

A ma mère
A la mémoire de mon père
A toute ma famille
A mes amis



Ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (*Unité mixte INSERM U167-CNRS 624*) à l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du professeur André Capron et avec la collaboration étroite du groupe "*Service de Chimie des Biomolécules, CNRS-URA 1309*" dirigé par le professeur André Tartar.



J'adresse mes vifs remerciements à

Mr le professeur A. Capron, *membre de l'académie des sciences*

Vous m'avez fait l'honneur de m'accueillir parmi vos élèves. Votre savoir, vos conseils et votre aide m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail. Que ce mémoire soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Mr le professeur J. Montreuil,

qui m' a fait le plaisir de bien vouloir présider cette thèse. Qu'il me soit permi de vous exprimer toute ma gratitude.

Mme le professeur G. Spik,

qui a accepté avec bienveillance de juger ce travail. Veuillez croire en ma très haute considération.

Mr le docteur D. Afchain,

pour l'intérêt porté à ce travail et pour son acceptation amicale de siéger parmi ce jury. Avec tout mon respect.

Mme le docteur C. Dissous,

pour sa disponibilité, sa rigueur et ses conseils scientifiques, tout au long de ces années passées dans son groupe. Sincère amitié

Mme le professeur H. Gras-Masse, Mr le professeur A. Tartar,
pour la collaboration scientifique qui était déterminante dans l'achèvement de ce travail. Soyez assurés de ma grande estime.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à

Mme Bigitte Facon, pour la collaboration scientifique fructueuse.

Alan Mc Nair, d'avoir assuré la correction de la version anglaise de ce manuscrit.

Odile Boyer, pour la lecture attentive de ce mémoire.

Odile Duvaux, pour ses encouragements.

Anne-Marie Schacht et Sophia Laffite, qui m'ont initié avec bienveillance et sympathie à la culture cellulaire et à la production d'anticorps monoclonaux, point de départ de ce travail.

Azizul Haque, Jean Marie Grzych et Jamal Khalifé, pour les conseils scientifiques.

Jacques Trolet et Marc Bossus qui nous ont fait bénéficier, avec amitié et humour, de leur large compétence technique.

Jean Loup Neyrinck, pour l'analyse statistique de nos résultats.

Christian Drolez, qui a assuré la réalisation des documents photographiques.

Jackeline Derick, qui a toujours répondu aimablement à nos curiosités bibliographiques.

Sylvie Anne et Claudine pour leur aide et disponibilité

Ali Taïbi, pour la grande amitié et les discussions fructueuses durant toutes les années, pleines de souvenirs, passées ensemble.

Je ne voudrai pas terminer sans avoir une pensée pour Hélène L. qui m'a apporté avec tendresse son aide et son soutien précieux pour la préparation de cette thèse.

Un grand **MERCI** du fond du coeur à tous ceux ou celles qui ont contribué, de près ou de loin, au bon déroulement de cette thèse. Ils sont nombreux au CIBP à manifester à mon égard une grande gentillesse. Que ce mémoire soit le témoignage de ma sincère amitié.

Nos travaux ont faits l'objet des publications suivantes :

Mustapha Chamekh, Brigitte Facon, Colette Dissous, Azizul Haque and A. Capron. (1990).

Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease.

Journal of Immunological Methods. 134, 129-137.

Brigitte Facon, Mustapha Chamekh, Colette Dissous and A. Capron. (1991).
Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5.

Molecular and Biochemical Parasitology. 45, 233-240.

M. Chamekh, H. Gras-Masse, M. Bossus, B. Facon, C. Dissous, A. tartar and A. Capron. (1991).

Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein.

Journal of Clinical Investigation (soumis pour publication).

A. Haque, M. Chamekh, J. Cornelis, A. Capron and S. Haque. (1990).

A monoclonal antibody to Ly-6 gene product inhibits generation of functionally active T cells and recognizes single antigenic specificity whose expression is up-regulated in virus-transformed rat fibroblast.

Immunology. 69, 558-563. (ce travail n'est pas inclu dans ce mémoire)

Communications dans des congrès :

M. Chamekh, B. Facon, C. Dissous and A. Capron.

Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* antigen 5 and identification of specific protein epitope.

Second International symposium on Echinococcosis, Faculty of Veterinary Medicine, University of ZURICH, 16-17 Août 1990.

M. Chamekh, B. facon, C. Dissous and A. Capron.

Molecular characterization of *Echinococcus granulosus* antigen 5 by a specific monoclonal antibody.

International Congress of Parasitology (ICOPA VII), Paris, 20-24 Août 1990. Abst S5D25, p. 611.

H. Gras-Masse, M. Chamekh, M. Bossus, B. Facon, C. Dissous, A. Capron and A. Tartar.

Selection of a peptide selectively recognized by human sera from *Echinococcus granulosus* infected patients. Technological Aspects of glycoProteinpeptide Research. Paris. 10 Avril 1991.

Brevet d'invention :

B. Facon, M. Chamekh, C. Dissous, A. Capron, A. Tartar et H. Gras-Masse.
Séquence peptidique immunogène d'*Echinococcus granulosus*, séquence d'ADN codant pour cette séquence peptidique et applications diagnostiques et thérapeutiques.

Brevet d'invention n° 9008900 (Institut Pasteur de Lille-Institut Pasteur de Paris - Institut Nationale de la Santé et de la Recherche Médicale)

SOMMAIRE

ABREVIATIONS.....	10
RESUME.....	11
GENERALITES SUR L'HYDATIDOSE.....	14
- Qu'est-ce que l'hydatidose ?.....	15
- Immunité à <i>Echinococcus granulosus</i>	29
- Mécanismes d'évasion.....	40
- Les antigènes majeurs du liquide hydatique.....	44
- Diagnostic et pronostic de l'hydatidose.....	48
APPORT DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LA STANDARDISATION DES ANTIGENES.....	64
TRAVAUX PERSONNELS.....	70
DISCUSSION - CONCLUSION.....	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	132
TABLE DES MATIERES.....	150

ABREVIATIONS

A g	:	Antigène
A c	:	Anticorps
A c m	:	Anticorps monoclonal
ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARN	:	Acide Ribonucléique
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
I g	:	Immunoglobuline
kDa	:	Kilodalton
PAGE	:	PolyAcrylamid Gel Electrophoresis
RIA	:	RadioImmunoAssay
SDS	:	Dodecyl Sulfate de Sodium

RESUME

L'hydatidose est une maladie parasitaire due au développement de la larve (kyste hydatique) d'un cestode: *Echinococcus granulosus*, naturellement chez l'homme et accidentellement chez le bétail. Les symptômes cliniques de cette parasitose ne sont pas spécifiques et il y a très peu d'évidences parasitologiques de l'infection. Le diagnostic précoce est déterminant pour le choix du traitement ainsi que pour l'évaluation épidémiologique des programmes de contrôle.

Parmi les antigènes du liquide hydatique, l'antigène 5 est reconnu spécifiquement par une grande proportion de sérums humains hydatiques. Cependant, la grande contamination du liquide hydatique par des déterminants antigéniques de l'hôte et la variabilité des sources d'approvisionnement des antigènes constituent les problèmes majeurs auxquels est confronté l'immunodiagnostic de l'hydatidose.

Dans le but de standardiser et de définir le(s) déterminant(s) antigénique(s) spécifique(s) d' *E. granulosus*, nous avons, dans un premier temps, caractérisé l'antigène 5 par une approche immunochimique, en utilisant un anticorps monoclonal spécifique et des sérums humains hydatiques. Les analyses de Western blot et d'immunoprécipitation nous ont permis de déduire que l'antigène 5 est un composant moléculaire de 64 kDa pouvant se dissocier en deux sous-unités de 37 et 22 kDa. Dans un test de compétition radioimmunologique, l'Ac monoclonal inhibait spécifiquement la fixation de sérums humains hydatiques à l'Ag 5, suggérant l'intérêt diagnostique de(s) épitope(s) cible(s) de ces anticorps. La déglycosylation et la délipidation des antigènes du liquide hydatique ainsi que l'immunoprécipitation des produits de traduction de l'ARN messager des protoscoléxes d' *E. granulosus* nous ont permis de montrer la nature protéique de l'épitope reconnue.

L'Ac monoclonal a été ensuite utilisé pour cribler une banque d'ADN complémentaire de l'ARN messager. Deux clones (Eg6 et Eg14) ont été isolés

et caractérisés. La protéine recombinante du clone Eg6 est reconnue aussi bien par l'Ac monoclonal que par les sérums humains hydatiques précipitant l'Ag 5. La comparaison de la séquence protéique des deux clones a révélé une faible homologie; alors que l'analyse de la répartition des résidus hydrophobes dans une structure bidimensionnelle a montré que les deux protéines ont une organisation α -hélicoïdale et qu'elles possèdent une zone conformationnelle commune formée par la juxtaposition d'acides aminés non adjacents. Cette homologie topographique a été mimée, à partir de la séquence du clone Eg6, par un peptide synthétique de 34 acides aminés organisés en α -hélice. Ce peptide inhibe de façon significative la fixation de l'Ac monoclonal et des sérums humains hydatiques à la protéine recombinante FP6 ou aux antigènes natives. Testé en ELISA, ce peptide réagit spécifiquement avec les anticorps, particulièrement de classe IgE, de différents patients atteints d'hydatidose.

Ces résultats indiquent le grand intérêt de ce peptide comme Ag standard pour le diagnostic et le pronostic de l'hydatidose.

GENERALITES

sur l'hydatidose

Biologie

Immunologie

Diagnostic

I. QU'EST-CE QUE L'HYDATIDOSE ?

L'échinococcose hydatique, connue sous le nom d'hydatidose, est une maladie parasitaire due au développement de la larve d'un taenia échinocoque du chien (*Echinococcus granulosus*; Goeze 1782), naturellement chez les bétails et accidentellement chez l'homme.

A. Cycle biologique d' *E. granulosus*

E. granulosus est un parasite cestode appartenant à la famille des Téniiidés et représente l'un des plus petits taenias (3-4 mm de long) intervenant dans la pathologie humaine. De façon naturelle, le cycle d'*E. granulosus* fait intervenir un mammifère carnivore de la famille des canidés (généralement le chien) comme hôte définitif, et un mammifère herbivore (ovin ou bovin) comme hôte intermédiaire (Figure 1, 2).

Le parasite adulte vit dans l'intestin grêle du chien. A maturité, le dernier anneau se détache et libère des oeufs ou embryophores qui sont dispersés dans la nature avec les selles. Ces oeufs, qui mesurent 30 à 37 μm de diamètre, peuvent survivre plus d'un an dans le sol, en résistant aussi bien à des climats chauds que froids. Les ovins et les bovins s'infestent par ingestion d'aliments ou d'eau souillés par les excréments des chiens parasités. L'homme se contamine généralement en portant les mains à la bouche après avoir été en contact avec un chien parasité. Parvenus dans l'estomac, les oeufs éclosent sous l'effet du suc gastrique. L'embryon hexacante traverse, grâce à ses six crochets, la paroi de l'intestin grêle au niveau de sa partie supérieure puis passe dans le système porte pour aller siéger, dans la majorité des cas, au niveau du foie où il devient une larve hydatide. Le développement de la larve s'achève sous la forme d'un kyste, appelé kyste hydatique. Les embryons peuvent être acheminés par la grande circulation à d'autres organes comme les poumons, les reins, la rate et le péritoine. Dans la larve, des centaines de

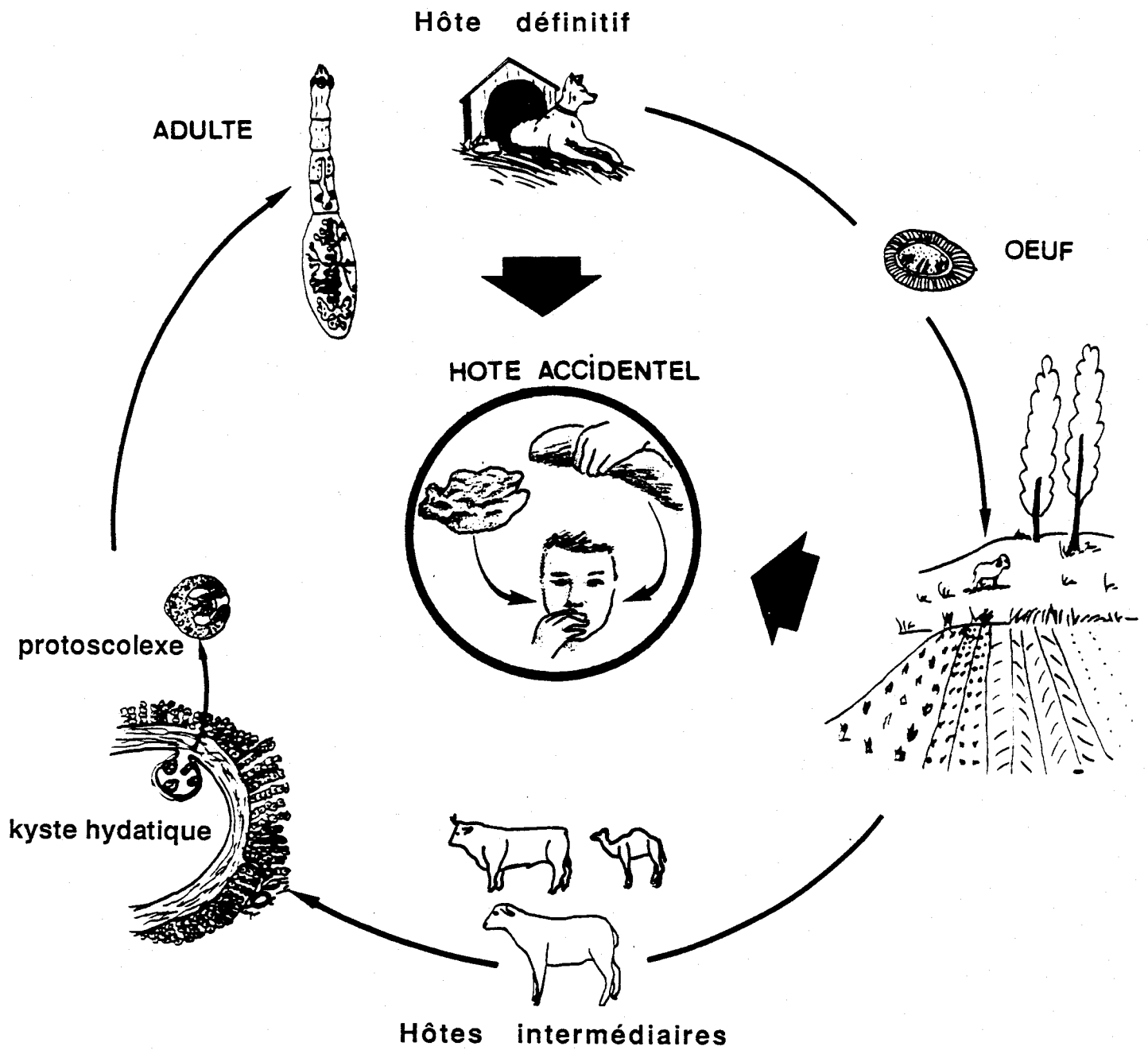


Figure 1 : Le cycle biologique d' *Echinococcus granulosus*

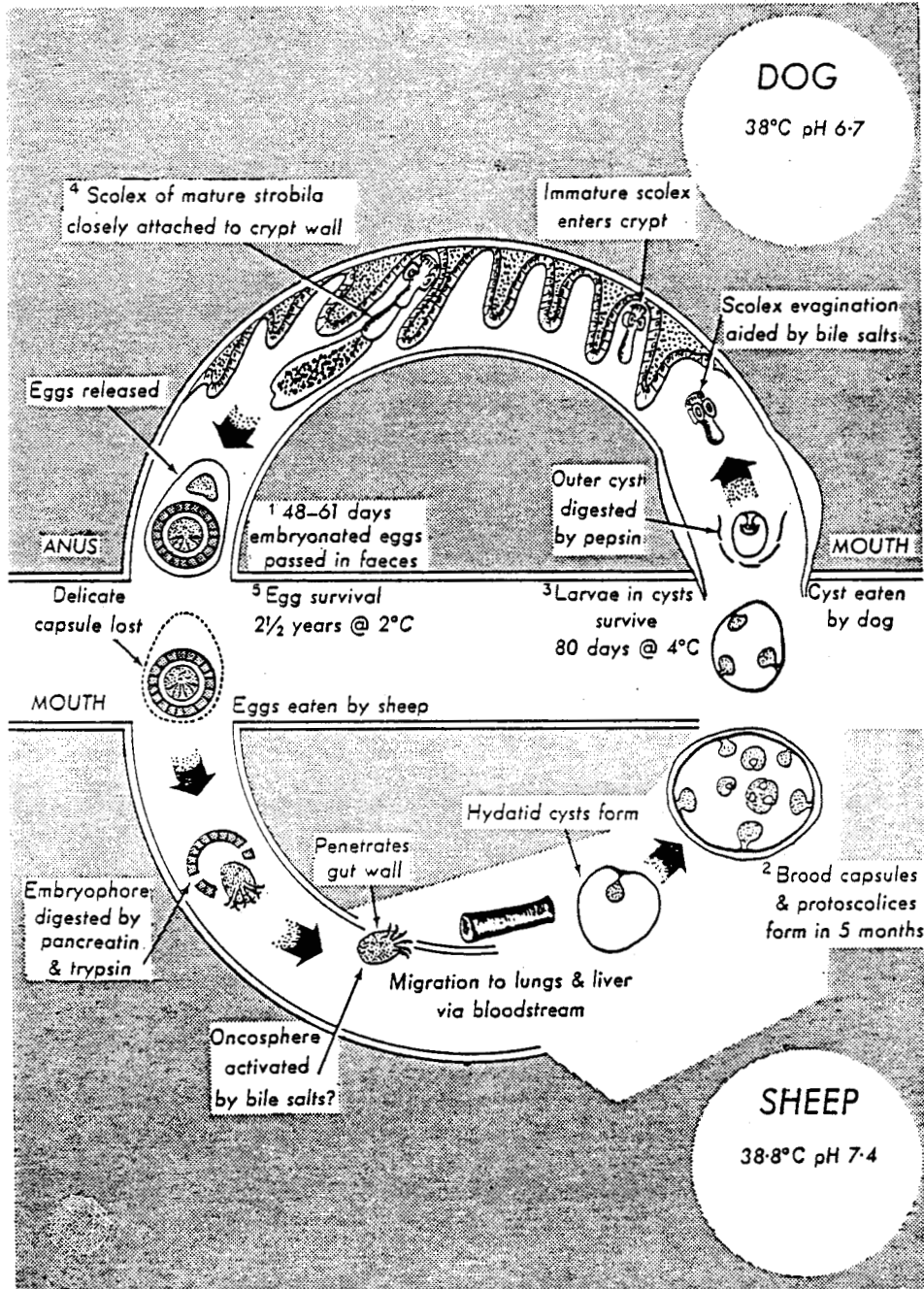


Figure 2 : Quelques aspects physiologiques du cycle biologique d' *Echinococcus granulosus*
D'après Smyth (1964)

protoscolexes bourgeonnent à partir de la membrane germinative du kyste et peuvent redonner des adultes si un organe parasité est dévoré par le chien.

B. Evolution anatomopathologique du kyste hydatique

Le développement de la larve se déroule à bas bruit, pendant plusieurs mois, voire plusieurs années. La vitesse de maturation dépend essentiellement de l'espèce-hôte et du viscère parasité. Dès la soixantième heure après son arrivée dans l'organe où il va s'établir, l'embryon se retrouve au centre d'un granulome. Ce dernier est formé essentiellement de cellules épithéloïdes, de fibroblastes à disposition concentrique et de polynucléaires éosinophiles. La périphérie de ce granulome est formée de cellules de l'organe ayant un aspect nécrotique. L'embryon augmente progressivement de taille, passant de 25 μm au troisième jour à 4-5 mm au cinquième mois. L'hydatide acquiert sa structure élémentaire définitive à partir du septième jour. Ce kyste hydatique (Figure 3) est constitué, de l'extérieur vers l'intérieur, de:

- l'**adventice** qui est une structure non parasitaire formée par le parenchyme de l'organe-hôte.

- la **membrane anhiste**, lamellaire, blanchâtre, constituée de couches concentriques d'une substance proche de la chitine. Elle peut atteindre 152 μm d'épaisseur et se comporte comme une membrane de dialyse tout en protégeant la membrane proligère interne.

- La **membrane proligère** ou **germinative**, mince, formée d'un parenchyme parasitaire nucléé. Cette membrane assure le contrôle des

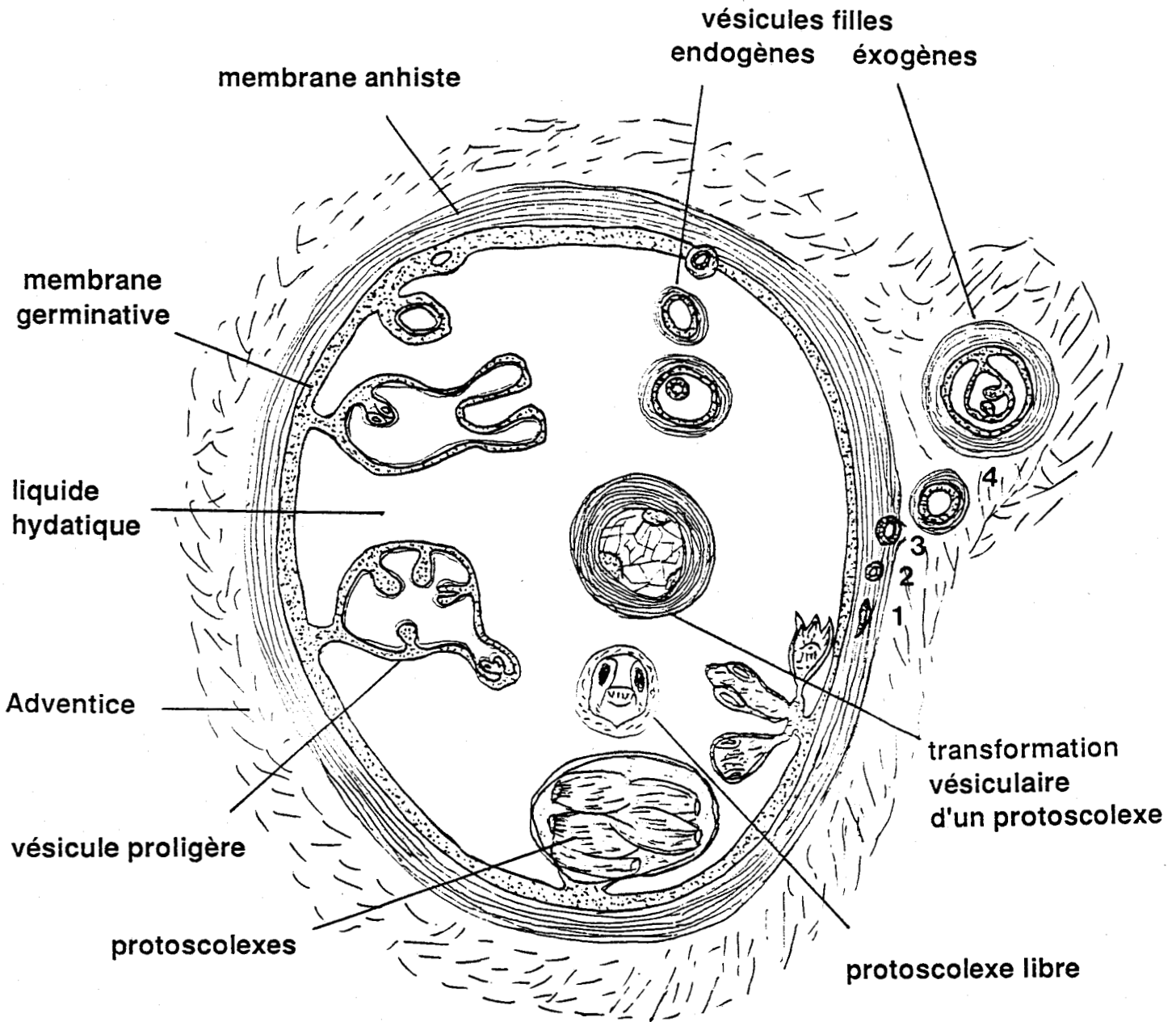


Figure 3 : Le kyste hydatique

échanges métaboliques, le maintien de l'homéostasie et la croissance de la larve. Sur sa face interne bourgeonnent des vésicules proligères sphériques, contenant chacune une dizaine de protoscolexes. Ces derniers peuvent se détacher de la membrane germinative par rupture mécanique et sédimenter dans le fond du kyste, constituant ainsi le "sable hydatique".

