Mimori T. & H. Fukumoto, 1982. Skin test study of Bancroftian filariasis in Kuroshima Island, Okinawa: a 13-year longitudinal study during a control campaign. *Am J. Trop. Med Hyg.* **31**: 962-967.
- Tanaka K., Kawamura H., Tohgi N., Tsuji M., Miyachi Y. & A. Miyoshi, 1983. The measurement of *Ascaris suum* protein by radioimmunoassay in sera from patients with helminthiasis and gastrointestinal diseases. *Parasitology* **86**: 291-300.
- Tandon A., Zahner H., Sanger I., Muller H.A. & G. Reiner, 1983. Time courses of antibody levels in *Mastomys natalensis* after infections with *Litomosoides carinii*, *Dipetalonema vitae*, *Brugia malayi* or *B. pahangi*, determined by ELISA. *Parasitol. Res.* **69**: 681.
- Taylor R.M., Vidal A., Torpier G., Meyer D.J., Roitsch C., Balloul J.M., Southan C., Sondermeyer P., Pemple S., Lecocq J.P., Capron A. & B. Ketterer, 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**: 465-472.
- Theofilopoulos A.N., Wilson C.B., Bokisch V.A. & F.J. Dixon, 1974. Binding of soluble immune complexes to human lymphoblastoid cells. II. Use of Raji cells to detect circulating immune complexes in animal and human sera. *J. Exp. Med.* **140**: 1230-1244.
- Tomisato M., Nariuchi H., Ueno J., Nogami S., Tanaka H., Aoki Y. & Y. Nakajima, 1986. *Brugia pahangi*: stage-specific antigens on microfilariae detected by serum from infected jirds or by monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* **61**: 18-25.
- Torpier G., Hirn M., Nirde P., De Reggi M. & A. Capron, 1982. Detection of ecdysteroids in the human trematode *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* **84**: 123-130.
- Turner L.H., 1959. Studies on filariasis in Malaya: the clinical features of filariasis due to *Wuchereria malayi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **53**: 154-169.

- Van Knappen F., Panggabean S.O. & J. Van Leusden, 1985. Demonstration of Toxoplasma antigen containing complexes in active toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **22**: 645-650.
- Van Marck E.A., 1975. Presence of the circulating polysaccharide antigen in the liver of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **55**: 373-377.
- Van Marck E.A., Deelder A.M. & P.L. Gigase, 1977. Effect of partial portal vein ligation on immune glomerular deposits in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Br. J. Exp. Pathol.* **58**: 412-417.
- Van Marck E.A., Deelder A.M. & P.L. Gigase, 1982. Schistosomal glomerulopathy: role of the circulating anodic polysaccharide antigen. In *The Host-Invader Interplay* (ed. H. Van den Bossche), pp. 507-510. Amsterdam: Elsevier/North Holland.
- Velge-Roussel F., Verwaerde C., Grzych J.M., Auriault C. & A. Capron, 1989. Protective effects of anti-antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26 kDa *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol.* **142**: 2527-2532.
- Vernes A., Fruit J., Bouthemy F., A. Capron, 1969. L'immunofluorescence indirecte appliquée au diagnostic des bilharzioses. Etude de la spécificité de la réaction sur coupes a congélation et comparaison avec les techniques d'immuno-électrophorèse et de fixation du complément. *Bull. Soc. Path. Exot.* **62**: 548-557.
- Vernes A., 1975. Valeur et limites des réactions d'hypersensibilité appliquées au diagnostic des helminthiases. In *Diagnosis of Parasitic Diseases*, pp.77-94. Proceedings of an International Colloquium, Antwerp, 6-8 December 1974.
- Vernes A., 1976. Immunization of the mouse and minipig against *Trichinella spiralis*. In *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationship* (ed. Van den Bossche), pp. 319-324. Amsterdam: North Holland.
- Verwaerde C., Grzych J.M., Bazin H., Capron M. & A. Capron, 1979. Production d'anticorps monoclonaux anti-*Schistosoma mansoni*. Etude préliminaire. *C.R. Acad. Sc. Paris* **289 D**: 725-727.
- Verwaerde C., Auriault C., Dammeville M., Neyrinck J.L., Vendeville C. & A. Capron, 1986. Role of serine proteases of *Schistosoma mansoni* in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.* **24**: 509-516.
- Verwaerde C., Auriault C., Neyrinck J.L., & A. Capron, 1988. Properties of serine proteases of *Schistosoma mansoni* schistosomula involved in the regulation of IgE synthesis. *Scand. J. Immunol.* **27**: 17-24.
- Wadee A.A. & W.F. Piessens, 1986. Microfilariae of *Brugia malayi* contain T cell mitogen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 141-147.
- Wang M., Deng Q.J., Liu R.Z., Tao P., Lu C. & Z.N. Deng, 1987. Diagnosis of tertian malaria by enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **81**: 888-890.
- Warren K.S., 1982. Mechanisms of immunopathology in parasitic infections. In *Immunology of Parasitic Infections*, 2nd ed. (ed. S. Cohen and K.S. Warren), pp. 116-137. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wartman W.B., 1947. Filariasis in American armed forces in World War II. *Medicine* **26**: 333-396.

- Weil G.J., Hussain R., Kurmaraswami V., Tripathy S.P. & E.A. Ottesen, 1983. Prenatal allergic sensitization to helminth antigens in offspring of parasite-infected mothers. *J. Clin. Invest.* **71**: 1124-1129.
- Weil G.J., Malane M.S., Powers K.G. & L.S. Blair, 1985. Monoclonal antibodies to parasite antigens found in the serum of *Dirofilaria immitis* -infected dogs. *J. Immunol.* **134**: 1185-1191.
- Weil G.J., Kumar H., Santhanam S., Sethumadhavan K.V.P. & D.C. Jain, 1986. Detection of parasite antigen in bancroftian filariasis by counterimmunoelectrophoresis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**: 565-570.
- Weil G.J. & F. Liftis F., 1987. Identification and partial characterization of a parasite antigen in sera from humans infected with *Wuchereria bancrofti*. *J. Immunol.* **138**: 3035-3041.
- Weil G.J., Jain D.C., Santhanam S., Malhotra A., Kumar H., Sethumadhavan K.V.P., Liftis F. & T.K. Ghosh, 1987: A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. *J. Infect. Dis.* **156**: 350-355.
- Weiss N., Hussain R. & E.A. Ottesen, 1982. IgE antibodies are more species-specific than IgG antibodies in human onchocerciasis and lymphatic filariasis. *Immunology* **45**: 129-137.
- Weiss N., Van Den Ende M.C., Albiez E.J., Barbiero V.K., Forsyth K. & A.M. Prince, 1986. Detection of serum antibodies and circulating antigens in a chimpanzee experimentally infected with *Onchocerca volvulus*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80** : 587-591.
- Wenger J.D., K.P. Forsyth & J.W. Kazura 1988. Identification of phosphorylcholine epitope-containing antigens in *Brugia malayi* and relation of serum epitope levels to infection status of jirds with Brugian filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **38**:133-141.
- Wide L., Axen R. & J. Porath, 1967. Radioimmunosorbent assay of proteins. Chemical couplings of antibodies to soluble dextran. *Immunochemistry* **4**: 381.
- Wilson R.J.M., 1974. Soluble antigens as blocking antigens. Ciba Foundation Symposium 25 (new series), 185-203. Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
- Wilson R.J.M., Mc Gregor I.A. & K. Williams, 1975. Occurrence of S antigens in serum in *Plasmodium falciparum* infections in man. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **69**: 453.
- Williams S., De Simone S. & L. Mc Reynolds, 1988. Species-specific oligonucleotide probes for the identification of human filarial parasites. *Mol. Biochem. parasitol.* **28**: 163-170.
- Winchester R.J., Kunkel A.G. & V. Agnello, 1971. Occurrence of IgG complexes in serum and joint fluid of rheumatoid arthritis patients: use of monoclonal rheumatoid factors as reagents for their demonstration. *J. Exp. Med.* **134**: 286.
- Wyler D.J. & J.W. Tracy, 1982. Direct and indirect effects of soluble extracts of *Schistosoma mansoni* eggs on fibroblast proliferation *in vitro*. *Infection and Immunity* **38**: 103-108.
- Zavala F., Tam J.P. & A. Masuda, 1986. Synthetic peptides as antigens for the detection of humoral immunity to *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J. Immunol. Methods* **93**: 55-61.