L'ensemble de ces structures est maintenu en place par le liquide hydatique sécrété par le parasite.

Cet aspect définitif du kyste hydatique peut progressivement se développer et atteindre le volume d'un ballon de foot-ball. Par suite d'une forte infestation ou d'un bourgeonnement exogène d'une hydatide mère, un même organe peut présenter plusieurs hydatides: c'est ce qu'on appelle l'**hydatidose primitive pluriloculaire** assez fréquente chez les ruminants. Au sein de l'hydatide primitive, les protoscolexes peuvent à nouveau donner des vésicules qui ont la possibilité de redonner des hydatides complètes lorsqu'ils sont libérés à l'extérieur, après fissuration ou rupture du kyste: c'est l'**hydatidose secondaire**.

Les différences observées dans l'évolution de cette affection parasitaire sont souvent attribuées à des variations intraspécifiques d' *E. granulosus*.

C. Variation intraspécifique d' *E. granulosus*

Dans la famille des cestodes, genre *Echinococcus*, une dizaine d'espèces ont été identifiées sur des critères morphologiques et biologiques, en se basant particulièrement sur l'espèce-hôte intermédiaire ou définitive impliquée dans le cycle biologique. La validité de ces espèces a été largement discutée par plusieurs auteurs (Rausch 1953, Cameron &

Wedster 1961, Euzeby 1962, Smyth 1964). De par leur incidence, seules deux espèces ont bénéficié d'importantes investigations biologiques et immunologiques: *E. granulosus* (Batsch 1786) et *E. multilocularis* (Leuckart 1863) responsable de l'échinococcose alvéolaire.

L'existence de variations morphologiques au sein des parasites *E. granulosus*, et les différences au niveau de l'évolution anatomopathologique de la larve suivant l'espèce-hôte infestée, a conduit plusieurs auteurs à définir des sous espèces parasites, connues sous le nom non formel de "souches". Ainsi, Sweatman & Williams (1962, 1963) et Williams & Sweatman (1963) ont différencié quatre sous espèces d'*E. granulosus*:

- *E. granulosus granulosus*: ver cosmopolite accomplissant son cycle entre un hôte intermédiaire (mouton, boeuf, porc) dont il contamine le plus souvent le foie et le poumon, et un hôte définitif (chien, chacal, loup, coyotte, dingo).

- *E. granulosus borealis*: souche canadienne dont la larve se développe électivement dans le poumon des cervidés tel que l'élan. Son hôte définitif est le loup, le coyotte et le chien.

- *E. granulosus canadensis*: autre souche canadienne qui accomplit son développement larvaire dans le poumon du renne uniquement (Cameron 1960, Webster & Cameron 1961); le chien et le loup étant l'hôte définitif.

- *E. granulosus equinus*: existe en Australie, en Amérique du Nord et dans certains pays d'Europe comme la Grande-Bretagne, la France et l'Espagne. Son cycle s'accomplit entre le cheval et le chien.

Cette notion de variation intraspécifique (Smyth 1964, Rausch 1985) a été soutenue par différents auteurs qui ont montré aussi cette variation en se basant sur des critères métaboliques et génétiques (Mc Manus & Smyth 1979, Bryant & Folckhart 1986, Thompson 1986, Thompson & Lymbery 1988). L'utilisation récente des techniques d'hybridation moléculaire, avec différentes sondes d'ADN, a permis non seulement de différencier *E. granulosus* d'*E. multilocularis* (Bretagne et al. 1988, Gottstein et al. 1991), mais aussi de montrer l'hétérogénéité génétique de différentes souches d'*E. granulosus* réparties en Europe (Eckert & Thompson 1988, Mc Manus & Rishi 1989), en Afrique (Mc Manus & Rishi 1989, Macpherson & Mc Manus 1982, Eckert & al. 1989), en Australie et en Amérique (Thompson & Lymbery 1988).

E. granulosus est l'une des espèces parasites connue pour sa grande diversité intraspécifique, ce qui a amené certains auteurs à discuter, voir polémiquer sur son réel statut taxonomique (Cook 1989, Mc Manus & al. 1989).

De telles variations reflètent la complexité de l'épidémiologie de l'hydatidose et la grande difficulté de contrôler la transmission du parasite (Mc Manus & Smyth 1986).

D. Répartition géographique, épidémiologie et répercussions économiques de l'hydatidose

L'hydatidose sévit dans tous les continents, particulièrement dans les pays d'élevage du mouton: l'Amérique latine, l'Afrique (Maghreb, Afrique de l'Est et du Sud), l'Australie, la Nouvelle Zélande, l'Asie centrale, l'Europe (pourtour du Bassin Méditerranéen). En France, des foyers actifs de

l'hydatidose ont été répertoriés en Corse (Dumon & al. 1981), en Provence (Dumon et al. 1981, Le Goff et al. 1987), dans le Gard (Deplage et al. 1986) et dans les Pyrénées-Atlantiques. La plupart des cas humains opérés en France est représentée par la main-d'oeuvre étrangère originaire de zones d'endémie (Maghreb, Portugal, Espagne,...)

Pour prévenir l'infestation humaine ou animale, il est en effet nécessaire de connaître parfaitement le cycle global d' *E. granulosus* et d'analyser son aspect fonctionnel en étudiant les relations écologiques que peut avoir chaque hôte avec d'autres espèces-hôtes, dans une région bien précise. Ainsi plusieurs cycles épidémiologiques ont été décrits en Australie et en Amérique latine (Gemmell & Lawson 1986, Thompson 1986, Thompson & Lymbery 1988), en Afrique (Macpherson 1983, Bchir & al. 1987, Mc Manus & Rishi 1989) et en Europe (Mc Manus & Rishi 1989). Ces auteurs ont mis l'accent sur trois cycles dont la dynamique de transmission à l'homme est inégale:

- **un cycle sauvage:** il s'accomplit entre des herbivores et des canidés sauvages. C'est le cycle ancestral pouvant amorcer un cycle rural classique par l'intermédiaire des chiens domestiques qui peuvent ingérer des herbivores sauvages.

- **Un cycle rural:** c'est plus souvent un demi-cycle qui se réalise uniquement dans le sens bétail-chien. Il est très répandu dans les pays musulmans où l'abattage rituel du mouton est courant lors des fêtes religieuses.

Même si l'incidence de la maladie reste prévalente dans le milieu rural (Schantz 1984), l'**urbanisation** du cycle constitue un véritable problème de santé publique dans plusieurs pays (Bchir et al. 1987).

Le taux de morbidité le plus élevé d'hydatidose dans le monde a été répertorié en Uruguay: 17,7 nouveaux cas par 100 000 habitants par an, entre 1962 et 1971 (Purriel et al. 1973). En plus de ce pays où l'incidence de la maladie reste la plus forte, des taux de morbidité importants sont enregistrés à Chypre: 12.9, en Grèce: 7.9, au Chili: 7.8 et dans le Maghreb: 5 (Eckert et al. 1981, Labraoui & Alloula 1979).

L'hydatidose représente dans ces pays un véritable fléau avec des répercussions économiques considérables, à la fois dans le domaine médical et vétérinaire. Plusieurs facteurs peuvent être tenus en compte (type d'abats infestés, coût d'hospitalisation, d'intervention et de convalescence,...), c'est pour cela qu'il est difficile d'évaluer de façon précise les pertes économiques causées par la larve d' *E. granulosus*. Quelques travaux ont estimé les pertes annuelles à 5 millions de dollars en Uruguay (Neghene 1970) et jusqu'à 25 millions de dollars en Italie (Arru et al. 1985).

E. Moyens de contrôle et traitement

1. Education sanitaire

La grande endémie de l'hydatidose a nécessité, dans certains pays, la mise en place d'un programme de contrôle visant à interrompre le cycle biologique du parasite. A Chypre, des mesures prophylactiques strictes ont été appliquées de 1971 à 1986: contrôle de l'abattage du bétail et incinération des abats porteurs d'hydatides, abattage des chiens errants, vermifugation systématique des chiens domestiques, destruction des parasites expulsés. Dès 1984, le taux d'hydatidose humaine est passé de 64% à 0% (Gemmell & Lawson 1986). L'application de la même stratégie de

contrôle en Argentine, au Chili, en Australie et en Nouvelle-Zélande, a permis de réduire de façon spectaculaire cette endémie (Gemmel & Lawson 1986, Gemmel et al. 1987).

Il est important de noter que l'investissement considérable dans la recherche épidémiologique, et l'application des modèles mathématiques (Roberts & al. 1986), ont permis de mieux cerner la dynamique des cycles épidémiologiques et le processus de la transmission parasitaire (Gemmel et al. 1987).

Si ces programmes de lutte ont contribué, durant ces deux dernières décennies, à la réduction de l'hydatidose dans certains pays, ils sont cependant confrontés à des traditions socio-culturelles qui favorisent souvent la pérennité du cycle parasitaire. Dans les communautés musulmanes, l'abattage des moutons lors des fêtes religieuses entraîne une forte infestation des chiens qui peut atteindre 100% dans le milieu rural. D'autre part on a noté, pour la première fois au Kenya, le rôle de l'homme comme un hôte intermédiaire actif dans un cycle parasitaire (Macpherson 1983). En effet, dans des tribus de Turkana, les cadavres humains sont mis à la disposition des chiens!

2. Traitement chirurgical

L'hydatidose est une des rares affections parasitaires à relever exclusivement du traitement chirurgical. Suivant la gravité de la maladie qui dépend de l'évolution anatomopathologique du kyste hydatique, les principes et les méthodes chirurgicales sont différentes (Assadourian et al. 1980). D'une manière générale, elles consistent, dans un premier temps, à ponctionner et stériliser le kyste en utilisant un sérum salé hypertonique ou de l'eau oxygénée (Saad et al. 1983). Cette première phase de

destruction parasitaire est suivie par l'ablation du kyste et la resection du dôme saillant, ou par une périkystectomie qui peut être soit partielle ou totale (Sastre et al. 1990, Mzabi & Dziri 1990).

En dépit du perfectionnement des méthodes du traitement chirurgical, les risques de récurrences locales ou encore la dissémination secondaire des protoscolexes ne sont pas négligeables. Pour cette raison, diverses recherches ont été menées dans le but de disposer d'une chimiothérapie efficace.

3. Chimiothérapie

Différents essais expérimentaux effectués *in vivo* chez l'animal (rongeurs) ou *in vitro*, ont montré que certains dérivés des benzimidazoles, en particulier le mébendazole et le flubendazole, inhibent la croissance larvaire des protoscolexes. Les travaux de Heath et al. (1975, 1978) ont mis en évidence l'effet létal du mébendazole sur les kystes secondaires intrapéritonéaux chez la souris. Ces drogues agissent au niveau des microtubules des cellules parasites détruisant ainsi la membrane germinative du kyste (Rubino et al. 1983, Swiderski 1985). La mise au point de la culture *in vitro* de la larve d' *E. granulosus* (Fiori et al. 1981, Rogan et al. 1986) a contribué largement à l'étude de l'activité létale de plusieurs drogues. Malgré leur efficacité chez les rongeurs, l'effet de ces drogues sur la survie des larves chez les ovins ne s'est avéré que partiel (Witassek et al. 1981).

Chez l'homme, la chimiothérapie n'est préconisée que pour compléter l'exérèse chirurgicale, ou dans des cas très graves (echinococcose secondaire, kyste fissuré ou rompu) où l'intervention chirurgicale est délicate. Cependant, Bekhti et al. 1977, ont montré l'efficacité du mébendazole chez l'homme dans le cas d'hydatidose primaire.

L'amélioration du tableau clinique paraît plus évident lorsque les kystes sont jeunes (Davis et al. 1986).

Il semble donc aujourd'hui qu'en dehors des travaux prospectifs contrôlés, le traitement médical curatif du kyste hydatique reste décevant.

Comme nous l'avons mentionné, l'éducation sanitaire, visant à interrompre le cycle parasitaire, est souvent difficile à mettre en place, particulièrement pour les populations s'attachant fortement à ses traditions socio-culturelles. Les progrès accomplis dans l'immunoprophylaxie de certaines parasitoses, comme la schistosomiase (Capron et al. 1987) ou la cysticercose (Johnson et al. 1989), laisse penser qu'une stratégie vaccinale représenterait le moyen le plus radical pour la prévention de l'hydatidose.

La compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la défense de l'organisme contre l'établissement de la larve d' *E. granulosus* constitue, pour cet objectif, une étape primordiale.

II. IMMUNITE A *E. GRANULOSUS*

A la différence des autres helminthiases (shistosomiase, cysticercose,...), les mécanismes immunitaires impliqués dans l'hydatidose sont mal connus; pourtant, leur rôle central dans la transmission du parasite a été particulièrement évoqué chez les hôtes intermédiaires (Gemmel 1976, 1978). Cela n'est dû ni à la négligence des chercheurs ni au manque d'intérêt pour cette parasitose; mais tout simplement à la difficulté, d'une part, de disposer d'un modèle expérimental animal au laboratoire, et d'autre part, de standardiser la culture *in vitro* de la larve du parasite. Pour ces raisons, les chercheurs se sont plutôt intéressés à l'infection naturelle des rongeurs par le parasite cestode *Taenia taeniaeformis*, comme modèle d'étude de l'immunité développé lors de l'invasion et l'installation de la larve parasitaire.

En dépit des problèmes d'extrapolation des observations faites sur ces modèles à d'autres parasitoses comme l'hydatidose, de telles études ont contribué de façon significative à l'optimisation de la stratégie de vaccination contre les *Taenias* cestodes et à la compréhension des mécanismes de la réponse immunitaire, utilisée souvent comme critère pour le diagnostic.

A. Immunité naturelle à l'infection

La résistance naturelle à l'infection par les larves de cestodes joue un rôle central dans l'épidémiologie de l'infection naturelle. Il est donc tout à fait important de tenir compte des mécanismes de défense naturelle lors de l'évaluation et l'interprétation des données de l'immunité acquise contre ces parasites. Des facteurs dus à l'hôte, comme l'espèce, l'âge, le sexe ou la différence d'infectivité entre les souches du parasite, ont été décrits comme responsables de la variabilité de la résistance naturelle à l'infection.

1. Facteurs de l'hôte

- **Age:** des expériences réalisées chez la souris par Schwabe et al. (1959) ont montré que la résistance à l'échinococcose secondaire, suite à l'infection par *E. granulosus*, augmente en fonction de l'âge. La même observation a été rapportée chez *E. multilocularis* (Kamiya 1972) et chez *T. taeniaeformis* (Dow & Jarret 1960, Turner & Mc Keever 1976, Mitchell et al. 1977). Bien que l'hydatidose humaine soit fréquemment observée chez la population infantile, Beard (1978) conclut, après dix ans d'études sur l'incidence de la maladie en Tasmanie (Australie), que les adultes sont relativement susceptibles.

- **sexe:** Dans le modèle des rongeurs, ce facteur semble lier à la souche de souris utilisée pour l'infection. Ces observations ont été faites pour *E. multilocularis* (Yamashita et al. 1963) et pour *T. taeniaeformis* (Mitchell et al. 1977).

- **Espèce de l'hôte:** l'étude de l'échinococcose secondaire chez trois espèces de souris a montré une différence de susceptibilité à *E. granulosus* (Pennoit-De Cooman & De Rycke 1970).

2. Différence de l'infectivité des différentes souches d'*E. granulosus*.

Comme nous l'avons souligné (page 21), différentes "souches" d'*E. granulosus* ont été repertoriés. Leur identité paraît lier à une espèce-hôte bien déterminée. Cependant, Cook (1989) a soulevé récemment une polémique, en Grande-Bretagne, en concluant après treize années d'expériences (de 1965 à 1978) sur la transmission d'*E. granulosus* dans

différentes espèces, qu'il n'existe qu'une forme d' *E. granulosus* capable d'infecter aussi bien le cheval, le mouton et l'homme. Ces observations ont été contredites par Mc Manus et al. (1989) qui ont mis en évidence la divergence génétique d'au moins deux souches d' *E. granulosus* en Grande-Bretagne. Des évidences épidémiologiques indiquent que des souches d' *E. granulosus* infectant soit le cheval, soit le mouton, sont maintenus dans deux cycles biologiques indépendants, sous des conditions tout à fait naturelles.

3. Mécanismes de la résistance naturelle.

Ces mécanismes, peu décrits, sont probablement liés à des facteurs physiologiques et anatomiques. En effet, la susceptibilité à l'infection pourrait être due à la présence, ou non, d'une activité enzymatique protéolytique qui permet l'éclosion de l'embryon au niveau du tube digestif (Weinmann 1970). De même, la composition de la bile semble avoir une grande influence sur la survie des protoscolexes d' *E. granulosus* (Smyth & Haeselwood 1963). Des barrières anatomiques peuvent empêcher l'installation de la larve. En effet, il a été montré qu'une grande proportion d'embryons (oncosphères) de certains cestodes ne franchissent pas la barrière intestinale des animaux naturellement résistants (Heath 1971, Turner & Mc Keever 1976).

L'implication des mécanismes de défense immunitaire non spécifique peut jouer un rôle dans l'établissement ou non de la larve. Thompson (1976) a rapporté que l'injection du BCG (Bacille Camille Guerin) stimule une protection significative des gerbilles contre l'infection par *E. granulosus*. Cela pourrait s'expliquer par la stimulation d'une défense cellulaire non spécifique (ex: les macrophages) ou l'installation rapide d'une réponse immunitaire spécifique (Mitchell et al. 1980).

B. Immunité acquise à l'infection

Les hôtes intermédiaires, susceptibles à l'infection par les larves des cestodes, manifestent généralement une immunité acquise à la réinfection (Gemmel & Soulsby 1968, Gemmel & Mc Namara 1972, Gemmel 1972, Gemmel & Johnston 1977). L'hôte infesté développe des mécanismes immunitaires qui assurent sa résistance à la réinfection par le même parasite, tout en étant incapable de se débarrasser des larves établies lors de la première infection. Ce phénomène, connu sous le nom d'immunité concomitante, a été décrit chez les schistosomes (Smithers & Terry 1969, Capron & Dessaint 1985, Dissous & Capron 1983) et chez de nombreux cestodes (Williams 1979, Flisser et al. 1979). Cette réponse immunitaire de l'hôte, qui vise la destruction du parasite, peut être aussi bien humorale que cellulaire. Afin de mieux comprendre l'efficacité de ces mécanismes immunitaires, il est important de les considérer en fonction de l'étape d'infection (Rickard & Williams 1982). On distingue en effet deux phases dans l'infection: une phase d'établissement de l'infection ou "pré-enkystement" et une phase de survie de la larve déjà établie ou "post-enkystement".

1. Immunité dirigée contre la phase d'établissement de l'infection (Pré-enkystement).

Le phénomène d'enkystement de la larve constitue une véritable barrière qui défend le parasite contre toute attaque immunitaire de l'hôte. Ainsi, le sort de l'infection dépend particulièrement de la nature et de l'efficacité des mécanismes immunitaires actifs au cours de la phase qui précède l'enkystement de la larve.

Ce stade a été exclusivement étudié dans le modèle d'infection des rongeurs par des oeufs du *Taenia taeniaeformis* chez le rat (Mitchell et al. 1980).

1.1. Immunité humorale.

Plusieurs auteurs ont rapporté le rôle central de la réponse anticorps dans l'immunité acquise contre l'établissement des larves des taeniidés (Flisser et al. 1979, Williams 1979, Mitchell et al. 1980). Le transfert passif des sérums immuns d'animaux infectés confère une bonne protection contre l'installation de la larve. Heath & Lawrence (1981) ont montré la lyse, *in vitro*, des oncosphères d' *E. granulosus* par un sérum immun de souris infectées par le même parasite. Cet effet létal est moindre si le sérum immun est chauffé, ce qui suggère l'implication du complément dans le processus de destruction du parasite. Musoke & Williams (1975a) ont souligné l'implication des anticorps (IgG2a chez le rat et IgG1 chez la souris) fixant le complément dans l'activité protectrice du serum immun.

Ces mêmes auteurs ont rapporté que les anticorps de classe IgA sont particulièrement efficaces contre l'établissement de la larve du *T. taeniaeformis* chez la souris et le rat. Ces anticorps sécrétés au niveau de l'intestin (IgA sécrétoires), agissent en empêchant probablement le passage des oncosphères à travers la barrière intestinale (Lloyd & Soulsby 1978).

L'infection par les parasites helminthes s'accompagne souvent d'une forte réponse anticorps de classe IgE. Chez les cestodes, Leid & Williams (1974, 1975) ont mis en évidence une importante réponse IgE dans le sérum du rat infecté par *T. taeniaeformis*. La présence de ces anticorps augmente le degré de protection des rats lors des expériences du transfert passif du sérum. Ces travaux, supportés par d'autres chercheurs (Musoke

& Williams 1975a, Musoke et al. 1978), suggèrent que les anticorps IgE pourraient augmenter la perméabilité vasculaire au niveau du site de l'infection, en stimulant la dégranulation des cellules mastocytaires et la libération des amines vasoactives. Cela faciliterait l'accessibilité des anticorps, en particulier de classe IgG_{2a}, et la destruction de la larve. De la même façon, des anticorps IgG₁ peuvent sensibiliser les mastocytes chez la souris infectée par *T. taeniaeformis* (Mitchell et al. 1980). Néanmoins, l'effet direct des amines vasoactives (histamines) sur les oncosphères n'est pas exclu (Musoke et al. 1978).

Les anticorps IgE pourraient être impliqués dans l'adhérence spécifique des macrophages au parasite; ce phénomène ayant été démontré pour la première fois chez le parasite trématode *Schistosoma mansoni* (Capron et al. 1975a).

1.2. Immunité cellulaire.

La cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps, vis à vis des parasites, a été parfaitement décrite dans la schistosomiase (Capron & Dessaint 1985). Des cellules comme les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes, sont capables de tuer les schistosomules de *S. mansoni* en présence des anticorps anaphylactiques: IgG_{2a} et IgE (Capron et al. 1978, Butterworth et al. 1980, Joseph 1982, Joseph et al. 1983). Malgré la grande infiltration de ces cellules autour de la larve des cestodes au niveau des tissus, leur rôle direct dans la destruction des oncosphères, via les anticorps, n'a pas été clairement démontré (Ansari & Williams 1976, Ali-Khan & Siboo 1980a, Riley & Dixon 1987). Heath & Pavlof (1975) et Ansari et al. (1976) ont observé une accumulation d'éosinophiles autour des larves mortes de *T. taeniaeformis*, chez des rats immunisés par transfert passif d'un sérum enrichi d'anticorps IgG_{2a} et IgE. Dumon et al.

(1976) ont montré que des leucocytes du sang périphérique de patients, atteints d'hydatidose, adhèrent à la surface des protoscolaxes *in vitro*.

L'immunité à médiation cellulaire, ne faisant pas intervenir d'anticorps, a été particulièrement étudiée pour les macrophages. Baron & Tanner (1977) ont montré que des macrophages normaux de souris sont capables de tuer des protoscolaxes d' *E. granulosus* et d' *E. multilocularis* *in vitro*. Cet effet protoscolicide augmente durant l'infection. Jenkins et al. (1990) ont rapporté récemment que l'activité protoscolicide des macrophages est régulée par des lymphokines (interferon γ).

En conclusion, plusieurs investigations, visant à améliorer la stratégie vaccinale vis à vis des cestodes, indiquent l'intérêt de l'immunisation orale pour la prévention de l'établissement de la larve (Lloyd 1979, Ayuya & Williams 1979, Rickard et al. 1981). Les mécanismes d'immunité cellulaire et humorale (IgA) jouent probablement un rôle essentiel au niveau de la barrière intestinale.

2. Immunité vis à vis des métacestodes établies (Post-enkystement)

La plupart des recherches effectuées sur l'immunité à l'infection est réalisée sur des animaux (souris généralement), auxquels on a transplanté par voie intrapéritonéale des larves matures (métacestodes). Ce mode d'infection est souvent utilisé pour maintenir la survie du parasite, sans passer par l'infection induite oralement par des oeufs. L'intérêt de ce cycle "tronqué" réside dans le fait qu'il permet d'étudier sélectivement la prolifération larvaire, cause principale de la pathologie chez l'homme et chez l'animal. Les larves établies semblent stimuler une immunité

différente de celle observée dans la phase précoce de l'infection. Le mécanisme de défense cellulaire est la principale stratégie adoptée vis à vis des larves.

2.1. Rôle des anticorps.

Le rôle protecteur des anticorps dans l'immunité vis à vis des métacestodes établis n'a pas été clairement démontré. Les travaux d'Ali-Khan (1974) soulignent que les anticorps seuls n'ont aucun effet sur la larve d' *E. multilocularis* développée chez la souris. La même conclusion a été faite avec *T. taeniaeformis* chez le rat (Musoke & Williams 1976). Chez l'homme, Varela-Diaz & Marchevsky (1973) ont montré, dans une expérience considérée comme un "traitement biologique", que des anticorps présents dans les sérums de patients ayant reçu le liquide hydatique n'avaient, de la même manière, aucun effet sur les kystes d' *E. granulosus*.

Le rôle des anticorps et du complément dans la lyse des protoscolexes d' *E. granulosus* et *E. multilocularis* (Head 1976, Rickard et al. 1977), semble peu évident sur les larves établies (Murrel 1971, Hustead & Williams 1977). Même si les anticorps peuvent traverser les membranes du kyste, ils sont présents en trop faible quantité dans le liquide hydatique pour avoir un effet sur les protoscolexes (Varela-Diaz & Coltorti 1972, 1973, Willms & Arcos 1977, Kwa & Liew 1978).

2.2. Immunité cellulaire

Des expériences de thymectomie néonatale, ou des traitements de souris par un sérum anti-thymocyte avant leur infection par *E. multilocularis*, favorisent la dissémination du parasite (Baron & Tanner

1976). De même, on a pu montrer, *in vitro*, la réactivité des lymphocytes de patients atteints d' *E. multilocularis* vis à vis des antigènes d'*Echinococcus* (Bresson-Hadni 1989, Vuitton et al. 1984, 1988). Cela suggère la participation directe ou indirecte des cellules T dans les mécanismes immunitaires impliqués dans la défense de l'organisme (Araj et al. 1977). Plusieurs études ont montré, aussi bien chez l'homme que chez l'animal, que l'infiltration des cellules, comme les lymphocytes T, les macrophages et les éosinophiles, autour de la larve, est responsable de lésions tissulaires caractéristiques de la pathologie des larves des cestodes (Ali-Khan 1978a, Vuitton et al. 1989).

Ces études, basées essentiellement sur des expériences immunocytochimiques, restent descriptives et ne démontrent pas le rôle de ces cellules dans l'immunité protectrice. Cependant, quelques travaux réalisés sur l'échinococcose alvéolaire, chez la souris, ont suggéré le rôle protoscolicide des macrophages dans le contrôle de la dissémination du parasite (Rau & Tanner 1976, Baron & Tanner 1977). Les macrophages et les neutrophiles adhèrent rapidement aux larves d' *E. multilocularis* ou de *T. taeniaeformis*, *in vitro*. Ce phénomène est facilité par la présence d'un sérum immun, ce qui n'exclut pas le rôle des anticorps dans cette adhérence (Ali-Khan & Siboo 1980b, Engelkirk et al. 1981). La présence massive des éosinophiles et des mastocytes autour des larves de plusieurs cestodes, suppose probablement le rôle clé de ces cellules dans la destruction des larves, comme il a été décrit pour les schistosomules de *S. mansoni* (Butterworth et al. 1980, Capron et al. 1978, 1981).

Plusieurs aspects de la réponse immune vis à vis des larves métacestodes restent à démontrer. Pour cela, il est important de développer les méthodes de culture *in vitro* de ces larves, et de déterminer des critères quantitatifs pour évaluer le degré des dommages

éventuels causés par l'attaque immunitaire de l'hôte.

Malgré ces différents processus immunitaires destinés à détruire et à éliminer le parasite, celui-ci parvient souvent à survivre. Cela mène à la notion que le parasite développe aussi ses stratégies de défense contre toute attaque immunitaire.

III. MECANISMES D'EVASION

Le succès de la transmission des taenias cestodes dépend, d'une part, de l'évolution et du maintien de la chaîne prédatrice entre l'hôte intermédiaire et l'hôte définitif, et d'autre part, de la survie du stade larvaire dans les tissus parasités. Des stratégies et des leurres peuvent alors être développés par le parasite pour assurer sa pérennité.

A. Acquisition des antigènes de l'hôte et mimétisme moléculaire

Le liquide hydatique contient, en plus des produits métaboliques du parasite, différents composants de l'hôte qui réussissent à franchir les membranes du kyste.

Des antigènes du groupe sanguin ayant une activité P1 ont été retrouvés associés à des antigènes parasitaires (Cameron & Staveley 1957, Feizi & Kabat 1972, Cossey et al. 1979). Même si leur présence à la surface du parasite n'a pas été encore étudiée, leur rôle réel dans un mécanisme d'échappement de la réponse immune ne peut être exclu.

L'acquisition des anticorps de l'hôte est le processus le plus connu qui permet au parasite de masquer ses antigènes de surface (Varela-Diaz et al. 1972, Rickard 1974).

L'hypothèse du mimétisme moléculaire (Damian 1964, 1979) a été avancée pour expliquer que les protoscolexes étaient capables de synthétiser des molécules immunoglobuline-like. Williams et al. (1980) ont rapporté que des anticorps anti-immunoglobulines humaines immunoprécipitaient des produits de traduction de l'ARN du parasite. Ces résultats n'ont pu être confirmés, suggérant alors la possibilité de la contamination de l'ARN parasitaire par celui de l'hôte (Mc Manus & Lamsam 1990).

Le support moléculaire du mimétisme moléculaire a été récemment apporté par Lightowlers et al. (1989a). Ces auteurs ont identifié et cloné un gène d' *E. granulosus* ayant 70% d'homologie avec la cyclophiline humaine, connue pour interagir avec la cyclosporine A et induire un effet suppresseur de l'immunité de l'hôte (Takahashi et al. 1989).

B. Enkystement

L'enkystement des larves parasites est le moyen le plus redoutable qui les protège contre toute attaque immunitaire. La membrane lamellaire anhiste du kyste constitue une véritable barrière qui empêche l'infiltration des cellules de l'hôte protégeant ainsi la membrane prolifère du parasite. La destruction de ces membranes, suite à une chimiothérapie, favorise l'accès des cellules inflammatoires aux protoscolexes (Verheyen & al. 1978, Musoke & Williams 1976).

Le site d'établissement des larves semble contribuer à l'échappement du parasite d'une éventuelle attaque immunitaire. Les kystes cérébraux, osseux et les kystes hyalins localisés au niveau des poumons sont souvent accompagnés d'une faible réponse immunitaire de l'hôte, due à une faible stimulation antigénique parasite (Todorov et al. 1979a, b).

C. Interférence directe avec le système de défense de l'hôte

Un certain nombre d'observations laisse penser que la suppression de la réponse immune de l'hôte par le parasite pourrait assurer sa protection. Ce phénomène, bien décrit dans d'autres parasitoses, est peu documenté pour les larves des Taenias cestodes. Dans l'hydatidose pulmonaire

humaine, on note souvent l'absence d'une réactivité anticorps lors du sérodiagnostic (Todorov et al. 1979b).

L'analyse biologique du liquide hydatique a montré qu'il contient une substance capable de supprimer la réactivité lymphocytaire (Annen et al. 1980). La même observation a été faite dans d'autres modèles d'infection par des taenias (Ali-Khan 1978a, Good & Miller 1976, Leid 1977).

L'inhibition des enzymes de l'hôte, par le parasite, est connue comme le moyen le plus efficace protégeant les cestodes adultes contre une dégradation par les sécrétions intestinales (Pappas & Read 1972, Matskazi & Juhasz 1977). Récemment, Shepherd et al. (1991) ont identifié parmi les antigènes du liquide hydatique une molécule qui possède une activité inhibitrice de protéases. Cette molécule est aussi capable d'inhiber le chimiotactisme des neutrophiles. La détermination de la séquence protéique de cette molécule a révélé sa faible homologie avec l' α -1antitrypsine.

**IV. LES ANTIGENES MAJEURS DU
LIQUIDE HYDATIQUE**

Le liquide hydatique prélevé chez l'homme ou l'animal, a fait l'objet de plusieurs investigations biochimiques et immunologiques. Il est constitué d'antigènes parasitaires issus de la sécrétion des protoscolexes et de nombreuses molécules de l'hôte, capables de franchir les membranes du kyste. Des taux importants d'albumine (Coudoumis & Polydorides 1936, Kagan 1961) et d'immunoglobulines (Coltorti & Varela-Diaz 1972, 1974, Hustead & Williams 1977, Frayha & Haddad 1980, Vidor et al. 1987) ont été retrouvés dans des échantillons de liquide hydatique, prélevés chez différents organismes. D'autres composants ont été trouvés à des quantités très faibles: des acides aminés (Krvavica et al. 1959, Sanchez & Sanchez 1971, Boudah et al. 1988), des acides nucléiques, des carbohydrates, des lipides (Frayha & Haddad 1980) et des enzymes (Mc Manus & Smyth 1979).

De par sa richesse en produits de métabolisme parasitaire pouvant stimuler une réponse immunitaire de l'hôte, le liquide hydatique a été particulièrement étudié par la technique d'immunoélectrophorèse, en utilisant un sérum humain ou animal d'infection (Biguet et al. 1962, 1965; Norman et al. 1964, Chordi & Kagan 1965, Capron et al. 1968, Gottstein et al. 1987). Deux antigènes majeurs, distincts par leur propriété électrophorétique, ont été les mieux caractérisés: l'antigène 5 et l'antigène B.

A. L'antigène 5

Depuis son identification par Capron et al. (1967, 1970) comme immunogène marqueur de l'infection par *E. granulosus*, l'antigène 5 (désigné ainsi pour sa position vis à vis des autres précipitines observées en immunoélectrophorèse) a été étudié par plusieurs auteurs qui ont tenté sa caractérisation immunochimique.

Sa purification par gel filtration a permis de montrer que son poids moléculaire est d'environ 60 kDa, et que plusieurs molécules peuvent s'associer de façon non covalente, donnant un complexe antigénique d'environ 400 kDa (Bout et al. 1974, Oriol et al. 1971, Oriol & Oriol 1975, Pozzuoli et al. 1972, 1975, Dottorini & Tassi 1977).

Dans des conditions réductrices, cet antigène se dissocie en deux sous-unités de 37-38 et 20-22 kDa (Di-Felice et al. 1986, Lightowlers et al. 1989b, Chamekh et al. 1990). L'analyse qualitative de sa composition biochimique a révélé sa nature glycolipoprotéique (Hamrioui et al. 1980a).

L'antigène 5 est thermolabile, capable de se fixer à la concanavaleine A, et possède une activité α et β carboxyl-estérasique (Bout et al. 1974, Oriol & Oriol 1975). Sa localisation a été précisée au niveau des cellules parenchymateuses des protoscolexes et à la partie interne de la membrane germinative (Yarzabal et al. 1976, Rickard et al. 1977a, Davies et al. 1978).

L'antigène 5 a été décrit par plusieurs auteurs sous des noms différents (Oriol et al. 1971, Williams et al. 1971, Piantelli et al. 1977, Pozzuoli et al. 1975). Cependant, la dénomination originale (antigène 5) est celle adoptée actuellement par la communauté scientifique internationale.

B. L'antigène B

Cet antigène, décrit par Oriol et al (1971), est dix fois plus représenté que l'antigène 5 dans le liquide hydatique. C'est une lipoprotéine de poids moléculaire voisin de 150 kDa (Oriol & Oriol 1975), formée de plusieurs molécules de 8 à 32 kDa associées de façon non covalente (Piantelli et al. 1977). Lightowlers et al (1989b) ont caractérisé récemment cet antigène par un anticorps monoclonal, et ont montré qu'il est formé de plusieurs molécules de 8, 16, 24 et 32 kDa, qui pourraient toutes dériver du même monomère de 8 kDa.

A la différence de l'antigène 5, il est thermorésistant et moins immunogène. On le retrouve dans le cytoplasme des cellules du tégument des protoscolexes et dans la membrane cuticulaire (Yarzabal et al. 1977b, Rickard et al. 1977a, Davies et al. 1978). Cet antigène est commun à d'autres parasites helminthes comme *S. mansoni*, *Fasciola hepatica*, *E. multilocularis* et d'autres taenias, ce qui réduit sa valeur diagnostique (Merioua et al. 1982, Rickard & Lightowers 1986, Lightowers et al. 1989).

Récemment, le clonage moléculaire d'une des sous unités de l'antigène B a révélé son homologie avec l' α -1 antitrypsine et donc son rôle éventuel dans la protection du parasite contre l'attaque enzymatique de l'hôte (Shepherd et al. 1991).

**V. DIAGNOSTIC ET PRONOSTIC DE
L'HYDATIDOSE**

Le diagnostic de l'hydatidose s'effectue généralement sur des critères cliniques et biologiques.

A. Le diagnostic clinique

Les symptômes cliniques causés par l'établissement de la larve ne sont pas spécifiques. Ils dépendent de la localisation, du nombre, et de la taille des kystes. L'hydatidose est une maladie connue par sa latence clinique qui peut durer des années. Dans la majorité des cas, la maladie n'est dépistée qu'à l'occasion d'un examen systématique (méthodes radiologiques classiques) ou d'une complication (compression des organes voisins, choc anaphylactique dû à une fissuration des kystes).

1. Hydatidose hépatique

Etant le premier filtre viscéral rencontré par le parasite, le foie représente la localisation la plus fréquente du kyste hydatique (60%) (Gauthier et al. 1985). La latence clinique est de 10 à 15 ans. Certaines manifestations cliniques comme une douleur scapulaire, un subictère urticaire ou des dyspnées d'effort peuvent conduire le malade à des examens radiologiques: échographie ou tomodensitométrie. Ces techniques d'imagerie médicale peuvent révéler une tumeur hépatique. Les complications sont inéluctables et peuvent prendre différentes formes:

- L'ouverture du kyste dans les voies biliaires (Testas & François 1983). Elle s'accompagne de la migration des vésicules filles dans la voie biliaire, donnant ainsi un ictère plus ou moins franc.
- La rupture du kyste , soit dans le thorax (Mzabi & Hambak 1978), soit

dans le péritoine. Cette rupture peut être brutale conduisant à une manifestaion allergique type urticaire, oedème de Quinke, choc anaphylactique, ou alors minime avec une évolution lente qui mène à une échinococcose secondaire du péritoine.

2. Hydatidose pulmonaire

C'est la deuxième forme fréquemment rencontr e (40%). Elle est souvent observ e chez l'enfant (Achour et al. 1988, Saade at al. 1983). Les manifestations cliniques comme des douleurs thoraciques, une toux ou des h mopt sies, sont peu caractéristiques. Une vomique d'un liquide "eau de roche" ou plus rarement de vésicules filles, est un signe de fissuration ou rupture d'un kyste pulmonaire. Celui-ci peut entrainer la compression des bronches (Kilani et al. 1983). Les complications sont les mêmes que pour le foie. La radiotomodensitom trie et l'échographie sont souvent utilis es pour visualiser les kystes rompus.

3. Autres localisations

Les protoscolexes peuvent être acheminés, par la grande circulation, à d'autres organes comme le coeur, le cerveau, les reins, les os...

- **L'hydatidose cardiaque** (0,5 à 2%): elle est associ e à d'autres localisations viscérales dans 35% des cas (Ben-Ismael et al. 1977). Il n'existe pas de tableau clinique caractéristique du kyste hydatique du coeur.

- **L'hydatidose intracrânienne** (1 à 4%): elle est souvent rencontr e chez l'enfant, accompagn e d'une hypertension intracrânienne.

- **L'hydatidose osseuse (2%)**: elle se rencontre surtout chez l'adulte. Le rachis et le bassin sont les plus fréquemment atteints (Zlitni & Kassab 1981). La larve ne s'enkyste pas. Elle progresse de façon anarchique par prolifération vésiculaire diffuse. Cette localisation ne présente pas de signes cliniques spécifiques.

- **L'hydatidose rénale (5%)**: la sémiologie clinique est faite le plus souvent de signes urinaires banals; seule l'hydaturie est caractéristique (Saad et al. 1990).

Même s'il n'est pas infecté, le rein peut être le siège d'une néphropathie causée par le dépôt d'immuns complexes circulants. Ce phénomène s'observe souvent dans l'hydatidose pulmonaire (Pini et al. 1983).

La découverte du kyste hydatique est généralement fortuite en absence de signes caractéristiques. L'examen radiologique est accompagné d'un diagnostic immunologique qui confirme, dans la majorité des cas, l'échinococcose hydatique (Mlika et al. 1986).

B. Le diagnostic immunologique

C'est le diagnostic biologique le plus couramment utilisé dans l'hydatidose. L'hyperéosinophilie n'est observée qu'en cas de fissuration du kyste.

1. Exploration de la réponse anticorps

Comme nous l'avons rappelé dans le chapitre consacré aux mécanismes immunitaires, la réponse anticorps joue un rôle important

dans l'immunité acquise contre l'établissement des larves d' *Echinococcus*. Durant leur migration vers le site d'établissement, les protoscolexes induisent une réponse anticorps spécifique. Cette stimulation est maintenue par la diffusion permanente d'antigènes parasitaires à travers la paroi du kyste (Capron et al. 1970). Bien que l'activation polyclonale des cellules B, par les antigènes de protoscolexes, a été observée chez la souris (Cox et al. 1989), l'hyperglobulinémie n'est pas courante dans l'hydatidose humaine (Moriarty 1968, Matossian et al. 1972, 1976).

Pour l'immunodiagnostic de l'hydatidose, c'est le liquide hydatique qui est utilisé comme source d'antigènes dans les différents tests sérologiques visant à détecter des anticorps spécifiques.

1.1. Intérêt de l'antigène 5 dans l'immunodiagnostic.

Le diagnostic immunologique de l'hydatidose a connu un progrès considérable, grâce aux travaux conduits dans les années soixante, par Biguet et Capron (Biguet et al. 1962, Capron et al. 1968). En utilisant des sérums hyperimmuns dirigés contre différentes préparations antigéniques d'helminthes, ces auteurs ont comparé et analysé les constituants antigéniques communs et spécifiques de différents parasites. Dans *E. granulosus*, la précipitation d'un arc, désigné arc 5, s'est révélée spécifique de cette espèce. Cet antigène est reconnu de façon précoce et continue par une grande proportion de sérums de patients atteints d'hydatidose (Capron et al. 1967, 1970).

D'autres travaux ont confirmé par la suite l'intérêt diagnostique de l'antigène 5 en immunoélectrophorèse (Varela-Diaz et al. 1975, 1976). La production d'un sérum hyperimmun anti-arc 5, ainsi que la purification de cet antigène par Bout et al. (1974), ont permis l'amélioration de la sensibilité du diagnostic (Farag et al. 1975, Bout et al. 1979).

Chez l'animal, les anticorps précipitant l'antigène 5 sont les premiers anticorps qui apparaissent dans les sérums de souris infectées par des oeufs d' *E. granulosus* (Torres-Rodriguez & Wisnivesky 1978). De même, des moutons infectés par ce parasite reconnaissent cet antigène (Yong et al. 1978, Yong & Heath 1979, Conder et al. 1980).

Même si elle ne permet qu'une étude qualitative, l'immunoélectrophorèse reste, par sa simplicité, la méthode de référence pour toute étude épidémiologique, particulièrement dans les zones rurales où les laboratoires sont moins équipés. Cette technique tend à être remplacée par une autre méthode plus rapide d'immunoprécipitation sur acétate de cellulose: l'électrosynérèse.

1.2. Techniques sérologiques

Parallèlement à l'immunoélectrophorèse, d'autres méthodes sérologiques ont été utilisées dans le diagnostic de l'hydatidose. Les résultats dépendent essentiellement de la qualité de l'antigène utilisé.

- **Immunofluorescence indirecte:** elle fait appel à des antigènes figurés (protoscolexes ou coupes de protoscolexes) qui ont l'avantage d'être de qualité constante (Coudert et al. 1967, Capron et al. 1970, Ambroise-Thomas 1976). C'est une méthode particulièrement sensible dans les localisations hépatiques.

- **Réactions d'hémagglutination:** L'antigène soluble est fixé grâce à la glutaraldéhyde à des hématies formolées de mouton. C'est une méthode très utilisée en association avec l'immunoélectrophorèse (Garabedian et al 1957, Varela-Diaz et al. 1975, Wattré et al. 1980).

- **Réactions immunoenzymatiques:** La réaction d'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est très connue pour sa grande sensibilité. Elle ne nécessite qu'une très faible quantité d'antigènes (de l'ordre du ng). L'utilisation de l'antigène total entraîne une forte réactivité croisée, alors que l'antigène 5 purifié confère une grande spécificité à cette méthode (Farag et al. 1975, Capron et al. 1975b, Carlier et al. 1979, Matossian et al. 1979, Iacona et al. 1980). Le système Avidine-Biotine a été aussi utilisé pour amplifier la sensibilité de l'ELISA (Zhanqing et al. 1980).

A côté de ces techniques sérologiques, il existe d'autres méthodes qui sont beaucoup moins utilisées à l'heure actuelle: la réaction de fixation du complément (Lass et al. 1973, Matossian & Araj 1975) et le test radioimmunologique (RIA) (Musiani et al. 1974, Dessaint et al. 1975, Matossian 1981, Sampio Silva et al. 1989).

Si toutes ces techniques présentent des avantages non négligeables, elles ont, cependant, un inconvénient majeur: le manque de spécificité dû à la nature du liquide hydatique utilisé dans le test du diagnostic.

1.3. Réponse anticorps et pronostic de l'hydatidose.

La réactivité sérologique d'un patient dépend de l'état pathologique du kyste hydatique. Les kystes intacts et hyalins sont généralement accompagnés d'une très faible réponse anticorps (Yarzabal et al. 1974, Coltorti & Varela-Diaz 1976). La détection et le dosage des différentes classes d'anticorps peuvent donner une idée sur le stade et l'évolution de l'infection.

1.3.1. Dosage des IgE

Comme dans les autres helminthiases, l'hydatidose est caractérisée par une forte réponse IgE. Dessaint et al. (1975) ont montré que des taux importants d'IgE spécifiques traduisent la viabilité et la fertilité du kyste hydatique. La perte de cette viabilité, suite à une chimiothérapie, s'accompagne d'une diminution de ces anticorps (Bekhti et al. 1977). De même, un taux élevé d'IgE plaide souvent en faveur de localisations multiples (Dessaint et al. 1975, Afferni et al. 1984, Candolfi et al. 1985). Certains auteurs ont noté une diminution rapide du taux d'IgE après un traitement chirurgical. La persistance de tels anticorps témoigne alors d'une récurrence (Candolfi et al. 1986, Wattal et al. 1986).

L'antigène 5 est un des allergènes majeurs du liquide hydatique (Dessaint et al. 1975, Bout et al. 1977). La détection des IgE spécifiques paraît tout à fait intéressante dans le suivi d'une chimiothérapie et la surveillance post-chirurgicale (Vervloet et al. 1976).

1.3.2. Dosage des IgG, IgA, IgM.

Après une intervention chirurgicale ou une chimiothérapie, il est important de suivre la réponse anticorps du malade pour s'assurer de l'efficacité ou non du traitement. Un test quantitatif des anticorps globaux ne fournit pas réellement de renseignements supplémentaires. La diminution des anticorps, après un traitement, est plus ou moins rapide et souvent très irrégulière pour constituer un critère absolu de guérison (Nozais et al. 1985). Cependant, leur persistance pendant longtemps indique une infection résiduelle (Matossian & Araj 1975, Varela-Diaz et al. 1976, Todorov et al. 1976).

Plusieurs auteurs ont souligné qu'un taux d'IgA spécifique supérieur

à celui des **IgG** est révélateur d'une localisation pulmonaire (Mary et al. 1983, Simpaio Silva et al. 1988). Aussi, lors des situations de récives, on note une augmentation des **IgA** et une diminution des **IgG** (Mary et al. 1983, Candolfi et al. 1985, Sampaio Silva et al. 1988); alors que les **IgM** sont fréquemment trouvés lors d'une maladie évolutive ou d'une fissuration du kyste (Craig 1986, Pinon et al. 1987).

2. Exploration de la réponse cellulaire.

L'importante infiltration granulomateuse, développée autour des lésions parasitaires, témoigne du rôle majeur de l'immunité à médiation cellulaire dans l'hydatidose. Malheureusement, cette immunité est très peu explorée dans le diagnostic sérologique.

2.1. Hypersensibilité immédiate (intradermoréaction de "Casoni").

La forte réponse **IgE**, associée à la rupture d'un kyste hydatique, est à l'origine de manifestations de type allergie immédiate dont le choc anaphylactique est la forme la plus grave. La dissémination brutale des antigènes du liquide hydatique stimule fortement le système immunitaire, déjà sensibilisé aux antigènes parasitaires. Sur ce principe, l'injection intradermique d'un antigène hydatique met en évidence une allergie cutanée, dont l'importance dépend de la superficie de la réaction. Ce test, décrit par Casoni en 1911, a été largement utilisé comme technique rapide du dépistage de l'hydatidose (Kagan et al. 1966, Yarzabal et al. 1975, Capron et al. 1976, Shenone et al. 1976). Cependant, cette technique souffre d'une forte réactivité croisée avec d'autres infections, ce qui a mis en cause sa réelle valeur diagnostique par rapport à d'autres méthodes

(Cherubin 1969, Schantz et al. 1975, Varela-Diaz et al. 1976).

La réaction reste positive même après le succès d'une intervention chirurgicale, réduisant ainsi l'aspect pronostic de ce test (Todorov et al. 1976). Toutefois, la qualité des résultats dépend de la spécificité des antigènes utilisés (Williams 1972, Capron et al. 1976, Wattré et al. 1980).

2.2. Le test de dégranulation des basophiles

L'index de dégranulation des basophiles circulants en présence d'antigènes hydatiques, semble particulièrement intéressant dans la situation d'une faible réactivité anticorps (localisation pulmonaire). Ce test, très sensible, présente un grand intérêt dans la surveillance post-opératoire où sa positivité suggère une récurrence (Huguier et al. 1987, Vuitton et al. 1988).

2.3. Hypersensibilité retardée

Quelques travaux ont montré que des patients hydatiques présentent une hypersensibilité retardée aux antigènes d' *E. granulosus*. Ce test, réalisé soit *in vivo* par un test intradermique (Schenone et al. 1976), soit *in vitro* par un test de transformation lymphocytaire (Yusuf et al. 1976), n'a pas montré un intérêt diagnostique particulier. Cependant, l'évaluation d'une telle réponse cellulaire chez l'animal (Bresson-Hadni et al. 1986) ou chez l'homme (Bresson-Hadni et al. 1989) infecté par *E. multilocularis*, a montré son intérêt dans la confirmation du diagnostic.

3. Limites du diagnostic immunologique

Les techniques immunologiques ont largement contribué au diagnostic dans 80 à 85% des hydatidoses hépatiques, et 40 à 65% des localisations pulmonaires (Capron et al. 1970, Wattré et al. 1980, Ambroise-Thomas 1983, Rickard & Lightowers 1986). Il existe, néanmoins, plusieurs facteurs qui expliquent la défaillance de ces techniques sérologiques et les discordances des résultats obtenus par différents laboratoires.

3.1. Réactions faussement négatives

La séronégativité ne permet pas d'exclure le diagnostic de l'hydatidose. L'étude de ce phénomène, en fonction de la nature et l'évolution du kyste hydatique, a permis de dégager un certain nombre d'observations:

- des kystes non viables et non fertiles n'induisent que très peu ou pas d'anticorps. Plusieurs auteurs ont montré qu'une sérologie négative est associée souvent à la présence d'un kyste hyalin ou vieillissant (Coltorti & Varela-Diaz 1976, Schantz & Gottstein 1986, Rickard & Lightowers 1986).

- Le lieu d'établissement du kyste et la nature du parenchyme de l'organe parasité conditionnent la réponse anticorps chez les patients. Les localisations pulmonaires ou osseuses s'accompagnent d'un très faible stimulus antigénique et donc d'une sérologie négative (Kagan 1963, Kagan et al. 1966). L'hydatidose pulmonaire a fait l'objet d'une série de travaux, montrant le faible pourcentage de positivité des tests sérologiques par rapport à l'hydatidose hépatique (Kagan et al. 1966, Capron et al. 1970,

plusieurs laboratoires, est prélevé chez différents animaux domestiques dans les abattoirs (ovins, bovins, chevaux, chameaux,...). La qualité antigénique de ces liquides dépend de la viabilité et de la fertilité des kystes (Capron et al. 1970, Shantz & Gottstein 1986, Rickard & Lightowers 1986).

La comparaison de la composition antigénique du liquide hydatique, prélevé chez différents hôtes, a permis de noter une différence significative (Gottstein et al. 1987, Pezzela et al. 1984). Cette différence peut s'observer pour une même espèce animale d'origine différente (Thompson et al. 1984).

L'analyse de ces antigènes en gel de polyacrylamide-SDS, a souvent donné des résultats qui divergent sur la spécificité des antigènes hydatiques de différents poids moléculaires:

- Bout et al. (1974) ont défini l'antigène 5 comme une lipoprotéine de 60 kDa pouvant s'associer de façon non covalente pour former un complexe de 400 kDa.

- Piantelli et al. (1976) trouvent qu'en SDS-PAGE effectué dans des conditions non réductrices, l'antigène 5 a un poids moléculaire de 67 kDa qui se dissocie en deux sous unités de 47 et 20 kDa, dans des conditions réductrices.

- Di-Felice et al. (1985) ont purifié l'antigène 5 et l'ont décrit comme étant composé de deux molécules de 66 et 56 kDa. Dans des conditions réductrices, seule une molécule de 39 kDa a été retrouvée.

1975c, Laraki et al. 1971, Matossian & Araj 1975, Todorov et al. 1979b).

- L'occupation du site anticorps par un antigène circulant, et donc la formation d'immuns complexes, pourrait être à l'origine de la négativité de certains de tests sérologiques (Rickard-Lenoble et al. 1978). La recherche d'antigènes et d'immuns complexes spécifiques a été suggérée comme test complémentaire pour confirmer le diagnostic et le pronostic de l'hydatidose (Bekhti et al. 1977, D'Amelio et al. 1983, Craig & Nelson 1984, Craig 1986, Gottstein 1984, Candolfi et al. 1986). Les immuns complexes ont été trouvés principalement dans les infections pulmonaires, ce qui a amené Pini et al. (1983) à considérer leur présence comme facteur supplémentaire limitant l'accès à une réponse anticorps en sérologie.

- La virulence d' *E. granulosus* peut varier suivant la souche parasitaire. L'antigène 5 pourrait être plus ou moins exprimé suivant les sous-espèces (Thompson & Lymbery 1988).

- Les techniques d'immunoprécipitation sur gel, ou d'hémagglutination, sont les plus couramment utilisées dans le diagnostic. La présence d'anticorps spécifiques non précipitants ou non agglutinants (IgE et/ou IgA) peut alors fausser les résultats sérologiques.

3.2. Réactions faussement positives

En dépit de la grande sensibilité des techniques employées dans le diagnostic de l'hydatidose, les problèmes de spécificité restent l'élément le plus préoccupant. L'utilisation des antigènes totaux du liquide hydatique conduit souvent à des réactivités croisées avec d'autres helminthiases. La communauté antigénique entre les helminthes (Capron et al. 1968,

Larralde et al. 1989) et la variabilité des sources d'approvisionnement sont à l'origine des données discordantes de la sérologie.

L'utilisation des antigènes purifiés, en particulier l'antigène 5, améliore considérablement la spécificité des tests sérologiques (Williams et al. 1971, Bout et al. 1974, Farag et al. 1975). Cependant, la contamination de ces antigènes par des déterminants antigéniques de l'hôte, rend difficile le diagnostic sérologique.

3.2.1. Communauté antigénique des helminthes

Les parasites helminthes présentent plusieurs structures communes justifiant leur position taxonomique. Etant donné son accessibilité, les chercheurs se sont plus intéressés à analyser les antigènes du liquide hydatique que ceux extraits à partir des protoscolexes. Une telle étude a été amorcée, dans les années soixante, par plusieurs auteurs qui ont tous souligné la complexité antigénique du liquide hydatique, et le nombre important d'antigènes communs à d'autres extraits parasitaires (Biguet et al. 1962, 1965; Kagan & Norman 1961, 1963; Chordi & Kagan 1965; Capron et al. 1968).

La technique d'immunoélectrophorèse a eu le mérite d'apporter un élément nouveau dans le diagnostic de l'hydatidose, par la visualisation de l'arc 5 (Capron et al. 1970). Hormis dans cette méthode, l'utilisation des antigènes totaux dans d'autres tests qualitatifs, comme l'immunotransfert (Westernblot), confirme l'hétérogénéité et la multitude des antigènes révélés aussi bien par les sérums hydatiques que par d'autres sérums d'infection (Gottstein et al. 1987, Larrald et al. 1989).

Récemment, on a noté la présence de déterminants phosphorylcholine sur les antigènes du liquide hydatique, et particulièrement sur l'antigène 5 (Shepherd & Mc Manus 1987). La phosphorylcholine est un des haptènes

qui a une large distribution chez les helminthes (Pery et al. 1974). Les anticorps anti-phosphorylcholine, trouvés dans différents modèles d'infection (Crandall & Crandal 1971), peuvent être une source non négligeable de fausse positivité (Sheperd et al. 1987, Lightowers et al. 1989b).

3.2.2. Contamination par les antigènes de l'hôte.

Nous avons souligné auparavant la richesse du liquide hydatique en protéines de l'hôte. L'acquisition de telles protéines comme les immunoglobulines (Varela-Diaz & Coltorti 1972, 1973), ou certains composants glycaniques comme les antigènes érythrocytaires P1 (Cameron et al. 1957), pourrait être une stratégie adoptée par le parasite pour échapper à la réponse immune de l'hôte.

Des antigènes, ayant une activité P1, ont été caractérisés aussi bien dans le liquide hydatique qu'au niveau des membranes du kyste (Russi et al. 1974). Comme pour les autres antigènes définissant le groupe sanguin, des individus normaux ayant un phénotype P2, peuvent avoir des anticorps naturels anti-P1. Une telle situation peut entraîner des réactivités croisées avec les antigènes hydatiques P1-like. Ce phénomène a été observé dans le diagnostic sérologique de l'hydatidose et de la distomatose (Ben-Ismaïl 1978, 1979, 1980).

3.2.3. Variabilité des sources d'approvisionnement des antigènes.

La différence de la qualité de l'antigène utilisé dans un test sérologique est le problème majeur auquel est confronté le diagnostic immunologique de l'hydatidose. Le liquide hydatique, utilisé dans

- Shepherd & Mc Manus (1987) ont rapporté que des sous unités 12 et 16 kDa de l'antigène B sont spécifiques d' *E. granulosus*..

- Lightowers et al. (1989) ont montré, plus tard, que l'antigène B est formé d'une série de molécules de 8, 16, 24, 32, kDa qui pourraient toutes dériver de la même sous unité de 8 kDa, et qu'aucune de ces molécules n'est spécifique à *E. granulosus*.

- Maddison et al. (1989) ont mis en évidence la spécificité d'une molécule de 8 kDa dans la technique d'immunotransfert.

- Al-Yaman et Knobloch (1989) ont purifié une molécule de 20 kDa qui est reconnue spécifiquement en ELISA par des sérums humains hydatiques.

Ces données très discordantes de la littérature montrent le grand problème de travailler avec des antigènes non standardisés.

**APPORT DES OUTILS MOLECULAIRES
DANS LA STANDARDISATION DES
ANTIGENES**

La purification des antigènes parasitaires a permis d'améliorer la spécificité du diagnostic de l'hydatidose (Bout et al. 1974, Farag et al. 1975, Di-Felice et al. 1985). Cependant, la très faible quantité de ces antigènes produite après de lourdes techniques biochimiques ne permet pas son utilisation massive. La purification n'exclut pas la persistance des déterminants antigéniques non parasitaires, portés par les antigènes spécifiques (Ben-Ismaïl et al. 1980, Shepered et al. 1987). Il paraît donc nécessaire de disposer de quantités importantes d'antigènes purs et bien définis.

Pour les molécules de nature protéique, leur production par génie génétique et la définition de leur structure linéaire ou conformationnelle, constituent un outil de standardisation tout à fait intéressant.

A. Prévision des épitopes

Grâce à la performance des techniques de biologie moléculaire, les gènes d'une série de protéines parasitaires ont été clonés, et leurs séquences ont ainsi été déduites. Afin de prédire les épitopes impliqués dans une réponse humorale ou cellulaire, plusieurs facteurs liés aux propriétés physicochimiques de segments peptidiques sont pris en considération.

Les critères thermodynamiques (ex: l'hydrophilie) associés à des analyses statistiques, permettent de définir la probabilité de la présence à la surface, la mobilité et la flexibilité des différentes zones de la protéine et par conséquent, les parties les plus accessibles au système immunitaire.

Une autre stratégie, développée récemment par Geysen et al. (1987), consiste à synthétiser une série de peptides courts, décalés d'un acide aminé, et qui couvrent toute la séquence de la protéine (Pepscan Method). L'analyse de la réactivité de ces différents peptides permet d'identifier l'épitope impliqué dans la reconnaissance immunologique (Miles et al. 1989).

L'utilisation de ces méthodes a permis de montrer que des anticorps, dirigés contre une protéine native, sont capables de réagir avec un peptide dérivé de sa structure primaire. La conformation de ces peptides semble, toutefois, jouer un rôle important dans leur antigénicité et leur immunogénicité (Tainer et al. 1984, Rhodes et al. 1984, Gras-Masse et al. 1988).

B. Notion des épitopes conformationnels

La spécificité remarquable de la reconnaissance d'un déterminant antigénique (épitope) par un anticorps, repose sur ses caractéristiques structurales (Tainer et al. 1991). On distingue généralement deux types d'épitopes:

- **épitopes séquentiels** qui dépendent uniquement de la structure primaire continue.

- **épitopes conformationnels** qui sont liés à la structure secondaire ou tertiaire de la protéine. Ils peuvent être continus s'ils correspondent à des acides aminés contigus et arrangés dans l'espace, ou non continus s'ils correspondent à la juxtaposition spatiale des acides aminés non adjacents dans la structure primaire.

La méthode de Chou et Fasman, basée sur des paramètres établis sur 15 protéines de structure connue, est la plus couramment utilisée pour prédire la structure secondaire d'une protéine (Chou & Fasman 1974). On peut rencontrer deux types de conformations: Des feuillets β où le squelette peptidique change de direction ou bien des hélices α où la chaîne peptidique est organisée en hélice.

Une organisation hélicoïdale peut être mimée par des peptides synthétiques formés au moins de 13 résidus. Cette organisation confère une grande antigénicité et immunogénicité à ces peptides (Gras-Masse et al. 1988).

Malgré le nombre important d'antigènes parasitaires dont on connaît la séquence, très peu d'études ont été consacrées à l'analyse de leur structure secondaire et tertiaire. La comparaison des séquences protéiques est souvent effectuée par l'alignement linéaire des séquences primaires où le taux d'homologie doit être supérieur à 25% pour être significatif (Taylor et al. 1988). Pour tirer plus d'informations, Il est donc intéressant de comparer les structures secondaires prédites à partir de la séquence primaire.

3. Analyse de la répartition des résidus hydrophobes d'une protéine (Hydrophobic Cluster Analysis: HCA)

Cette méthode, décrite par l'équipe de Mornon (Gaboriaut et al. 1987), est basée sur l'analyse de la répartition en amas des résidus hydrophobes dans une représentation bidimensionnelle de la structure de la protéine.

La figure 4 nous montre un exemple de cette représentation qui offre des possibilités considérables pour la comparaison de différentes

structures protéiques (Lemesle-Varloot et al. 1990).

Elle permet de déterminer rapidement, suivant la répartition des résidus hydrophobes, la parenté d'une protéine à d'autres molécules de structure connue. De plus, elle présente l'avantage de mettre en évidence des homologues conformationnelles, particulièrement celles formées par la juxtaposition d'acides aminés normalement éloignés dans la structure primaire.

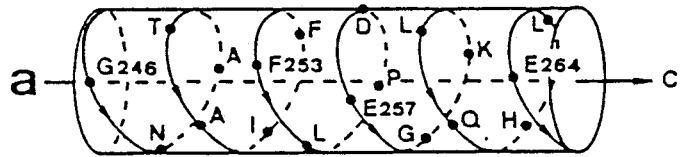
Nous avons signalé dans le chapitre "Limites du diagnostic" (p. 58), les difficultés majeures rencontrées lors de l'immunodiagnostic de l'hydatidose. Elles sont dues, en grande partie, à l'utilisation des différentes sources antigéniques et à l'importante contamination du liquide hydatique par des antigènes de l'hôte.

Nous avons essayé de contribuer à la définition et à la caractérisation moléculaire des déterminants antigéniques pouvant être utilisés comme antigène standard dans le diagnostic. Pour cela, nous avons appliqué divers outils moléculaires comme les anticorps monoclonaux, les protéines recombinantes produites par génie génétique, des peptides synthétiques ainsi que leur analyse structurale.

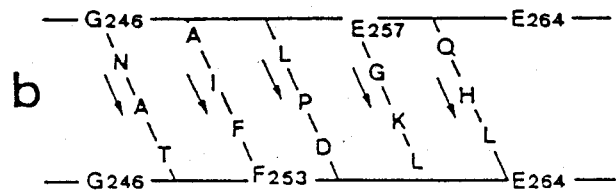
Figure 4. Exemple d'analyse de la répartition des résidus hydrophobes
(Hydrophobic Cluster Analysis: HCA) de la structure hélicoïdale d'une protéine:
 α -1 antitrypsine humaine
(D'après Lemesle-Varloot et al. 1990)

Séquence primaire: G N A T A I F F L P D E G K L Q H L E.....

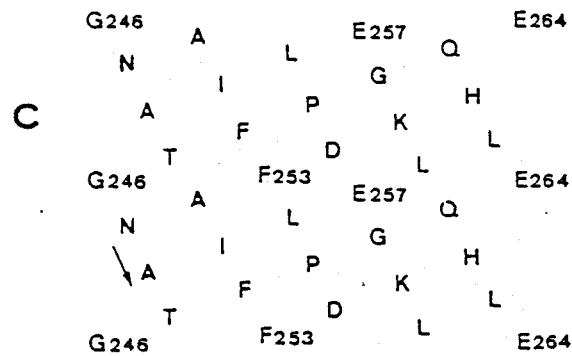
a. La séquence est représentée en hélice (3,6 résidus par tour) le long d'un cylindre. Après cinq tours, les résidus i et $i+18$ (ex: G246 et E264) ont une même position, parallèle à l'axe du cylindre.



b. Pour que la représentation en trois dimensions soit plus facile, le cylindre est coupé parallèlement à son axe (le long de la ligne G246 et E264) puis déroulé.



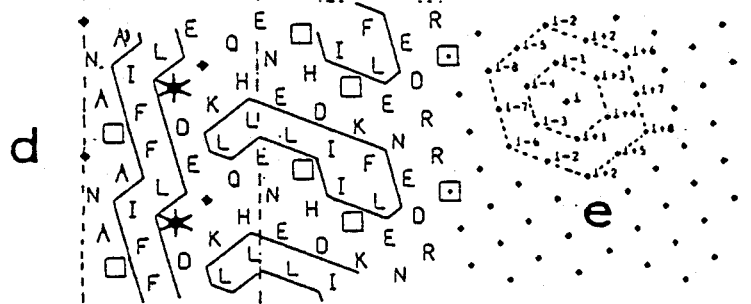
c. Comme certains acides aminés adjacents se trouvent maintenant séparer (ex: F253 et L254), cette représentation (b) est dupliquée de façon à restaurer la connection de chaque acide aminé.



d. Les résidus hydrophobes adjacents (VLIFMYW) sont alors entourés et nommés: regroupements hydrophobes (Hydrophobic Clusters).

e. Représentation donnant une idée sur la position d'un résidu i par rapport aux autres résidus dans l'espace.

Dans cette méthode, certains acides aminés sont représentés sous forme de symboles: T (□), P (✱), G (◆), D (◻).



TRAVAUX PERSONNELS

L'hydatidose est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé comme une des graves maladies parasitaires posant un grand problème de santé publique. La répartition cosmopolite d' *E. granulosus* et sa capacité d'infecter aussi bien l'homme que les animaux domestiques, font de cette parasitose un véritable fléau causant de lourdes pertes économiques (Gemmel et al. 1987).

Il est difficile, à l'heure actuelle, de disposer au laboratoire d'un modèle expérimental permettant de maintenir le cycle parasitaire et d'étudier les différents aspects biologiques et immunologiques de l'infection. De même, les études *in vitro* sont très limitées par la complexité de cultiver la larve d' *E. granulosus*. Ces raisons ont donc orienté la majorité des recherches vers des objectifs essentiellement médicaux.

L'intervention chirurgicale reste le traitement de choix, bien que certaines difficultés soient rencontrées lors des localisations multiples ou des fissurations de kystes; quant à la chimiothérapie, son efficacité ne paraît évidente que lorsque les kystes sont jeunes. Le diagnostic précoce de la maladie est donc décisif pour le choix d'un traitement.

Malgré la grande performance des méthodes radiologiques, le diagnostic clinique de l'hydatidose est souvent délicat à cause de la non spécificité des symptômes observés. Devant l'absence d'évidence parasitologique de l'infection, l'immunologie offre une image de marque en permettant d'orienter rapidement un diagnostic difficile.

Parmi les antigènes du liquide hydatique utilisé dans le diagnostic sérologique, l'antigène 5 est reconnu de façon précoce et spécifique par une grande proportion de patients atteints d'hydatidose (Capron et al.

1970). La précipitation de cet antigène en immunoélectrophorèse, est considérée comme la référence de base pour l'immunodiagnostic de l'hydatidose (Varela-Diaz et al. 1975, 1976). La valeur diagnostique de l'antigène 5 a été largement confirmée dans plusieurs études épidémiologiques et sa purification a permis d'améliorer la sensibilité du diagnostic dans des tests immunoenzymatiques (Farag et al. 1975, Bout et al. 1979).

Cependant, la caractérisation immunochimique des antigènes du liquide hydatique dans des tests plus sensibles, comme l'immunoprécipitation sur protéine A ou l'immunotransfert (Western Blot), a révélé des discordances sur la taille moléculaire et la spécificité des différents composants (Shepherd & Mc Manus 1987, Lightowers et al. 1989, Maddison et al. 1989, Al-Yaman & Knobloch). Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre "Limites du diagnostic", la variabilité de la source antigénique est à l'origine de résultats différents obtenus par plusieurs laboratoires. De plus, la contamination de ces antigènes par des déterminants de l'hôte entraîne une réactivité croisée avec d'autres infections parasitaires (Ben-Ismaïl et al. 1980, Shepherd & Mc Manus 1987). Ceci s'observe principalement dans des tests très sensibles tel que l'ELISA.

Devant la complexité de la nature biochimique de l'antigène 5 et sa grande immunogénicité, notre but a été d'étudier la spécificité épitopique de cet antigène et de caractériser les déterminants antigéniques de nature protéique qui pourraient être produits par génie génétique ou par des peptides synthétiques. Leur standardisation permettrait ainsi l'amélioration du diagnostic immunologique de l'hydatidose. Les résultats obtenus font l'objet de ce mémoire.

ARTICLE 1

Utilisation d'un anticorps monoclonal, spécifique d'un épitope protéique de l'antigène 5 d'*Echinococcus granulosus* , dans un test de compétition radioimmunologique pour le diagnostic de l'hydatidose.

Parmi plusieurs anticorps monoclonaux produits vis à vis des antigènes du liquide hydatique, nous avons sélectionné un anticorps de classe IgG₁ (EG 02 154/12) capable de précipiter l'antigène 5 dans un test d'immunoélectrophorèse.

- Nous avons analysé le profil antigénique, reconnu en immunotransfert (Western blot) et en immunoprécipitation (sur protéine A) par cet anticorps, en comparaison avec un groupe de sérums humains ne précipitant que l'antigène 5 en immunoélectrophorèse.

- Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que l'antigène 5 est formé d'une molécule d'environ 64 kDa pouvant se dissocier en deux sous unités de 37 et 22 kDa.

- Des résultats identiques ont été obtenus après déglycosylation et/ou délipidation des antigènes du liquide hydatique, suggérant ainsi la nature protéique de l'épitope reconnu. Celle-ci a pu également être confirmée par l'immunoprécipitation des produits de traduction d'ARN messager de protoscolexes d' *E. granulosus*.

- Lorsque l'antigène 5 est analysé dans des conditions réductrices, aucune réactivité n'est détectée avec l'anticorps monoclonal en

immunotransfert. La reconnaissance de l'épitope semble donc lier à la présence d'un pont disulfure associant les deux sous-unités de l'antigène 5.

- Enfin, dans un test radioimmunologique (RIA), l'anticorps monoclonal inhibe, de façon spécifique, la reconnaissance de l'antigène 5 par les sérums humains hydatiques. Ce test d'inhibition a montré une très grande sensibilité et spécificité suggérant l'importante valeur diagnostique de l'épitope reconnu.

JIM 05742

Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease

Mustapha Chamekh, Brigitte Facon, Colette Dissous, Azizul Haque and André Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167–CNRS 624, Institut Pasteur,
1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59 019 Lille Cedex, France

(Received 17 April 1990, revised received 10 July 1990, accepted 12 July 1990)

A monoclonal antibody (mAb) designated as EG 02 154/12, specific for the major antigen (antigen 5) of *Echinococcus granulosus* was produced, and used to study the binding sites recognized by anti-antigen 5 antibodies from patients with hydatid disease. The nature of the target epitope was partially characterized. The antibody reactivity was analyzed towards sheep hydatid fluid antigens (SHF Ag) using ELISA, immunoelectrophoresis (IEP), Western blotting (WB), and immunoprecipitation (IP).

In IEP, EG 02 154/12 mAb gave a single precipitin of Ag 5. The mAb and human hydatid patient sera recognized a major antigen of 64 kDa, in SHF Ag analyzed in non-reducing conditions. Both types of antibodies revealed two components of 37 and 22 kDa in reducing conditions. Deglycosylation and delipidation of SHF Ag did not affect the mAb binding. These results, together with the observation of mAb binding to in vitro translation products from protoscoleces messenger RNA, suggest the protein nature of the epitope recognized on the antigen 5. Using competitive antibody radioimmunoassay (CRIA), a competition between this mAb and hydatid patient sera, for the same epitope or closely related sites on antigen 5, was observed. No such competition was detected with the sera from other helminthiasis. The sensitivity and specificity of CRIA was compared to that of ELISA and CRIA found to be an improved diagnostic test for hydatid disease.

Key words: *Echinococcosis*; Monoclonal antibody; Antigen 5; Protein epitope; Hydatid patient serum; Immunodiagnosis

Correspondence to: M. Chamekh, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U167–CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59 019 Lille Cedex, France.

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; IEP, immunoelectrophoresis; WB, Western blotting; IP, immunoprecipitation; mAb, monoclonal antibody; Ig, immunoglobulin; SHF Ag, sheep hydatid fluid antigens; CRIA, competitive antibody radioimmunoassay.

Introduction

Echinococcosis, also known as unilocular cystic hydatid disease, is recognized as one of the world's major zoonoses, affecting both man and his domestic animals (McManus and Smyth, 1986). This disease is caused by the metacystode stage of the dog tapeworm *Echinococcus granulosus*. Clinical symptoms of the disease are non-specific and

there is rarely any parasitological evidence of infection (Todorov et al., 1979). Early prognosis is important if proper treatment through surgery or drugs is envisaged. Further, effective diagnosis is a key factor in the epidemiological evaluation of any hydatidosis control programme.

Among the immunodiagnostic tests used in hydatid disease, one of the most successful during the last 20 years has been immunoelectrophoresis (Capron et al., 1968, 1970). Using cystic fluid as a source of antigen, appearance of precipitin designated as arc 5 was detected by a high proportion of hydatid patient sera. The diagnostic importance of antigen 5 has been confirmed and this antigen is still considered as the *E. granulosus* antigen with the highest degree of specificity, although, antibodies to antigen 5 were demonstrated in some sera from patients infected with larval *E. multilocularis*, *E. vogeli*, *Taenia solium*, *T. ovis*, or *T. hydatigena* (Yarzabal et al., 1977, 1978; Yong and Heath, 1979).

Murine hybridoma-derived antibodies have been used to improve the immunodiagnosis of hydatid infection in sheep (Craig et al., 1981; Lightowers et al., 1984). With the development of new tests with increased sensitivity, there remains the possibility of false positive reactions caused by the use of SHF Ag bearing cross-reactive determinants such as the P₁-like carbohydrate epitope (Ben-Ismael et al., 1980) or phosphorylcholine (Shepherd and McManus, 1987).

In the present study, we have undertaken the production of monoclonal antibodies to antigen 5 in order to perform a more detailed biochemical analysis of antigen and to test the value of specific determinants in more sensitive immunodiagnostic assays (such as radioisotope-linked or enzyme-linked assays). We are describing the selection and the characterization of a mouse monoclonal IgG₁, specific for antigen 5. The protein nature of the epitope was determined and its specificity for hydatid disease was demonstrated.

Materials and methods

Parasite antigens

Sheep hydatid fluids (SHF) were aseptically aspirated from cysts of *E. granulosus* collected

from sheep lungs and livers, pooled, ultracentrifuged at 40,000 rpm, and then lyophilized.

E. multilocularis antigens were prepared from parasitic peritoneal lesions maintained in *Meriones unguiculatus* (Vuitton et al., 1988).

Sera

All human sera used were obtained from diagnosis laboratory (Institut Pasteur de Lille). Human hydatid sera were classified according to the presence of precipitins in immunoelectrophoretic analysis. Sera were also tested in ELISA performed with SHF Ag according to the procedure described by Farag et al. (1975). Values were expressed in optical density (OD) at 492 nm.

Rabbit anti-whole SHF Ag serum was prepared following the procedure described by Kagan et al. (1960).

Preparation of monoclonal antibodies

BALB/c mice were immunized subcutaneously and, 3 weeks after, intraperitoneally with 100 µg of SHF Ag in complete Freund's adjuvant (v/v). 2 weeks after the last injection, mice were boosted with 100 µg of SHF Ag in saline. 3 days later, spleen cells were harvested and fused with SP2/O myeloma cells at a ratio of 1:5 using polyethylene glycol (PEG 1500) according to Galfrè et al. (1977). Cells were then distributed to wells of microculture plates and fused cells were selected in HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine) medium. Culture supernatants from each well displaying dense hybrid cell growth were tested for the presence of antibody to the SHF Ag by ELISA. Positive wells were then cloned by limiting dilution. Ascitic fluids from mice injected with hybridoma cells were fractionated by ammonium sulfate precipitation followed by gel filtration on Trisacryl GF 05 (LKB, Sweden). The mAb was purified by ion-exchange chromatography on DEAE-Trisacryl (LKB, Sweden) and dialyzed against 10 mM phosphate-buffered saline (PBS).

Delipidation and periodate treatment of SHF Ag

Delipidation of SHF Ag was performed by the method of Day and Levy (1968). 10 mg of lyophilized SHF Ag was added to 20 ml of ethanol-ether mixture (3:1) and shaken overnight at 4°C. After centrifugation at 1500 × g for 20 min, the yellow-

ish supernatant was removed and the remaining pellet was resuspended again with ethanol-ether (3:2), shaken for 2 h at 4°C and centrifuged. The method was repeated with ethanol-ether (1:1) and ether alone. Delipidized extract was dissolved in PBS. The periodate treatment was performed exactly according to the procedure described by Stewart et al. (1977).

Antigens and monoclonal antibody radioiodination

Antigens or purified EG 02 154/12 mAb were labelled with iodine (^{125}I) using the chloramine-T procedure described by Hunter and Greenwood (1963). *Echinococcus* antigens or IgG₁ mAb (100 µg) were mixed with 0.2 mCi ^{125}I -sodium iodide (Amersham, les Ullis, France) and 100 µl chloramine-T (1 mg/ml) (Merck, Darmstadt, F.R.G.). The iodination was stopped after 1 min by addition of 100 µl sodium metabisulphite (2 mg/ml). The radiolabelled protein was recovered by gel filtration through PD10 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The average specific activity of mAb was 37 KBq · µg⁻¹.

SDS-PAGE and Western blotting

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed according to the procedure of Laemmli (1970) in a 10% polyacrylamide gel for non-reducing conditions and in a 13% polyacrylamide gel for reducing conditions.

The immunoblotting procedure was performed essentially as described by Towbin et al. (1979). The nitrocellulose strips were quenched in 5% skimmed milk in PBS, pH 7.2. Purified EG 02 154/12 mAb (1 mg/ml) or human sera diluted 1/100 in 5% skimmed milk PBS were incubated with the strips overnight at 4°C. After extensive washings in PBS (containing 0.5% Tween 20) horseradish-peroxidase-conjugated anti-mouse IgG or anti-human immunoglobulin (Diagnostic Pasteur) were incubated for 1 h at 37°C. Staining was performed using 4-chloro-1-naphthol substrate.

Immunoprecipitation of labelled *Echinococcus* antigens

Immunoprecipitation assays were performed as previously described (Dissous et al., 1981).

Labelled proteins ($5 \cdot 10^5$ cpm) were diluted in 500 µl TNSTE (5 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.3% SDS, 1.7% Triton X-100, 2 mM EDTA) and incubated with 10 µl of human sera or purified mAb (1 mg/ml) for 2 h at room temperature. Protein A-Sepharose (10 mg) was then added, and the samples were incubated overnight at 4°C. For experiments with human sera, protein A-Sepharose was previously coated with 10 µg of anti-human Ig mouse IgG. Sepharose beads were then washed ten times with TNSTE. Beads were then suspended in 40 µl of sample buffer containing 3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% sucrose, 10% β-mercaptoethanol. After boiling for 3 min, samples were electrophoresed. For autoradiography, dried gels were placed in contact with Kodak film for 5 days at -70°C.

Competition radioimmunoassay experiments

Inhibition of radiolabelled EG 02 154/12 mAb binding to the SHF Ag was performed on PVC microtitre plates precoated with unlabelled EG 02 154/12 mAb. Each well of the PVC plates was incubated with 100 µl of 10 µg · ml⁻¹ solution of EG 02 154/12 mAb in 10 mM phosphate-buffered

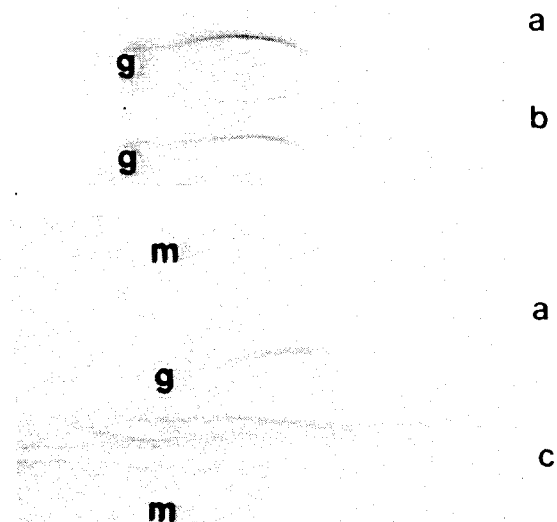


Fig. 1. Specificity of the monoclonal antibody EG 02 154/12 in immunoelectrophoresis. g: sheep hydatid fluid antigen (SHF Ag); m: *E. multilocularis* antigen; a: human hydatid serum; b: EG 02 154/12 mAb; c: anti-whole SHF Ag rabbit serum.

saline (PBS). After 2 h, the plates were washed twice in PBS and saturated for 30 min with 200 μ l of 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS. The plates were then washed twice in PBS, 0.1% BSA. 100 μ l of SHF Ag (1 mg/ml) were added. After 2 h exposure at 37°C, plates were washed twice in PBS 0.1% BSA.

For inhibition test, 50 μ l of 125 I-EG 02 154/12 mAb (10^5 cpm) were incubated for 1 h at 37°C and overnight at 4°C with 50 μ l of sera diluted in PBS 0.1% BSA. The percentage of EG 02 154/12 mAb binding inhibition was calculated using the following formula: % of inhibition = $a - b/a$, where a = cpm obtained when 125 I-EG 02 154/12 mAb was incubated with 50 μ l of PBS-0.1% BSA buffer; and b = cpm obtained when 125 I-EG 02 154/12 mAb was incubated with 50 μ l of serum. In ten independent experiments, the mean value of a was $41,141 \pm 1471$ cpm.

Results

Monoclonal antibody selection

Among several mAbs positive in ELISA for SHF antigen, we selected one hybrid cell line (EG 02 154/12) producing antibodies of IgG₁ subclass. In contrast to anti-total SHF rabbit serum, this mAb gave in IEP a single precipitation line corresponding to the antigen 5, as defined by human hydatid sera from patients infected with *E. granulosus* (Fig. 1). No precipitin was observed with *E. multilocularis* cyst fluid antigen. Therefore, this mAb was selected and further study of its specificity was undertaken.

Characterization of antigens recognized by EG 02 154/12 mAb

mAb specificity was studied by the Western blot technique. Fig. 2A shows that the mAb and

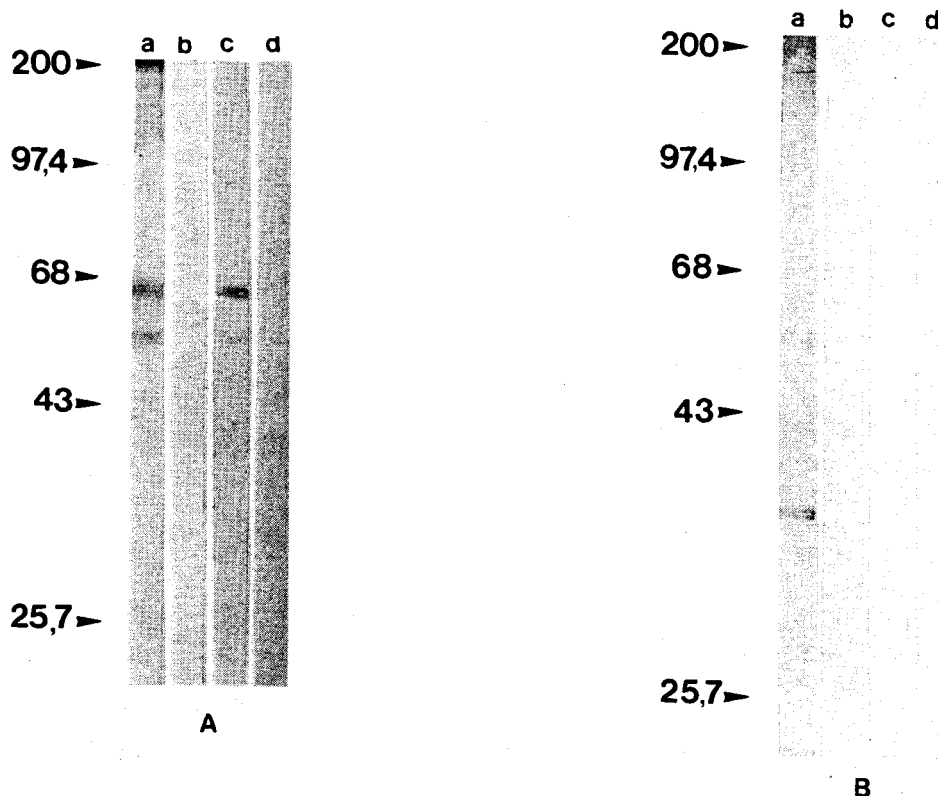


Fig. 2. Immunoblotting pattern of SHF Ag in non-reducing (A) and reducing (B) conditions. a: pooled human hydatid sera (precipitating only the antigen 5 in IEP); b: pooled normal human sera; c: EG 02 154/12 mAb; d: mouse IgG₁ mAb to *Toxoplasma gondii*.

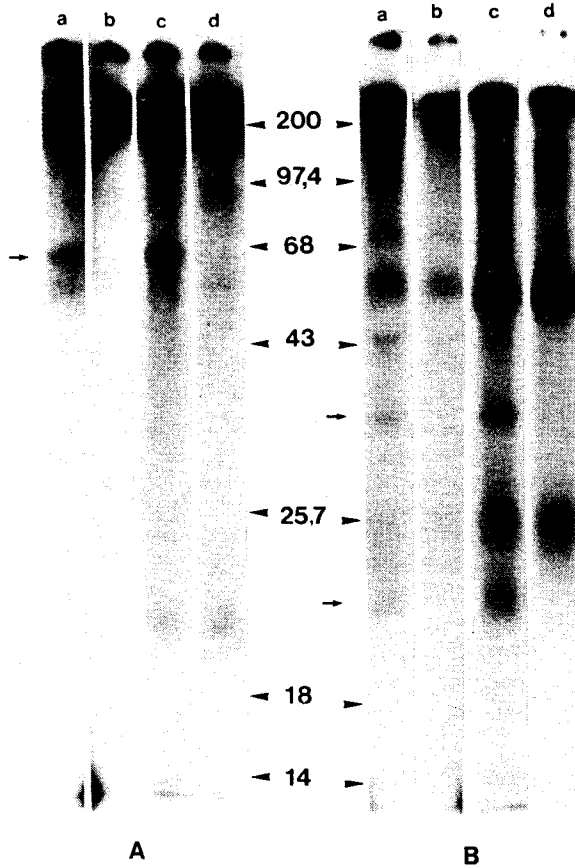


Fig. 3. Radioimmunoprecipitation and SDS-PAGE analysis of SHF Ag reacting to monoclonal antibodies and human hydatid sera in non-reducing (A) and reducing (B) conditions. a: pooled human hydatid sera (precipitating only the antigen 5 in IEP); b: pooled normal human sera; c: EG 02 154/12 mAb; d: mAb anti-*T. gondii*.

human hydatid sera both recognized in SHF Ag a major antigen of 64 kDa in non-reducing conditions. Human sera also revealed a 53 kDa antigen. However, when SHF Ag was analyzed in reducing conditions, the mAb reactivity was no longer detectable whereas human hydatid sera identified a 37 kDa antigen.

SHF extract was radioiodinated and antigens were immunoprecipitated by EG 02 154/12 mAb and human hydatid sera. Results, presented in Fig. 3A, indicated that the mAb was able to identify specifically a 64 kDa antigen which was also immunoprecipitated by human hydatid sera. In reducing conditions (Fig. 3B), the mAb and human sera from patients infected with *E.*

granulosus both recognized two components of 37 and 22 kDa. Significant non-specific binding, particularly, to 90, 53 and 25 kDa components, was observed using unrelated mAb and normal human serum.

Protein nature of the epitope

Previous results have indicated that antigen 5 corresponded to a concanavalin A binding lipoprotein. In order to analyze the biochemical nature of the epitope recognized by EG 02 154/12 mAb and human hydatid sera, SHF Ag was deglycosylated or delipidated before analysis by Western blotting. Both types of antibodies reacted with the same antigens identified in untreated SHF Ag (Fig. 4). The resistance to these biochemical treatments suggested the protein nature of the epitope. These results were further confirmed by the immunoprecipitation by human hydatid sera of 33

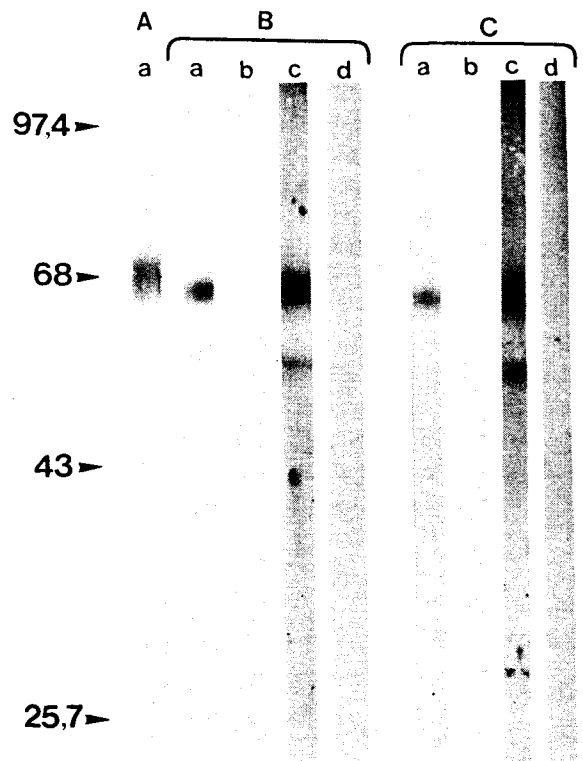


Fig. 4. Immunoblotting analysis of untreated (A), deglycosylated (B) and delipidated (C) SHF Ag. a: EG 02 154/12 mAb; b: anti *T. gondii* mouse IgG, mAb; c: pooled human hydatid sera (precipitating only the antigen 5 in IEP); d: pooled normal human sera.

134

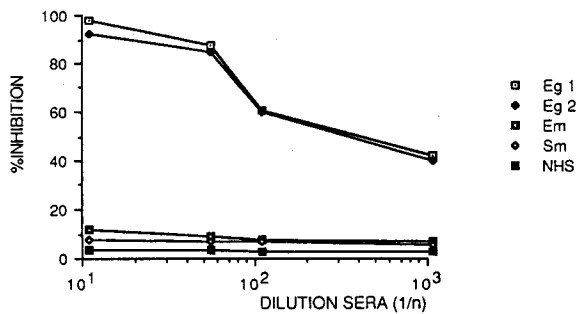


Fig. 5. Inhibition of ^{125}I -EG 02 154/12 mAb binding to antigen 5 by different human sera at different dilutions: *E. granulosus* (Eg), *E. multilocularis* (Em), *S. mansoni* (Sm) infected patient sera and normal human sera (NHS).

and 20 kDa products translated in vitro from *E. granulosus* protoscoleces messenger RNA in wheat germ lysate. EG 02 154/12 mAb recognized a translation product of 33 kDa as well as other minor products in the 18–14 kDa range (data not shown).

Binding inhibition of human antibodies to antigen 5 by EG 02 154/12 mAb

The similar specificities detected by EG 02 154/12 mAb and human hydatid sera in IEP, WB, and immunoprecipitation analyses were further studied by competitive RIA (CRIA).

Fig. 5 shows the results of an experiment in which two different human hydatid sera were tested for competition with radiolabelled mAb. The percentage of inhibition were of 60 and 96–98% for serum dilutions of 1/100 and 1/10 respectively. No significant inhibition was observed with normal human sera nor with *E. multilocularis* or *S. mansoni* infected patient sera.

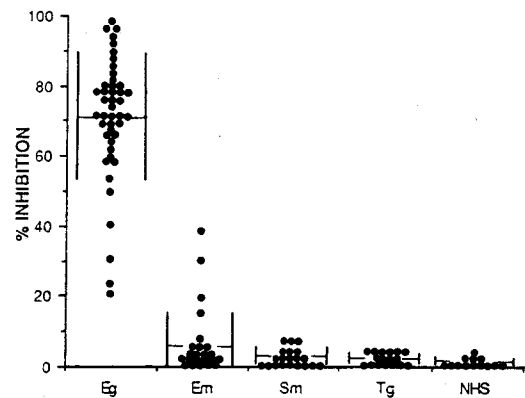


Fig. 6. Sensitivity and specificity of CRIA using ^{125}I -EG 02 154/12 mAb and sera from different patient groups: human sera from patients infected with *Echinococcus granulosus* (Eg)($n = 44$), *Echinococcus multilocularis* (Em)($n = 24$), *Shistosoma mansoni* (Sm)($n = 20$), *Toxoplasma gondii* (Tg)($n = 17$), normal human sera (NHS)($n = 13$).

Sensitivity and specificity of CRIA

Experiments to determine the immunodiagnostic value of CRIA were performed using sera diluted at 1/50. As shown in Fig. 6, percentages of binding inhibition of EG 02 154/12 mAb to antigen 5 by *E. granulosus* infected patient sera (71.25 ± 19.54) were significantly higher than those of normal human sera (2.88 ± 2.33) or than those of sera from patients with other parasitic diseases: *E. multilocularis* (6.59 ± 10.53), *S. mansoni* (3.65 ± 3.4) or *T. gondii* (3.39 ± 3.03) ($P < 0.0001$). These sera showed no significant difference ($P > 0.005$) in their inhibition capacity when compared to normal human sera. The sensitivity and specificity of CRIA were compared to ELISA performed with whole sheep hydatid fluid antigens (Table I). Using the upper limit of positive

TABLE I

COMPARATIVE ANALYSIS OF CRIA AND ELISA SENSITIVITY AND SPECIFICITY

Human sera	no. sera tested	OD (492 nm) Mean \pm SD	no. (%) sera positive by ELISA	no. (%) sera positive by CRIA
Hydatidosis	44	1.1 \pm 0.17	39 (88)	44 (100)
Alveolar echinococcosis	23	0.54 \pm 0.46	10 (43)	4 (17)
Taeniasis (<i>T. saginata</i>)	5	0.27 \pm 0.38	2 (40)	0 (0)
Schistosomiasis	20	0.18 \pm 0.2	5 (25)	0 (0)
Toxoplasmosis	17	0.13 \pm 0.15	2 (11)	0 (0)
Normal human sera	13	0.05 \pm 0.02	0 (0)	0 (0)

values as three standard deviations above the mean of the control group, CRIA appeared to be more sensitive (100%) for hydatid sera than ELISA (88%). A better specificity was also obtained with CRIA. Indeed, only four of 23 *E. multilocularis* infected sera were considered positive with a relatively low level (13–40%) of inhibition whereas ten of these sera gave a positive reaction in ELISA. Moreover, 42 sera from patients with other parasitic infections were all found to be negative in CRIA when analysis of these sera by the ELISA technique indicated that two of five *T. saginata* patients, five of 20 *S. mansoni* patients and two of 17 *T. gondii* patients cross-reacted with SHF Ag.

Discussion

Several studies have reported the antigenic complexity of hydatid cyst fluid which contains several metabolic antigens of *E. granulosus* shared with other helminths and many components of host serum playing an important role in the occurrence of non-specific reaction (Russi et al., 1974; Ben-Ismael et al., 1980; Shepherd et al., 1987). Among the *E. granulosus* antigens identified, one major antigen (antigen 5) was characterized as a ConA binding lipoprotein of approximately 60 kDa, composed of two subunits of 47 and 20 kDa (Bout et al., 1974; Piantelli et al., 1977). Different immunological techniques have been reported for the serodiagnosis of hydatid disease using a purified antigen 5 or whole hydatid cyst fluids from different intermediate hosts (Williams et al., 1971; Musiani et al., 1974; Farag et al., 1975). Immunoelectrophoresis appeared to be the most frequently used test for diagnosis based on the specificity of the arc 5 (Capron et al., 1968, 1970). However, antibodies to antigen 5 were also detected in sera from patients infected with other helminthiasis (Yarzabal et al., 1977; Varela-Diaz et al., 1978; Yong et al., 1979). Recently, a part of this cross-reaction has been shown to be related to the presence of phosphorylcholine in the antigen 5 (Shepherd et al., 1987).

Because of the complex biochemical nature of the antigen 5 and its high immunogenicity, it was interesting to study a possible epitopic specificity of this major antigen which remained a good

candidate for the immunodiagnosis. In this regard, we produced a panel of monoclonal antibodies, selected in ELISA on their reactivity with sheep hydatid fluid antigens.

In the present work, one of these monoclonal antibodies (EG 02 154/12) which precipitated antigen 5 in immunoelectrophoresis, was studied. This suggested that the epitope recognized on antigen 5 was repeated at least twice. The use of this mAb in a 'sandwich' RIA confirmed this determinant repetitivity. EG 02 154/12 mAb reactivity towards SHF Ag was further compared to that of human hydatid sera. In WB or IP performed in non-reducing conditions, both types of antibodies revealed two antigens of 64 and 53 kDa which might correspond to the antigens of 66 and 56 kDa identified by Di-Felice et al. (1986) as the two molecular components of the antigen 5. In reducing conditions, a unique band of 37 kDa detected by human sera in Western blotting, might correspond to the 39 kDa band found in SDS-PAGE after reduction of purified antigen 5 (Di-Felice et al., 1986) or to the 38 kDa antigen immunoprecipitated by hydatid patient sera (Shepherd et al., 1987). Under these conditions, no reactivity of the mAb was detectable despite the increased sensitivity brought about by using avidin-biotin system. In contrast, SDS-PAGE analysis of antigens precipitated by EG 02 154/12 mAb identified two specific bands of 37 and 22 kDa. Thus, the recognition of the epitope appeared to be dependent on the presence of disulphide bonds. Previous studies described the antigen 5 as one subunit of 60–65 kDa (Bout et al., 1974; Piantelli et al., 1977). Our results appeared to be consistent with these observations since the additional 53 kDa component revealed in many immunoprecipitation experiments was shown to be non-specifically recognized by antibodies. Indeed, the 53 kDa molecule was shown to react with unrelated mAb as well as normal human sera. It is interesting to note that in a recent study (Gasser et al., 1989), non specific binding of *E. granulosus* protoscolex antigens to a 54 kDa component was observed in immunoprecipitation using sera from definitive hosts (dogs).

In spite of important progress made in the accuracy of the various methods using a purified antigen (Williams et al., 1971; Farag et al., 1975),

some problems remained unsolved. The presence of cross-reactive determinants such as the P₁-like carbohydrate epitope or phosphorylcholine in antigen 5 was an important limitation of the specificity of the tests. In control experiments, we could demonstrate that EG 02 154/12 mAb did not agglutinate P₁ erythrocytes and that phosphorylcholine was not able to abolish mAb binding to antigen 5. The protein nature of the antigen 5 epitope, target of human and monoclonal antibodies, was demonstrated following deglycosylation and/or delipidation of SHF Ag. Such treatments did not alter the binding of mAb to antigen 5. The immunoprecipitation of in vitro translation products from protoscolex messenger RNA also argued for the protein nature of the epitope. Current investigation concerns the construction of *E. granulosus* cDNA library and the selection of recombinant proteins identified by EG 02 154/12 mAb (Facon et al., manuscript in preparation).

To evaluate the diagnostic value of this antigen 5 protein epitope, we used the mAb in CRIA for the detection of circulating antibodies to this protein determinant. 81% of human hydatid sera were shown to inhibit to more than 60% of the mAb binding. These results suggested that the mAb and human sera reacted with the same or closely related antibody binding sites. The relatively low level (20–40%) of inhibition observed with only four sera might be explained by the presence of circulating immune complexes, already recognized to play a role in immune regulation (Pini et al., 1983; Gottstein et al., 1984). Such an inhibition test has proved to be more sensitive and more specific for hydatid disease when compared to ELISA. Indeed, all hydatid sera tested were positive in CRIA and only 17% of human alveolar echinococcosis showed low level of inhibition that could be explained by the presence of low concentration of antigen 5 in *E. multilocularis* extract, previously demonstrated by Yarzabal et al. (1977). Moreover, the absence of significant cross-reactivity in CRIA with sera from other helminthiasis or protozooses suggested that the mAb specific for the antigen 5 protein epitope should be of value for the epitopic mapping of the antigen 5 and the improvement of specific immunodiagnosis of hydatid disease.

Acknowledgements

We thank Drs. P. Wattre, M. De Lourdes, J.M. Da Costa, D. Afchain and J. Khalife for providing us with human sera. We thank also S. Lafitte and A.M. Schacht for technical assistance. We are grateful to J.L. Neyrinck for his help in statistical analysis of the results.

This work was supported by Unité Mixte INSERM U 167–CNRS 624.

References

- Ben-Ismael, R., Carme, B., Niel, G. and Gentilini, M. (1980) Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens. Role of anti-P₁ antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 239.
- Bout, D., Fruit, J. and Capron, A. (1974) Purification d'un antigène spécifique du liquide hydatique. *Ann. Institut Pasteur (Immunol.)* 125C, 775.
- Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. and Afchain, D. (1968) Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Pathol. Biol.* 16, 121.
- Capron, A., Yarzabal, L., Vernes, A. and Fruit, J. (1970) Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine (bilan personnel à propos de 400 observations) *Pathol. Biol.* 18, 357.
- Craig, P.S., Hocking, R.E., Mitchell, G.F. and Rickard, M.D. (1981) Murine hybridoma-derived antibodies in the processing of antigens for the immunodiagnosis of hydatid (*Echinococcus granulosus*) infection in sheep. *Parasitology* 83, 303.
- Day, C.E. and Levy, R.S. (1968) Determination of molecular weight of apoprotein subunits from low density lipoproteins by gel filtration. *J. Lipid Res.* 9, 789.
- Di-Felice, G., Pini, C., Afferni, C. and Vicari, G. (1986) Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 133.
- Dissous, C., Dissous, C. and Capron, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3, 215.
- Farag, H., Bout, D. and Capron, A. (1975) Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Biomedecine* 23, 276.
- Galfrè, B.M., How, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. and Howard, J.C. (1977) Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550.
- Gasser, R.B., Lightowers, M.W. and Rickard, M.D. (1989) Identification of protein components of *Echinococcus granulosus* protoscolex antigens for specific serodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. *Parasite Immunol.* 11, 279.

- Gottstein, B. (1984) An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 1185.
- Hunter, V.K. and Greenwood, F.C. (1963) Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *J. Biochem.* 89, 114.
- Kagan, I.G., Norman, L. and Allain, D.S. (1960) Studies on echinococcosis: Serology of crude and fractionated antigens prepared from *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 248.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680.
- Lightowers, M.W., Rickard, M.D., Honey, R.D., Obendorf, D.L. and Mitchell, G.F. (1984) Serological diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. *Aust. Vet. J.* 61, 101.
- McManus, D.P. and Smyth, J.D. (1986) Hydatidosis: Changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol. Today* 2, 163.
- Musiani, R., Piantelli, M., Arru, E. and Pozzuoli, R. (1974) A solid phase radioimmunoassay for the diagnosis of human hydatidosis. *J. Immunol.* 112, 1674.
- Oriol, R., Williams, J.F., Peres Escandi, M.V. and Oriol, C. (1971) Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569.
- Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E. and Musiani, P. (1977) *Echinococcus granulosus*: Identification of subunits of major antigens. *J. Immunol.* 119, 1382.
- Pini, C., Pastore, R. and Valesinin, G. (1983) Circulating immune complexes in sera of patients infected with *Echinococcus granulosus*. *Clin. Exp. Immunol.* 51, 572.
- Russi, S., Siracusano, A., Remy, G. and Dropsy, G. (1974) Isolation and characterization of blood P₁ active carbohydrate antigen of *Echinococcus granulosus* cyst membrane. *J. Immunol.* 112, 1061.
- Shepherd, J.C. and McManus, D.P. (1987) Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 143.
- Stewart, W.E., Lin, L.S., Wiranowska-Stewart, M. and Cantell, K. (1977) Elimination of size and charge heterogeneities of human leukocyte interferons by chemical cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 4200.
- Todorov, T., Raigev, I., Tenev, S., Kosturcova, M., Dacov, I. and Dimitrov, A. (1979) Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. 2: Evaluation of antibodies response. *Bull. W.H.O.* 57, 741.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 4350.
- Varela-Diaz, V.M., Coltorti, E.A. and D'alessandro, A. (1978) Immunoelectrophoresis tests showing *Echinococcus granulosus* arc 5 in human cases of *Echinococcus vogeli* and cysticercosis multiple myeloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 554.
- Vuitton, D.A., Bresson-Hadni, S., Lenys, D., Flausse, F., Liance, M., Wattre, P., Miguet, J.P. and Capron, A. (1988) IgE-dependant humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection: Circulating and basophil-bound specific IgE against *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 71, 247.
- Williams, J.F., Perez-Escandi, M.V. and Oriol, R. (1971) Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in immunodiagnosis of human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 575.
- Yarzabal, L., Bout, D., Naquira, F.R. and Capron, A. (1977) Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63, 495.
- Yong, W.K. and Heath, D.D. (1979) Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*. *Parasite Immunol.* 1, 27.

ARTICLE 2

Clonage moléculaire d'une protéine d'*Echinococcus granulosus* exprimant un épitope immunogène de l'antigène 5.

Dans ce travail, nous démontrons que l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 et des sérums humains hydatiques, sont capables d'identifier une protéine recombinante codée par une séquence sélectionnée à partir d'une banque d'ADN complémentaire de l'ARN de protoscolexes d' *E. granulosus*.

- La séquence protéique de ce clone a été déterminée et la protéine de fusion correspondante (FP6) a été testée, en immunotransfert, vis à vis d'une série de sérums de patients atteints par différentes infections parasitaires.

- La reconnaissance de cette protéine recombinante par les sérums humains hydatiques est corrélée à leur capacité de précipiter l'antigène 5 en immunotransfert.

- Des anticorps humains, élués de la protéine de fusion, reconnaissent la sous-unité 37 kDa de l'antigène 5 en immunoélectrophorèse.

Ces expériences nous ont permis de conclure que le clone Eg6 exprime au moins un épitope de l'antigène 5, dont la valeur diagnostique a été mise en évidence précédemment (Article 1). Néanmoins, une faible réactivité croisée de la protéine de fusion a été observée avec des sérums humains infectés par d'autres parasites, ce qui nous a incité à tenter de définir précisément la structure de l'épitope spécifique.

MOLBIO 01486

Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5

Brigitte Facon, Mustapha Chamekh, Colette Dissous and André Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167, CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France

(Received 23 May 1990; accepted 19 October 1990)

cDNA was synthesized from RNA extracted from *Echinococcus granulosus* protoscoleces and cloned in the λ gt11 expression vector. A pool of 5 *E. granulosus* patient sera was used to screen the library and allowed the selection of 13 clones. Ten of these were shown to be identical, among which clone 6 (Eg6) was chosen for further analysis. The nucleotide sequence (456-bp) presented an entire open reading frame coding for 152 amino acids. The fusion protein (FP6) was recognized by a mouse monoclonal antibody (EG 02 154/12) specific for *E. granulosus* antigen 5. Moreover, the presence of antibodies to FP6 seemed to be correlated to the ability of sera from hydatidosis patients to immunoprecipitate antigen 5. These results indicate that the cloned protein could be used as a standardized antigen for the diagnosis of hydatidosis.

Key words: *Echinococcus granulosus*; Diagnosis; Hydatidosis; Antigen; Gene

Introduction

Hydatidosis or unilocular echinococcosis is caused by the cestode larval stage of *Echinococcus granulosus*. Echinococcosis has a world-wide distribution and constitutes an important economic and public health problem. *E. granulosus* develops successively in definitive (dog) and intermediate (cattle, man) hosts, and the consequences of this cyclozoonosis are of both veterinary and medical importance [1]. If animal diagnostic tests are still very limited, a medical diagnosis of hydatidosis can be established by clinical examination associated with serological procedures, among which immunoelectrophoresis (IEP) remains the most currently used. IEP tests detect the presence in

human sera of antibodies directed against cyst fluid antigens, and particularly immunoglobulins specific for antigen 5, a component identified by Capron et al. [2] and considered as the most important constituent of cyst fluid for diagnosis [3–6]. However, such immunodiagnosis procedures were shown to be rather limited by the presence of cross-reactive components shared by *E. granulosus* and other cestodes, particularly the closely related species *Echinococcus multilocularis* [7,8]. Cross-reactivity could also be observed with other helminths [9–11] and the presence of host antigens in parasite extracts was shown to be responsible for false positive reactions [12,13].

Recently, we described the characterization of a mouse monoclonal IgG1 (EG 02154/12) specific for a protein epitope of antigen 5. Sera from hydatidosis patients were shown to specifically inhibit the binding of the monoclonal antibody to the cyst fluid antigen [14]. The absence of cross-reactivity with *E. multilocularis* and other helminths makes this monoclonal antibody a good candidate for a significant improvement of the diagnosis of hydatidosis.

This paper is concerned with the selection and

Correspondence address: Colette Dissous, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167, CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. Calmette, 59 019 Lille Cedex, France.

Note: Nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the GenBank™ data base with the accession number M55441.

Abbreviations: SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; IEP, immunoelectrophoresis.

the characterization of *E. granulosus* cDNA clones expressing antigenic determinants recognized by human hydatid patient sera. The nucleotide sequence of one of these clones (Eg 6) was determined. The immunoreactivity of the fusion recombinant protein with EG 02154/12 antibody strongly suggests that a peptide epitope of antigen 5 was contained in the cloned protein.

Materials and Methods

Preparation of parasites and sera. Hydatid fluid was drawn aseptically from fresh and fertile cysts collected from sheep liver, centrifuged at $40\,000 \times g$ for 1 h, then dialyzed against 100 vols. of distilled water for 48 h and lyophilized. Protoscoleces of *E. granulosus* were prepared from whole hydatid fluid and recovered by sedimentation. Following several washes in 0.15 M NaCl, they were frozen and stored in liquid nitrogen. Patient sera were obtained from the diagnosis laboratory of the Pasteur Institute (Lille, France). Diagnosis was confirmed in all cases by previous serological and parasitological examination. IEP tests were carried out using *E. granulosus* and *E. multilocularis* antigens. The diagnosis was determined by the presence of arc 5 (antigen 5). Mouse monoclonal IgG1 (EG 02154/12) antibody was produced in our laboratory and shown to be specifically directed against *E. granulosus* antigen 5 [14]. SP2/0 ascites were obtained from the myeloma line used in monoclonal antibody production.

Preparation of RNA. Total RNA was isolated from *E. granulosus* protoscoleces using a modified method of Chirgwin et al. [15]. Frozen protoscoleces were ground in liquid nitrogen and homogenized in 4.2 M guanidium thiocyanate/2% N-lauroyl Sarcosine/10 mM EDTA/5% 2-mercaptoethanol/0.02 M sodium acetate, pH 4.5. The homogenate was sonicated and centrifuged at 10 000 rev./min for 20 min in a Sorvall HB-4 rotor. The supernatant was layered onto 2 ml CsCl solution (d: 1.72) and centrifuged at 28 000 rev./min for 20 h at 20°C in a Beckman SW41 rotor. The RNA pellet was resuspended in distilled water and precipitated with ethanol.

λ gt11 expression library. Double-stranded cDNA

was synthesized from 300 μ g of total RNA [16] and cloned into the *Eco*RI site of the λ gt11 vector using *Eco*RI-digested linkers (5'-GGAATTC-3') (Proclone, Promega, WI, U.S.A.). For screening, the library was plated out on Y1090 *E. coli* cells at the density of 5×10^3 to 8×10^3 pfu/petri dish (90 mm). The expression library was screened with human sera (diluted from 1/100 to 1/500 in PBS-1% skimmed milk) and replicates were developed by incubation with HRP-conjugated anti-human antibodies (Pasteur Production, Marne La Coquette, France). Staining was performed in the presence of 4-chloro-1-naphthol reagent. Selected clones were further screened with purified EG 02154/12 monoclonal antibody.

Southern blot analysis. cDNA probe was 32 P-labeled by the hexamer random priming technique of Feinberg and Vogelstein [17]. DNA dot blots were performed directly on recombinant plaques. Hybridization with labeled probe (5×10^7 cpm) was carried out at 42°C in $4 \times$ SSC/20 mM Tris-HCl pH 7.4/10% dextran sulfate/40% formamide, and washes were made at 65°C in $0.1 \times$ SSC/0.1% SDS [18].

Western blot analysis. Y1089 lysogenic bacteria were prepared and selected on their temperature sensitivity. Bacterial extracts were analyzed in SDS-PAGE under reducing conditions [19]. Western blotting was performed according to Towbin et al. [20]. In some experiments, antibodies from human sera adsorbed on FP6 were eluted from nitrocellulose strips with KSCN 3.5 M, dialyzed against TBS (50 mM Tris-HCl, pH 8.3/100 mM NaCl) and allowed to react with immunoblots of sheep hydatid fluid antigen.

M 13 cloning and DNA sequencing. cDNA inserts were prepared, subcloned in the M13mp18 vector and sequenced by the dideoxy chain termination reaction of Sanger et al. [21] using dye-labeled primers (Applied Biosystems). Fluorescence of DNA fragments was detected by a 370A DNA sequencer (Applied Biosystems) and the sequences of both DNA strands were determined [22]. Protein sequences were deduced and analyzed using the PC Gene system (Intelligenetics Inc., CA, U.S.A.). The Swissprot (Switzer-

land) and NBRF (Washington DC, U.S.A.) data banks were used to search for homology of deduced amino acid sequences with other known sequences.

Results

Selection of cDNA clones recognized by human antibodies. Total RNA was extracted from *E. granulosus* scoleces and the integrity of messenger RNA was checked by its in vitro translation efficiency in the wheat germ extract system. The

cDNA library was constructed from total RNA (5×10^6 recombinant clones) and screened with a pool of 5 *E. granulosus* human sera. The choice of these sera was determined upon their characteristics in IEP (from 3–6 arcs including arc 5). Screening of 5×10^5 recombinant phages allowed the selection of 13 clones expressing protein epitopes recognized by human antibodies. Electrophoresis of *EcoRI* digested DNA displayed insert sizes of 130 bp for clone 1, 138 bp for clone 2, 216 bp for clone 3 and 456 bp for the 10 other clones.

```

1  GAA TTC GTA GAC ATC AAC ATT GCA TCT AAA GTC GCG GAT GCT TTC CAG AAG
   E F V D I N I A S K V A D A F Q K 17

52 AAT AAG GAG AAG ATT ACT ACT ACC GAC AAA CTG GGT ACT GCT CTC GAG CAG
   N K E K I T T T D K L G T A L E Q 34

103 GTT GCT TCC CAA TCA GAA AAG GCA GCT CCC CAA CTT TCT AAA ATG CTG ACG
   V A S Q S E K A A P Q L S K M L T 51

154 GAA GCT TCT GAT GTC CAT CAG CGT ATG GCC ACT GCC AGA AAG AAT TTC AAT
   E A S D V H Q R M A T A R K N F N 68

205 AGT GAG GTT AAT ACC ACC TTC ATT GAA GAT TTG AAA AAC TTC TTG AAC ACC
   S E V N T T F I E D L K N F L N T 85

256 ACG CTT AGC GAG GCC CAG AAA GCA AAG ACC AAG CTG GAG GAG GTT CGA CTA
   T L S E A Q K A K T K L E E V R L 102

307 GAT TTG GAC TCT GAC AAG ACT AAA TTG AAG AAT GCT AAG ACT GCG GAA CAG
   D L D S D K T K L K N A K T A E Q 119

358 AAG GCC AAG TGG GAG GCC GAG GTG CGA AAA GAC GAA AGT GAC TTC GAT CGA
   K A K W E A E V R K D E S D F D R 136

409 GTG CAC CAA GAA TCT CTT ACT ATC TTT GAG AAG ACT TGC AAA GAA TTC
   V H Q E S L T I F E K T C K E F 152

```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Eg6 cDNA clone.

Insert DNA from clone 6 was prepared following subcloning in the M 13 vector *EcoRI* site and used as a probe for hybridization to *E. granulosus* λ gt11 clones. Labeled Eg6 cDNA probe hybridized with clones 4–13. No hybridization signal was observed with clones 1, 2 and 3. These results suggested that clones 4–13 contained similar sequences and further sequence analysis confirmed the identity of these clones.

Sequence analysis of clone 6. A cDNA insert of clone 6 (Eg6) was subcloned in the M13 mp 18 vector and the nucleotide sequence (456 bp) was determined. 5' and 3' extremities probably corre-

sponded to internal *EcoRI* sites (unprotected during *EcoRI* methylase reaction), since no linker sequence was recovered. One open reading frame, in phase with the λ gt11 frame, encoded 152 amino acids with a calculated size of 17.3 kDa (Fig. 1). Computer analysis indicated a predominant α -helical secondary structure (more than 90%) of the considered peptide. Two putative glycosylation sites were found, at positions 72 and 84. No significant homology was observed with protein sequences found in consulted data bases. The highest score of homology (only 20%) was obtained when Eg6 protein (residues 10–126) was compared to the rabbit myosin heavy chain of

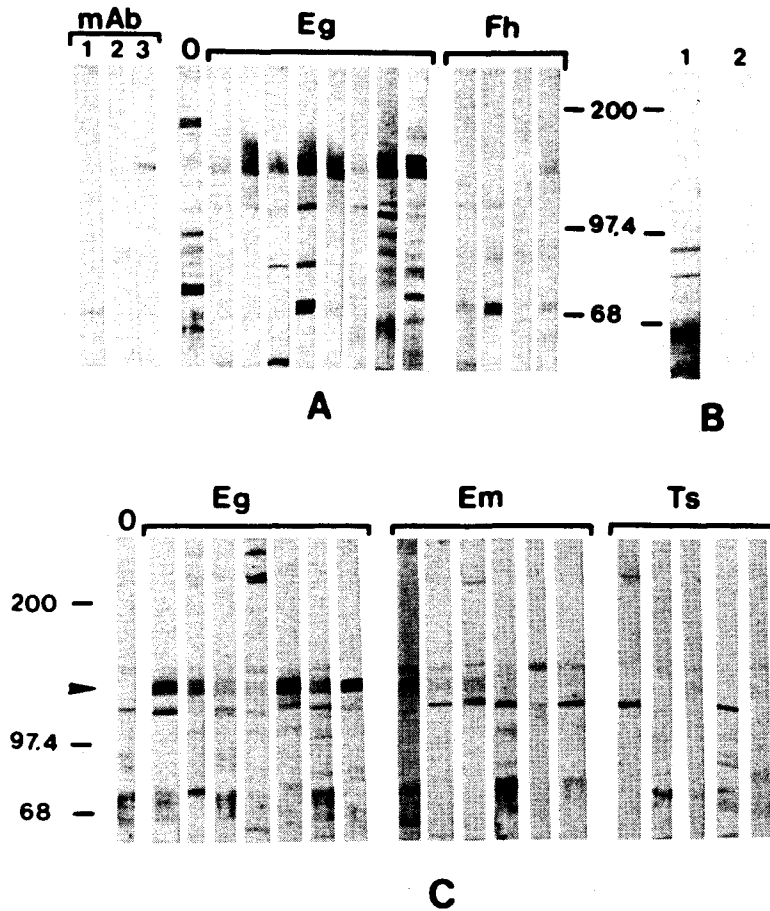


Fig. 2. SDS-PAGE and immunoblotting of extracts from Eg6 (A, C) or irrelevant (B) lysogenic bacteria with monoclonal antibodies and human sera. In two independent experiments (A, C), anti-*Toxoplasma gondii* IgG1 (mAb 1), SP20 myeloma ascitic fluid (mAb 2), EG 02154/12 monoclonal antibody (mAb 3) and sera from humans infected with *E. granulosus* (Eg), *Fasciola hepatica* (Fh), *E. multilocularis* (Em) or *Taenia saginata* (Ts) were analyzed. Normal human sera were used as controls (0). In B, a pool of 5 human hydatid sera (1) or EG 02154/12 monoclonal antibody (2) was analyzed.

skeletal muscle (residues 100–216) or that of cardiac muscle (residues 508–620).

Analysis of recombinant fusion protein expressed by Eg6 cDNA clone. SDS-PAGE analysis of bacterial lysates indicated that the apparent molecular weight (133 000) of the Eg6 fusion protein (FP6) was in agreement with the fusion of β -galactosidase with the 152 polypeptide (data not shown). The parasite specificity of FP6 was further studied by immunoblotting lysogen extracts with infected human sera. The results shown in Fig. 2 demonstrate that all *E. granulosus* human sera precipitating the antigen 5 recognize, with variable intensities, the 133-kDa band corresponding to FP6. Among 5 hydatidosis sera, negative in the antigen 5 IEP test, only one serum recognized the fusion protein (not shown). These results were corroborated by the finding that anti-antigen 5 EG 02 154/12 monoclonal antibody specifically bound to FP6. The cloned protein was also recognized by 4 out of the 6 *E. multilocularis* sera tested, but with lower intensities. In control experiments, sera from patients infected by other cestodes were used. Results indicated that 1 out of 4 *Fasciola hepatica* and 1 out of 5 *Taenia saginata* sera could detect the 133-kDa band weakly. Moreover, the monoclonal antibody and human hydatid sera did not show any reactivity with an extract from control λ gt11 lysogen.

Further study to confirm that the cloned antigen expressed an antigenic epitope of antigen 5 was carried out using antibody selection. Results presented in Fig. 3, indicated that antibodies eluted from FP6 were able to recognize in immunoblotting the 37–38-kDa antigen corresponding to one of the subunits of antigen 5 [13,14,25].

Discussion

Immunodiagnostic techniques of hydatidosis based on the detection of patient serum antibodies have provided evidence that antigen 5 is a major component of the human antibody response to *E. granulosus* [2]. Antibodies to antigen 5 are usually detected by immunoelectrophoresis using whole cyst fluid preparation, and the presence of arc 5 still remains the most important marker

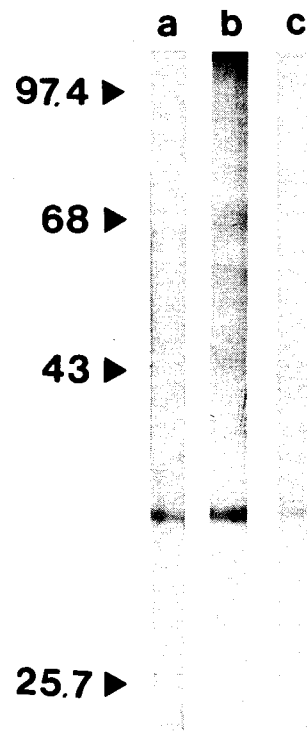


Fig. 3. Immunoblotting pattern of sheep hydatid fluid antigen analyzed in non-reducing conditions. Human hydatid serum (precipitating only the antigen 5 in IEP) (a), human hydatid serum (precipitating more than one component in IEP) (b) and antibodies selected from the human serum (used in b) by adsorption on FP6 (c) were studied.

for hydatidosis [3,6]. Several studies have been performed on the molecular characterization of the antigen [23–25] that corresponds to a 60-kDa Concanavalin A-binding lipoprotein composed of two subunits of 37 and 22 kDa [14]. If this component is largely considered to be specific for *E. granulosus*, some cross-reactivities should be observed with the closely related species *E. multilocularis* [7,8] and also with other helminths [9–11]. The presence of phosphoryl choline determinants in antigen 5 was recently shown to be involved in such cross-reactivity [13]. Moreover, false positive results from IEP tests could occasionally be due to the presence of significant amounts of host components in the cyst fluid preparation [12], thus stressing the need for a standardized antigen for diagnosis.

We have recently produced a panel of monoclonal antibodies against hydatid fluid and se-

lected one of them (EG 02154/12) for its specificity for antigen 5. Human hydatid sera specifically inhibited the binding of EG 02154/12 to the cyst fluid antigen and the absence of inhibition by sera from alveolar echinococcosis (*E. multilocularis*) and other parasitosis suggested that this monoclonal antibody could significantly improve the immunodiagnosis of hydatidosis. Moreover, the demonstration of the protein nature of the specific epitope indicated the particular immunogenicity of the antigen 5 protein fraction in human infection [14].

For all these reasons, we attempted to clone and sequence the considered proteic epitope. The cDNA library was screened with a pool of human hydatid sera and 13 positive clones were selected. One of these clones (Eg6) was shown to be recognized by the monoclonal antibody. It contained a 456-bp sequence coding for a 152-polypeptide chain essentially composed of α -helices. No indication about the nature of the parasite protein could be obtained by seeking homology with already known sequences found in current data bases. At this stage, our results do not unequivocally prove the link between the cloned protein and antigen 5 of *E. granulosus*. This still requires the complete gene coding for the cloned protein, as well as partial amino acid sequences of the native antigen 5.

Nevertheless, the presence of the *E. granulosus* specific epitope in the fusion protein was confirmed by immunoblotting experiments. EG 02154/12 antibody bound specifically to FP6 and the presence of antibodies to FP6 in human hydatid sera was correlated to their ability to immunoprecipitate antigen 5. Moreover, human antibodies eluted from the recombinant protein, could bind to the 37–38-kDa subunit of antigen 5 [13,14,25]. However, antibodies to FP6 could be detected in a few sera from patients infected by *E. multilocularis*, cestodes or trematodes, indicating that cross-reactive epitopes could still be expressed by the cloned protein. Therefore, such results prompted us to undertake the epitopic analysis of FP6. Using synthetic peptides, the definition of the specific epitope recognized by the monoclonal antibody and human hydatid sera is currently under investigation.

Acknowledgements

This work received financial support from INSERM and CNRS. We thank Dr. M. De Lourdes Sampaio Silva for providing us with human sera and protoscolexes.

References

- McManus, D.P. and Smyth, J.D. (1986) Hydatidosis: changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol. Today*, 2, 163–168.
- Capron, A., Vernes, A. and Biguet, J. (1967) Le diagnostic immunoelectrophoretique de l'hydatidose. *Les Journées Lyonnaises d'Hydatidologie*. (SIMEP Ed.) Lyon 27–40.
- Capron, A., Yarzabal, L., Vernes, A. and Fruit, J. (1970) Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine (bilan personnel à propos de 400 observations) *Pathol. Biol.* 18, 357–365.
- Williams, J.F., Perez-Escandi, M.V. and Oriol, R. (1971) Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in immunodiagnosis of human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 575–579.
- Farag, H., Bout, D. and Capron, A. (1975) Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) *Biomedicine*, 23, 276–278.
- Wattre, P., Capron, M., Bekhti, A. and Capron, A. (1980) Diagnostic immunologique de l'hydatidose, 139 observations. *Nouv. Presse Méd.* 9, 305–309.
- Yarzabal, L.A., Bout, D., Naquira, F. and Capron, A. (1977) Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63, 495–499.
- Varela-Diaz, V.M., Eckert, J., Rausch, R.L., Coltorti, E.A. and Hess, U. (1977) Detection of the *Echinococcus granulosus* arc 5 in sera of patients with surgically confirmed *Echinococcus multilocularis* infection. *Z. Parasitenk.* 53, 183–188.
- Varela-Diaz, V.M., Coltorti, E.A., Rickard, M.D. and Torres, J.M. (1977) Comparative antigenic characterization of *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* cyst fluids by immunoelectrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 23, 213–216.
- Varela-Diaz, V.M., Coltorti, E.A. and D'Alessandro, A. (1978) Immunoelectrophoresis tests showing *Echinococcus granulosus* arc 5 in human cases of *Echinococcus vogeli* and cysticercosis-multiple myeloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27, 554–557.
- Yong, W.K. and Health, D.D. (1979) Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*. *Parasite. Immunol.* 1, 27–38.
- Ben-Ismaïl, R., Carme, B., Niel, G. and Gentilini, M. (1980) Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens: role of anti-P1 antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 239–245.
- Shepherd, J.C. and McManus, D.P. (1987) Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25, 143–154.
- Chamekh, M., Facon, B., Dissous, C., Haque, A. and Capron, A. (1990) Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods.* 134, 129–137.

- 15 Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. and Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- 16 Watson, C.J and Jackson, J.F. (1985) An alternative procedure for the synthesis of double-stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vectors. In: *DNA Cloning. A Practical Approach*, (Vol. 1) (Glover, D.M., Ed.), pp. 79-88, IRL Press, Oxford.
- 17 Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- 18 Wahl, G.M., Stern, M. and Stark, G.R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 3683-3687.
- 19 Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 20 Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- 21 Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- 22 Smith, L.M., Sanders, J.Z.J., Kaiser, R.J., Hughes, P., Doon, C., Connel, C.R., Heiner, C., Kent, S.B.H. and Hood, L.E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674-679.
- 23 Bout, D., Fruit, J. and Capron, A. (1974) Purification d'un antigène de liquide hydatique. *Ann. Immunol.* 125, 775-788.
- 24 Piantelli, M., Pozzuoli, R., Arru, E. and Musiani, P. (1977) *Echinococcus granulosus*: identification of subunits of the major antigen. *J. Immunol.* 119, 1382-1386.
- 25 DiFelice, G., Pini, C., Afferni, C. and Vicari, G. (1986) Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen 5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 133-142.

ARTICLE 3

Valeur diagnostique d'un peptide synthétique dérivé d'une protéine recombinante d'*Echinococcus granulosus*.

Nous avons adopté la stratégie des peptides synthétiques pour définir le déterminant antigénique reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal et les sérums humains hydatiques.

La mise en évidence d'un deuxième clone (Eg14), reconnu par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12, nous a aidé à déterminer la structure de l'épitope spécifique, en comparant la séquence protéique des deux clones Eg6 et Eg14.

- L'alignement des deux structures a révélé l'existence d'une homologie restreinte à dix acides aminés non contigus.

- L'analyse de la structure secondaire de ces fragments a suggéré la possibilité d'une organisation hélicoïdale super enroulée, analogue à celle trouvée pour la myosine. Cette structure a été confirmée par l'analyse de la répartition des résidus hydrophobes (Hydrophobic Cluster Analysis) dans une représentation bidimensionnelle.

- La représentation des deux séquences, sous la forme d'une hélice, a permis d'observer des similitudes topographiques formées par la juxtaposition spatiale des acides aminés non adjacents. Cette homologie conformationnelle pourraient expliquer leur réactivité commune avec l'anticorps monoclonal.

- La zone de similitude topographique a été mimée, à partir de la séquence du clone Eg6, par un peptide synthétique de 34 acides aminés organisés en α -hélice.

- Ce peptide est capable d'inhiber, de façon significative, la fixation de l'Ac monoclonal et des sérums humains hydatiques à la protéine recombinante FP6 ou aux antigènes natives du liquide hydatique.

- L'intérêt diagnostique de ce peptide a été évalué, en ELISA, par l'exploration de la réponse anticorps (IgG-A-M et IgE) de différents patients.

**Diagnostic value of a synthetic peptide derived from
Echinococcus granulosus recombinant protein**

M. Chamekh*, H. Gras-Masse‡, M. Bossus‡, B. Facon*, C. Dissous*, A. Tartar‡
and A. Capron*.

* *Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM
U167-CNRS 624, Institut Pasteur, BP 245, 59 019 Lille Cedex, France.*

‡ *Service de Chimie des Biomolécules, CNRS-URA 1309, Institut Pasteur, BP
245, 59 019 Lille Cedex, France.*

SUMMARY

A monoclonal antibody (EG 02 154/12) specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 was used to screen a cDNA library constructed from *E. granulosus* protoscoleces mRNA. One clone designated Eg14 was selected and shown to code for an amino acid sequence partially homologous to that of the clone Eg6 previously identified with the same mAb (8). Hydrophobic Cluster Analysis showed that both recombinant antigens may adopt a similar α -helical organization and share a common conformational epitope. A synthetic peptide (89-122) mimicking the conformational site of the Eg6 fusion protein (FP6) was constructed and demonstrated to be able to inhibit binding of the mAb and human hydatid sera to FP6 or to native hydatid antigens. To assess the diagnostic value of the peptide 89-122, we tested sera from patients infected with different parasites for their antibody reactivity with this peptide in ELISA. A high binding sensitivity and specificity of IgG-A-M antibodies were obtained with *E. granulosus* infected patient sera. Moreover, the peptide 89-122 was found to be specifically recognized by IgE antibodies from patients with hydatid disease. These results indicate the particular interest of this synthetic peptide as a standardized antigen in diagnosis and treatment surveillance of hydatidosis.

Key words: recombinant protein, monoclonal antibody, Hydrophobic Cluster Analysis, α -helical organization, synthetic peptide, immunodiagnosis of hydatidosis

INTRODUCTION

Hydatidosis, caused by the larval stage of the tapeworm *Echinococcus granulosus*, is one of the major public health problems in many areas of the world (1). Because the symptoms vary according to the location of the parasite and its rate of growth, the clinical diagnosis of hydatidosis in man is often very difficult. The need therefore exists for immunodiagnostic procedures, both for the detection of cases for early treatment and the evaluation of progress in hydatidosis control programmes.

Among hydatid cyst fluid antigens (HCF Ag) used in diagnosis of hydatid disease, antigen 5 has been shown to contain epitope(s) with high specificity to *E. granulosus* (2). Hydatidosis is associated with immediate-type hypersensitivity (3, 4) and patients with living *E. granulosus* cysts were found to have a higher concentration of IgE antibodies to HCF Ag. Among these, antigen 5 is the major one combining with reaginic antibodies (5). Also, the evaluation of specific IgE in hydatidosis is considered as useful addition to the classical serodiagnostic tests (5, 6).

Despite important progress made in the improvement of sensitivity of various diagnostic methods, the variability of the source of hydatid fluid antigens as well as the possibility that hydatid fluid can contain host serum components remain the two major problems of effective diagnosis. This stresses the need for a standardized antigen such as a defined *E. granulosus* gene product. We have previously described (7) the specificity of protein epitope(s) of *E. granulosus* antigen 5 defined by a mouse monoclonal antibody (EG 02 154/12) and recognized by human hydatid sera. Recently, we reported the molecular cloning of an *E. granulosus* protein expressing

the specific epitope of antigen 5 (8). The Eg6 fusion protein (FP6) was recognized by EG 02 154/12 mAb and human hydatid sera but few sera from patients infected with other cestodes remained cross-reactive with the cloned protein.

Here, we report the molecular cloning and sequencing of a second *E. granulosus* protein identified by EG 02 154/12 mAb. Comparative analysis of the structure of both fusion proteins indicated that they had several common features: a high helical propensity, a similar repartition of hydrophobic residues, strongly evocative of α -helical coiled coil structure and a common topographical pattern that could explain their common reactivity with EG 02 154/12 mAb. These data prompted us to select and synthesize a peptide able to mimic the organization and antigenicity of the recombinant antigens. Finally, human antibody response to this peptide was evaluated with the aim to assess its diagnostic value.

MATERIALS AND METHODS

Parasite antigens and sera

Hydatid cyst fluid (HCF) was aseptically aspirated from cysts of *E. granulosus* collected from sheep livers and lungs, centrifuged at 40 000 x g, dialyzed against distilled water and then lyophilized. Protoscoleces were recovered by sedimentation, washed in 0,15 M NaCl, frozen and stored in liquid nitrogen. Patient sera were obtained from the diagnosis laboratory of the Pasteur Institute (Lille, France). Diagnosis was confirmed by parasitological and serological examination. Mouse monoclonal IgG₁ antibody (EG 02 154/12) raised against antigen 5 was previously characterized (7).

λ gt11 expression library

Using a modified method of Chirgwin et al. (9), total RNA was isolated from *E. granulosus* protoscoleces as previously described (8). Double-stranded cDNA was synthesized from 300 μ g of total RNA (10) and cloned into the *Eco*RI site of the λ gt11 vector (8). The expression library was screened with EG 02 154/12 mAb. After incubation with HRP-conjugated anti-mouse IgG (Diagnostic Pasteur), staining was performed with 4-chloro-1-naphtol reagent.

Western blotting

Y1089 lysogenic bacteria were selected on the basis of their temperature sensitivity and bacterial extracts were analyzed in SDS-PAGE

under reducing conditions (11). Western blotting was performed according to Towbin et al. (12).



Nucleotide sequencing.

cDNA inserts were subcloned in the M13 mp18 vector and both DNA strands were sequenced by the dideoxy chain termination reaction of Sanger et al. (13) using dyelabeled primers (14). Fluorescence of DNA fragments was detected by a 370A DNA sequencer (Applied Biosystems). The amino acid comparison was made using Swissprot (Switzerland) and NBRF (Washington DC, USA) protein sequence database.

Peptide synthesis

Peptide was synthesized by stepwise solid-phase method (15) in an automated peptide synthesizer (Applied Biosystems model 430 a, Foster city, CA), according to the BOC-TFA protocole, on a benzhydrylamine resin (Applied Biosystems). Trifunctionnal amino-acids were protected as follows: Arg (Tos), Asp (OBzl), Glu (OBzl), Lys (2-ClZ), Ser (OBzl). Amino-acids were introduced using symetric anhydride activation in DMF (single coupling), except for Gln, which was introduced using the DCC/HOBt activation protocol. Final deprotection and cleavage of the peptidyl resins was by high HF procedure, for 1h at 0°C. The cleaved deprotected peptide was precipitated with cold diethylether and then dissolved in 5% acetic acid and lyophilized. Crude peptide was purified by gel filtration (TSK HW40S, Merck), followed by reversed phase HPLC on a 5 μ , 300 A Nucleosil C18 (Macherey Nagel) column (0.5 inch x 500 mm), using a very resolute three hours gradient from buffer A1 (0.5% TFA in water) to 60% buffer B1 (0.5% TFA: 75% acetonitrile: 25% water), flow rate 2 ml/mn. Hydrochloride

form of the peptide was obtained using a step gradient procedure from buffer A2 (pH 3 HCL in water) to buffer B2 (pH 3 HCL 50%: isopropanol 50%), on a 5 μ , 300 A Nucleosil C18 column (0.5 inch x 75 mm). Peptide was checked for homogeneity by analytical RP-HPLC and for identity by amino-acid analysis, and molecular mass determination.

Circular Dichroism (CD) studies

CD spectra were recorded on a Roussel jovan 185 Model II at room temperature. Peptides concentrations were adjusted from titration of stock solutions by quantitative amino-acid analysis after total acid hydrolysis. CD studies were performed on the hydrochlorides form of the peptide, 10 mM in NaCl 200 mM in cell path of 0,1 mm, or 1 mM in TFE M in cell path of 1 mm. Circular dichroism results were reported in terms of mean residue ellipticity (θ) expressed in deg. dmole⁻¹. cm². Helix contents were calculated from the CD spectra, taking (θ)₂₂₂ = - 35, 700 deg. dmole⁻¹. cm² for 100% helicity.

ELISA and inhibition tests

Plates (Nunc) were coated with 100 μ l of HCF Ag or lysogenic bacterial extract (FP6) at 5 μ g/ml of proteins. Human sera were used at 1/100 dilution and bound antibody was detected with HRP-conjugated anti-human IgG-A-M (Diagnostic Pasteur). For inhibition experiments, human sera or EG 02 154/12 mAb were preincubated overnight at 4°C with different concentrations of synthetic peptides.

ELISA-IgE was performed with human sera diluted at 1/10 and the

peptide 89/122 was coated at 1 μ g per well. Mouse IgG₁ anti-human IgE was purchased from Southern Biotechnology Associates, Inc (Birmingham, UK). Values were expressed in optical density (OD) at 492 nm \pm standard deviation (SD).

RESULTS

1) Selection and sequence analysis of cDNA clones recognized by the monoclonal antibody (EG 02 154/12).

The specific monoclonal antibody to antigen 5 was used to screen the cDNA library constructed from *E.granulosus* protoscoleces mRNA. In addition to the Eg6 clone previously characterized (7), a second clone designated Eg14 was selected and further studied. The Eg14 clone contained a DNA insert of 137 bp and exhibited one open reading frame, in phase with the λ gt11, encoding for 37 aminoacids. Both sequences were represented using the hydrophobic cluster analysis plot described by Lemesle-Varloot et al. (16)(Fig 1B and 1C). This method, together with more conventional methods for the prediction of secondary structure, suggest an organization in the form of helical stretches. The longitudinal distribution of the hydrophobic cluster along the helical plot is strongly evocative of an α -helical coiled-coil structure, such as the well known rabbit myosin heavy chain of skeletal muscle (Fig 1A).

Beside these common structural properties, the Eg14 and Eg6 clones showed limited sequence homologies (Fig 2). However, on the graphic representation, these discontinuous sequence homologies formed two topographical patterns, present on both fragments, that could explain the cross-reactivity observed with the EG 02 154/12 mAb.

In addition, the high proportion of charged or polar residues in these homologous structures could account for their presence in predominantly exposed areas on the native antigen.

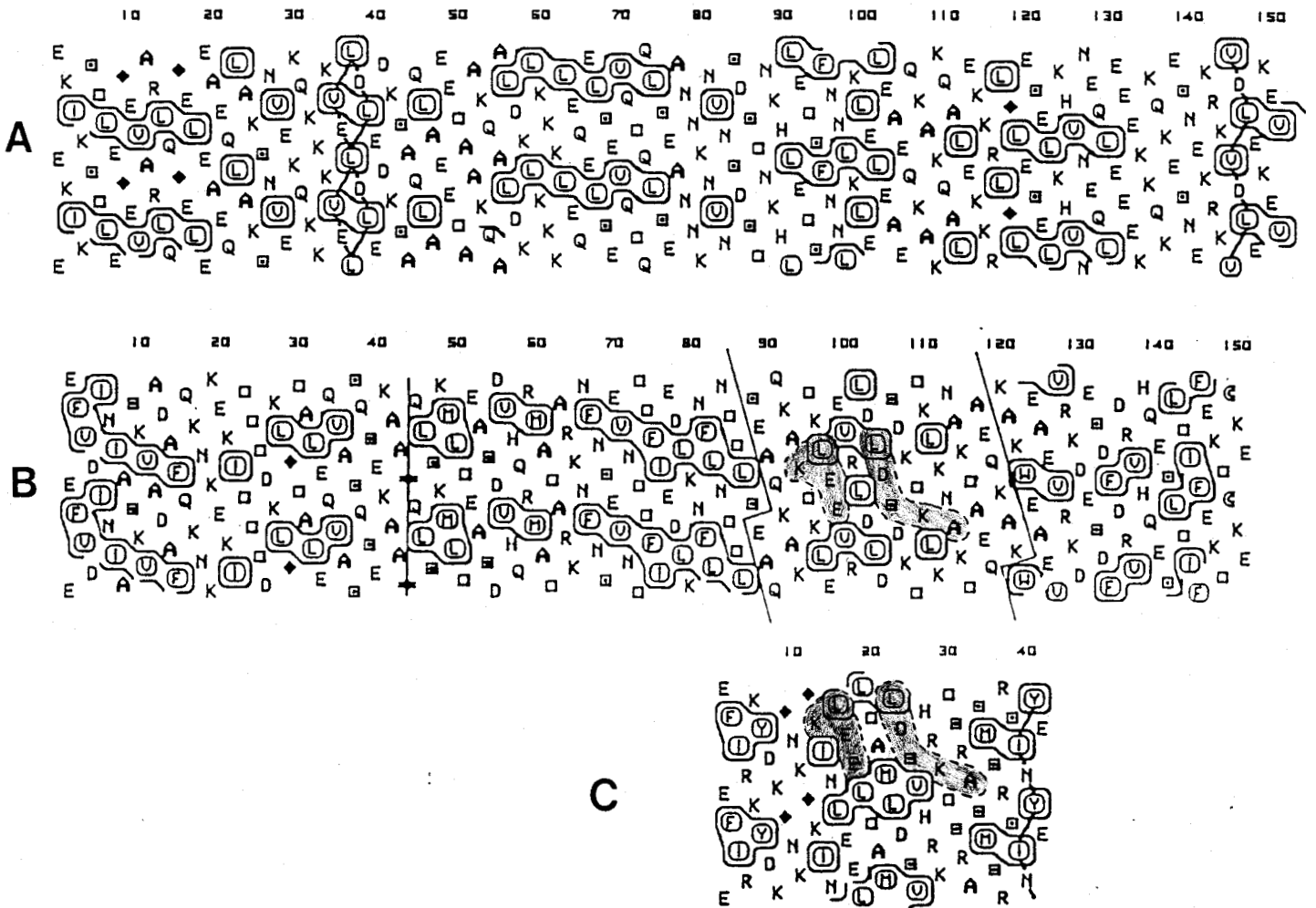


Figure 1 : Hydrophobic Cluster Analysis (HCA) plot of rabbit myosin heavy chain of skeletal muscle (A), Eg6 (B) and Eg14 (C) recombinant proteins. Adjacent hydrophobic residues are contoured. Some residues are represented by symbols: P (*), G (◆), T (□), S (▣). The homology of topographical pattern between Eg6 and Eg14 is shaded.

1 EFIRKYDKGNKGKINLEELTAMLDVHRKTSRASMSR 37 Eg 14
* * *** * *
80 FLNTTLEAOKAKTKLEEVRLDLSDKTKLKNAKTAEOKAK 122 Eg 6

Figure 2 : Amino-acid sequence of **Eg14** and homology with clone **Eg6**.
The identical amino-acid are indicated by asterisks.

2) Selection of a synthetic peptide antigen

Helical organization can be conveniently mimicked by long peptides. We therefore selected and synthesized a 34 amino-acid peptide, copying the Eg6 clone sequence from amino-acid 89 to 122 (Fig 2) and encompassing both homologous patches (Fig 1B). In order to introduce stabilizing charge interactions between extremities of this peptide designated 89-122 and the helix dipole (17), the N-terminal end was a negatively charged glutamic residue while the c-terminal end was a positively charged lysine residue.

3) Helicity of peptide 89-122

The helical organization of the peptide was assessed by circular dichroism studies, performed at room temperature, in aqueous or aqueous-trifluoroethanol solution (Fig. 3). As expected, both spectra were characteristic of a significant helical organization, with minima occurring at 202-207 nm and 222-223 nm, and a positive value near 190 nm. Taking $\theta_{222} = -35\ 700$ deg cm²/dmole for 100% helicity, we calculated a 14% helix content in aqueous medium, and a 74% helix content in aqueous trifluoroethanol medium.

4) Binding inhibition of EG 02 154/12 mAb and human hydatid sera to FP6 or to HCF Ag by a synthetic peptide

The peptide 89-122 was used in ELISA inhibition experiments to assess its capacity to inhibit binding of the mAb and human hydatid sera to FP6 or to HCF Ag.

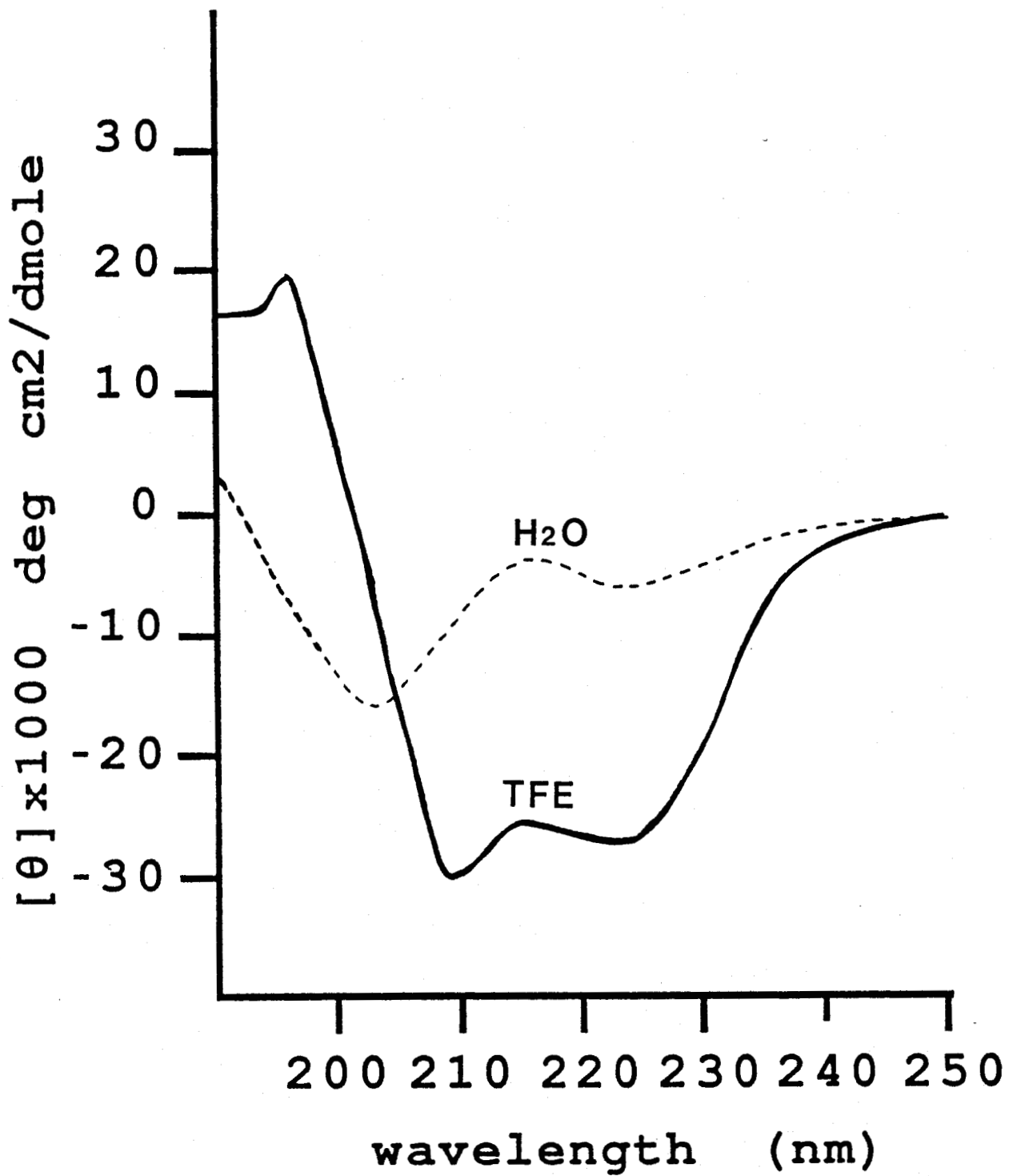


Figure 3 : Circular dichroism spectra of the peptide 89-122 in water and in trifluoroethanol (TFE).

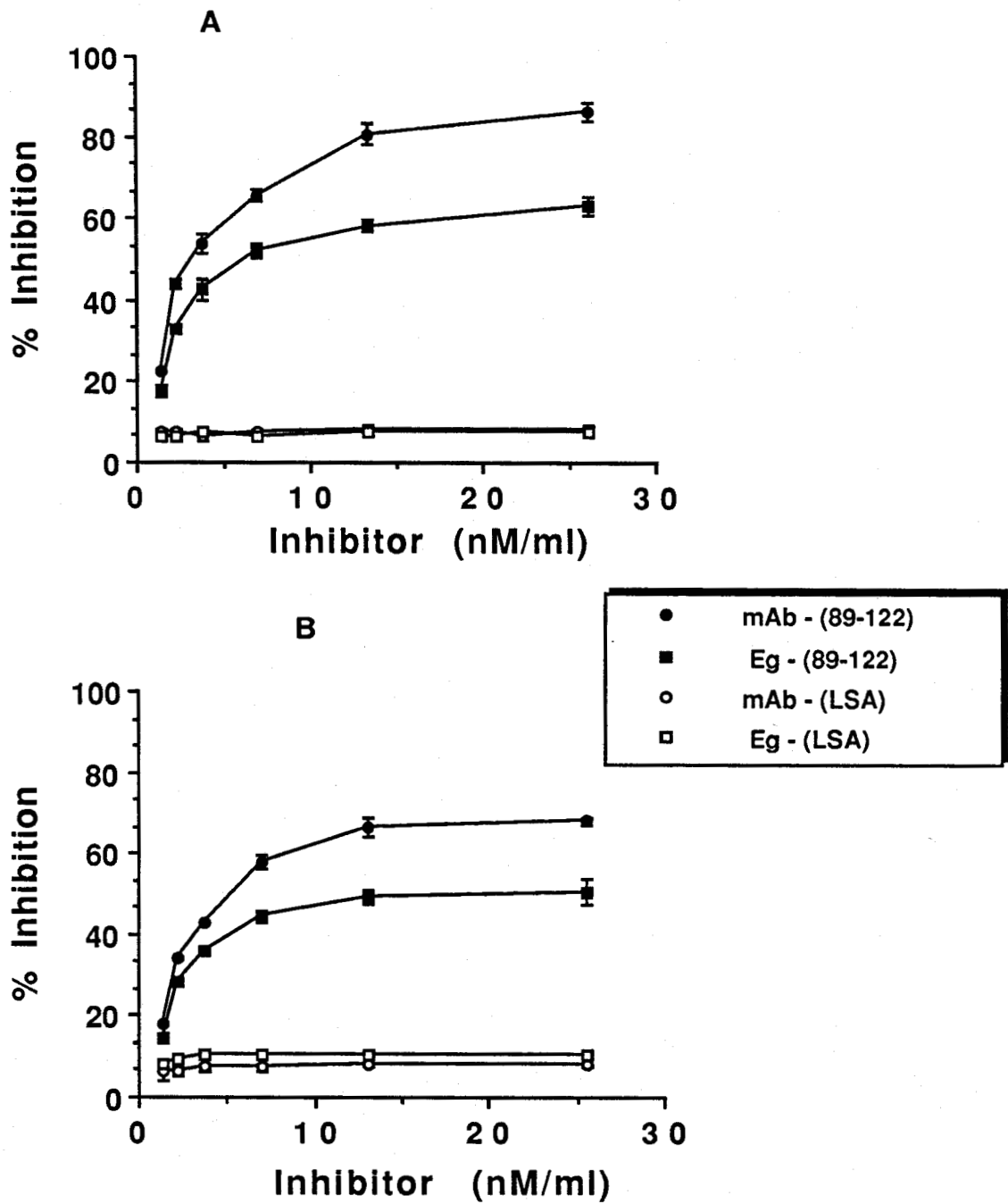


Figure 4 : Binding inhibition of EG 02 154/12 monoclonal antibody (mAb) and human hydatid sera (Eg) to the fusion protein FP6 (A) or to hydatid cyst fluid antigens (B) by the synthetic peptide 89-122. A peptide corresponding to the liver-stage antigen of *P. falciparum* (LSA) was used as a control.

As shown in Fig. 4A, strong binding inhibitions of the mAb (80%) and human hydatid sera (60%) to FP6 were obtained with the peptide 89-122. This structure was also able to significantly inhibit the binding of these antibodies to HCF Ag (65 and 45% respectively) (Fig. 4B). As expected, the binding inhibition was more effective for the mAb than for human hydatid sera. No significant inhibition was observed with an unrelated helix-forming (41 amino-acids) synthetic peptide (18) corresponding to the *P. falciparum* liver stage antigen (LSA)(19).

These results suggested that the peptide 89-122 was able to mimic binding site(s) recognized by the mAb and human hydatid sera. Further study of human sera reactivity to this peptide was thus undertaken.

5) Human antibody response to the synthetic peptide 89-122

The reactivity of sera from patients infected with *E. granulosus* or other parasites to the peptide 89-122 used as a solid phase antigen was evaluated by ELISA experiments.

Using different dilutions, results in Fig. 5 show that a significant antibody binding occurred only with anti-*E. granulosus* sera. Binding levels of anti-*E. multilocularis*, anti-*T. saginata* and anti-*S. mansoni* sera were lower as was that of normal human sera. Tested against an unrelated synthetic peptide (LSA), all these sera gave a similar low level of background (not shown).

ELISA experiments were also performed to assess the immunodiagnostic value of the peptide 89-122. Two types of human antibody response (IgG-A-M and IgE) were analysed.

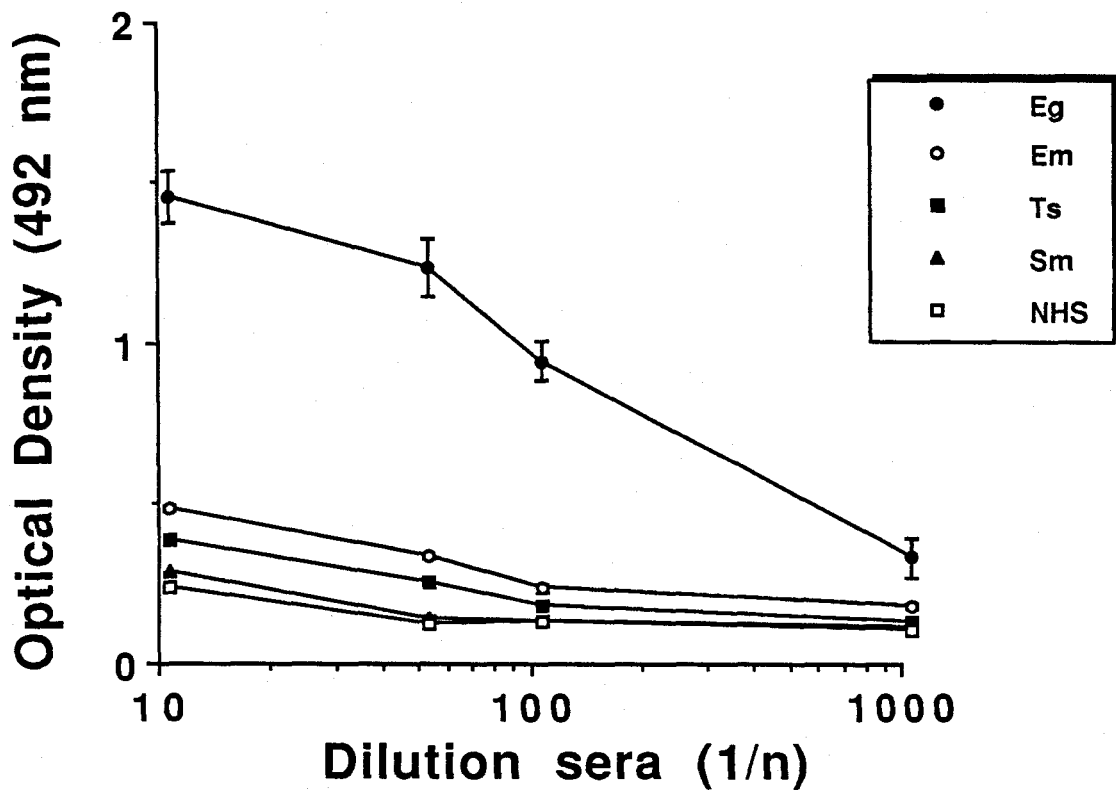


Figure 5 : Reactivity of IgG-A-M of various human sera with the synthetic peptide 89-122 used as a solid-phase antigen in ELISA. Results represent a mean \pm SD of 4 different human sera : anti-*E. granulosus* (**Eg**), anti-*E. multilocularis* (**Em**), anti-*T. saginata* (**Ts**), anti-*S. mansoni* (**Sm**), and normal human sera (**NHS**).

Using the upper limit of positive values as three standard deviations above the mean of the control group, a high binding sensitivity (85%) and a good specificity (86%) were observed in IgG-A-M response analysis (Fig. 6). When we compared these results to that obtained with FP6 in westernblotting (Table I), we could observe an improvement of the specificity indicating the particular interest of the peptide 89-122 for diagnosis of hydatid disease.

More interestingly, IgE response to the peptide 89-122 showed a high specificity (100%) for *E. granulosus* infected patients (Table I). No IgE reactivity could be detected with 52 sera from other parasitic diseases whereas 60% of human hydatid sera (24/40) were positive in this ELISA-IgE test.

Using an unrelated synthetic peptide (LSA) as a control, no significant reactivity was obtained in both ELISA-tests (not shown).

The sensitivity and specificity of this test were compared to ELISA-IgE performed with whole hydatid fluid antigens (Fig 7). The reactivity of IgE to the peptide 89-122 seems to be more specific (100%) for *E. granulosus* while 32% (6/19) of cestode-infected sera cross-reacted with HCF Ag. IgE antibodies from 29 of 40 (72%) *E. granulosus*-infected patient sera were found to react with HCF Ag. The sensitivity of ELISE-IgE observed with the peptide 89-122 (60%) remained important in comparison with that obtained with native hydatid antigens.

Human sera	IgG-A-M-WB*-FP6		ELISA-peptide 89-122		
	no. (%) positive	IgG-A-M positive sera		IgE positive sera	
		no. (%)	OD(492 nm) Mean \pm SD	no. (%)	OD(492 nm) Mean \pm SD
Hydatidosis (n = 40)	34 (85)	34 (85)	1,18 \pm 0,52	24 (60)	0,7 \pm 0,24
Alveolar echinococcosis (n = 14)	4 (28,5)	2 (14)	0,4 \pm 0,14	0 (0)	—
Taeniasis (<i>T. saginata</i>) (n = 5)	1 (20)	0 (0)	—	0 (0)	—
Schistosomiasis (n = 18)	2 (11)	0 (0)	—	0 (0)	—
Toxoplasmosis (n = 15)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	—
Normal human sera (n = 10)	0 (0)	0 (0)	—	0 (0)	—

* Westernblotting performed using peroxidase-conjugated anti-IgG-A-M

Table I : Sensitivity and specificity of peptide-ELISA (IgG-A-M and IgE) and westernblotting-Fusion protein (FP6) using different human sera.

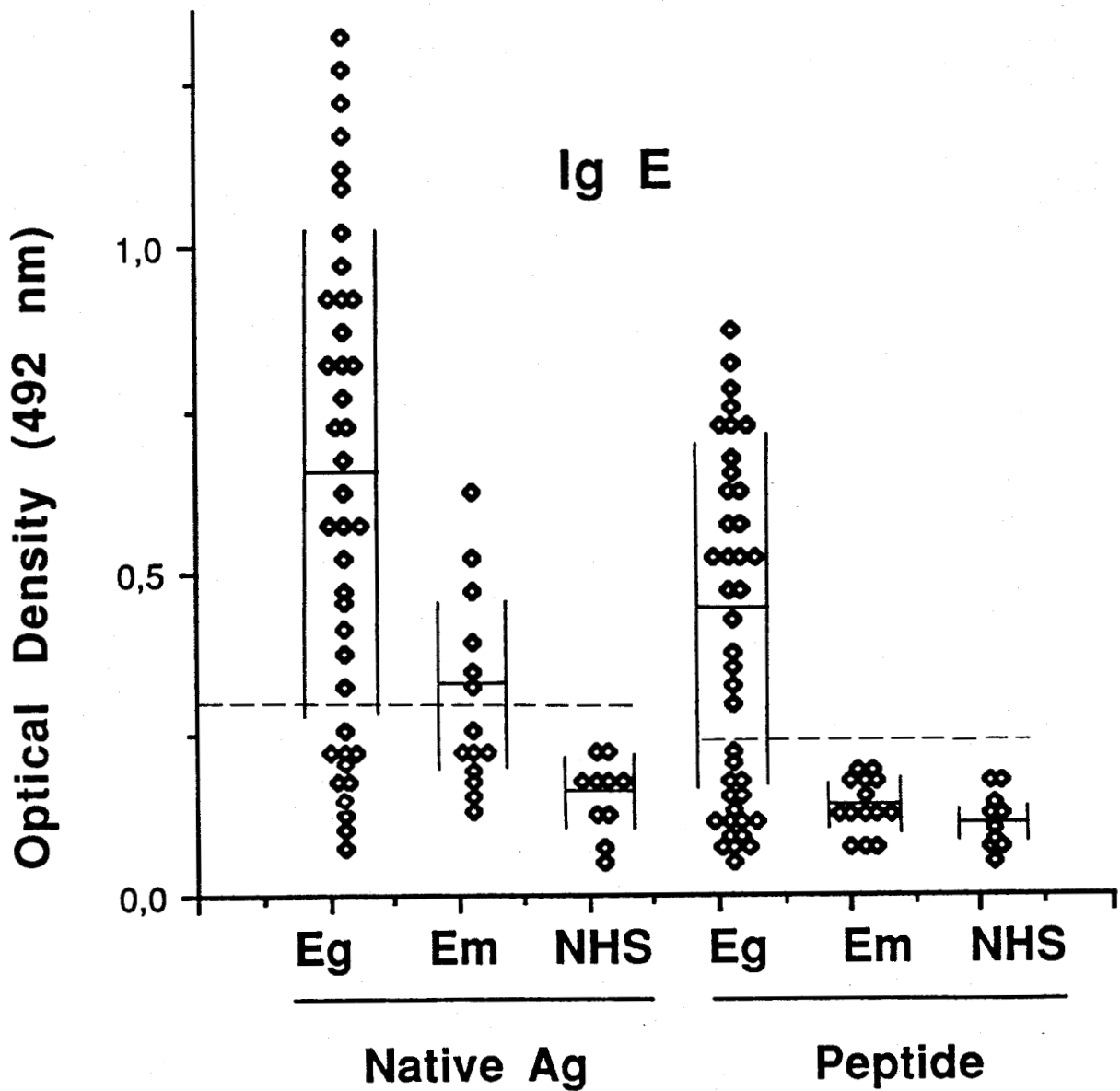


Figure 7 : Distribution of ELISA-IgE reactivity of *E. granulosus* (Eg), *E. multilocularis* (Em), *T. saginata* (Ts)-infected patient sera and normal human sera (NHS) with the peptide 89-122 and hydatid cyst fluid antigens (Native Ag). Values above the line (----) were considered positive.

DISCUSSION

Immunodiagnosis of hydatidosis has been based, during the last two decades, on the detection of circulating antibodies to antigen 5, the major immunogen of *E. granulosus* (2, 20, 21).

With the development of new tests with increased sensitivity, there remains the possibility of false positive reactions assigned mainly to host serum components which could pass through cyst membranes (22, 23, 24). Molecular characterization of *E. granulosus* antigens could contribute to the resolution of such problems.

We have previously demonstrated a particular immunogenicity and specificity of a protein epitope on the native antigen 5 (7). Binding of human antibodies from patients with hydatid disease to this epitope is specifically inhibited by EG 02 154/12 mAb raised against the antigen 5.

With the aim of producing a recombinant antigen for diagnosis of hydatid disease, we have isolated and characterized an *E. granulosus* recombinant protein expressing an immunogenic epitope target of human hydatid sera and EG 02 154/12 mAb (8).

Further screening of the cDNA library with the mAb allowed the isolation of a second clone (Eg14). The latter has no homology with the two known cloned *E. granulosus* antigens which may be involved in protecting the parasite from the host immune system (25, 26). Also no significant homology can be observed with other published sequences. However, when compared to Eg6, Eg14 clone showed a limited amino acid sequence homology.

Recent work regarding assessment of secondary and tertiary structure of proteins from their amino acid sequence have proved that

Hydrophobic Cluster Analysis is a very efficient method of analysing and comparing protein sequences (27). This method has been applied to obtain structural and functional information for a large number of proteins (16).

Using this procedure, Eg6 and Eg14 clones identified by EG 02 154/12 mAb showed a similar repartition of hydrophobic clusters, strongly evocative of α -helical coiled-coil organization. A common discontinuous epitope formed by both sequences could explain their reactivity with the same monoclonal antibody. According to the recent report of Gras-Masse et al. (28), helical organization of synthetic peptides play an important role in their immunogenicity and antigenicity.

Despite the large number of cloned parasite antigens, very little is known regarding immunogenic and antigenic properties of conformational peptides from parasites. Such a study has been recently attempted with *P. falciparum* liver stage antigen, the LSA (18, 19).

As verified by circular dichroism studies performed in aqueous and trifluoroethanol solutions, the peptide 89-122 was actually able to adopt an helical organization. Furthermore, the peptide 89-122 was first tested in ELISA for its ability to inhibit the binding of the EG 02 154/12 mAb to the fusion protein Eg6 or to the native HCF