TABLE DES MATIERES

| Première partie | |
|--|----|
| GENERALITES | |
| RESUME | 11 |
| I. INTRODUCTION | 13 |
| II. DONNEES GENERALES SUR LES FILARIOSES HUMAINES | 15 |
| A. Les filarioses humaines | 15 |
| 1. Les filarioses lymphatiques | |
| 1.1. Cycle biologique des filaires lymphatiques | |
| 1.2. Manifestations cliniques | 17 |
| 1.2.1. Filariose lymphatique | |
| 1.2.2. Le poumon éosinophile tropicale | 18 |
| 1.2.3. Les résidents "endémo-négatifs" | |
| 1.3. Réponse immune | 19 |
| 1.3.1. Réactivité globale en fonction du stade clinique | |
| 1.3.2. Série d'observations | 20 |
| 1.4. Traitement médicamenteux | 22 |
| 2. Autres filarioses | 23 |
| B. Le diagnostic des filarioses | 24 |
| 1. Diagnostic parasitologique | |
| 2. Diagnostic immunologique de recherche d'anticorps | 25 |
| 2.1. Les tests cutanés | |
| 2.2. La réaction de fixation du complément | 26 |
| 2.3. L'hémagglutination indirecte | |
| 2.4. L'immunofluorescence indirecte | 27 |
| 2.5. Les techniques de précipitation en gel | |
| 2.6. Dosage des IgE spécifiques par la technique du RAST | 28 |
| 2.7. Les tests sérologiques ELISA et RIA | |
| 2.8. Conclusion | 30 |
| III. DONNEES GENERALES SUR LES SCHISTOSOMIASES HUMAINES | 32 |
| A. Les schistosomiasis humaines | 32 |
| 1. Cycle biologique des schistosomes humains | |
| 2. Manifestations cliniques | 37 |
| 3. Réponse immune | |
| 3.1. Mécanismes effecteurs de la réponse immune | |
| 3.2. Réponse immune et stade clinique | 38 |
| 4. Traitement médicamenteux | 40 |
| B. Le diagnostic de la schistosomiase | 41 |
| 1. Diagnostic parasitologique | |
| 2. Diagnostic immunologique de recherche d'anticorps | 42 |
| 2.1. Les tests cutanés | |
| 2.2. La réaction de fixation du complément | 43 |
| 2.3. La réaction d'hémagglutination indirecte | |
| 2.4. L'immunofluorescence indirecte | |
| 2.5. Les réactions de précipitation en gel | |
| 2.6. La réaction péricercarienne de Vogel et Minning | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7. La réaction de précipitation périovulaire de Gonzales | |
| 2.9. Dosage des IgE spécifiques | |
| 2.9. Les tests sérologiques ELISA et RIA | 45 |
| 2.10. La technique d'immunotransfert | |
| IV. LES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES DANS LES PARASITOSE | 47 |
| A. Les antigènes circulants et urinaires | |
| B. Méthodes de détection et d'étude de ces antigènes | 48 |
| 1. Les tests de détection des antigènes circulants et urinaires | |
| 1.1. Les réactions de précipitation en gel | |
| 1.5. Les tests d'hémagglutination indirecte | 49 |
| 1.3. Le test RIPEGA | |
| 1.4. Les RIA et ELISA à deux sites | |
| 1.4.1. Le test 2S-IRMA | |
| 1.4.2. Le test 2S-ELISA | 50 |
| 1.3. Les RIA et ELISA par inhibition et compétition | 51 |
| 2. Méthodes d'études des antigènes circulants | |
| 3. Méthodes de détection des complexes immuns circulants | 52 |
| C. Les antigènes circulants et urinaires dans les affections à protozoaires | |
| 1. Le paludisme | |
| 2. La toxoplasmose | 53 |
| 3. La babésiose | 54 |
| 4. La leishmaniose | |
| 5. La trypanosomiase américaine | 55 |
| 6. La trypanosomiase africaine | |
| D. Les antigènes circulants et urinaires dans les affections à helminthes | 55 |
| 1. La schistosomiase | |
| 2. Les filarioses et autres nématodoses | 58 |
| 3. Les cestodoses | 63 |
| E. Rôle des produits ES d'helminthes dans l'immunité | 63 |
| 1. Echappement au système immunitaire et modulation des réponses immunes de l'hôte | |
| 1.1. Echappement par libération de composants de surface | |
| 1.2. Rôle dans l'immunité concomitante | 64 |
| 1.3. Suppression des fonctions lymphocytaires | 65 |
| 1.4. Altération des fonctions macrophages et granulocytaires | 66 |
| 1.5. Modulation de la réaction du complément | 67 |
| 2. Rôle des produits ES dans l'immunité protectrice | 68 |
| 3. Immunopathologie induite par les produits ES | 70 |
| 3.1. Rôle des ES d'oeufs de schistosomes | |
| 3.2. Rôle des ES de schistosomules | 71 |
| 3.3. Rôle des complexes immuns: hypersensibilité aux CI. | |
| V. LES ECDYSTEROÏDES CIRCULANTES ET URINAIRES DANS LES HELMINTHIASES | 73 |
| A. Les ecdystéroïdes dans les schistosomiases | |
| B. Les ecdystéroïdes dans les filarioses | 74 |

Deuxième partie

RESULTATS

| | |
|---|-----|
| VI. LES ANTIGENES ET COMPLEXES IMMUNS CIRCULANTS DANS LA FILARIOSE A <i>WUCHERERIA BANCROFTI</i> | 76 |
| Article 1. Filariose lymphatique: détection d'antigènes circulants et urinaires et différence dans les isotypes d'anticorps compéxés aux antigènes circulants entre les sujets symptomatiques et asymptomatiques. | 76 |
| Article 2. Détection d'antigènes circulants et urinaires chez le rongeur <i>Mastomys natalensis</i> infesté expérimentalement par <i>Brugia malayi</i> , <i>B. pahangi</i> et <i>Litomosoides carinii</i> . | 86 |
| Article 3. Valeur diagnostique d'un test d'antigènes circulants dans les filarioses humaines | 93 |
| Travaux non publiés. | |
| A. Poids moléculaire des antigènes reconnus par l'anticorps AA3-44 dans le sérum de patients filariens. | 117 |
| B. Spécificité de l'anticorps AA3-44 | |
| C. Etude des antigènes ES de <i>B. malayi</i> reconnu par AA3-44 | 121 |
| 1. Libération <i>in vitro</i> des antigènes ES de <i>B. malayi</i> | |
| 2. Détermination du poids moléculaire et du point isoélectrique des antigènes ES de vers adultes de <i>B. malayi</i> | |
| 3. Résistance des antigènes ES de <i>B. malayi</i> au traitement physique, acide et enzymatique | 124 |
| 3.1. Action de la température | |
| 3.2. Action des acides | |
| 3.3. Sensibilité aux protéases | |
| 4. Adsorption des antigènes ES de <i>B. malayi</i> sur les lectines | |
| 4.1. Adsorption sur la WGA-Sépharose | |
| 4.2. Adsorption sur la Con A- Sépharose | 127 |
| 5. Marquage des produits ES à l'iode 125. | |
| 6. Marquage métabolique des produits ES. | |
| 7. Conclusion. | |
| VII. LES ANTIGENES CIRCULANTS DANS LES SCHISTOSOMIASES | 128 |
| Article 4. Valeur immunodiagnostique d'un anticorps monoclonal anti-antigène "M" de <i>Schistosoma mansoni</i> appliqué à la schistosomiase | 129 |
| Travaux non publiés. | |
| A. Détection d'antigènes circulants et urinaires bilharziens chez des enfants kényans infestés par <i>S. mansoni</i> . | 138 |
| B. Valeur diagnostique du test 2S-IRMA de détection d'antigènes bilharziens dans les schistosomiases humaines | 141 |

| | |
|--|-----|
| VIII. EFFET DU TRAITEMENT ANTI-PARASITAIRE SUR L'EVOLUTION DES ANTIGENES CIRCULANTS ET URINAIRES DANS LES FILARIOSES ET LA SCHISTOSOMIASE: VALEUR PRONOSTIQUE DE LEUR DETECTION. | 144 |
| A. Effet du traitement anti-filarien sur l'évolution des taux d'antigènes filariens | |
| 1. Traitement par la CGP 20 376 de <i>Mastomys</i> infestés par <i>B. pahangi</i> | |
| 2. Traitement à la DEC de patients filariens | 145 |
| B. Effet du traitement anti-bilharzien sur la détection d'antigènes circulants chez des sujets infestés par <i>S. haematobium</i> | 148 |
| IX. DISCUSSION | 150 |
| X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 159 |
| XI. TABLE DES MATIERES | 183 |

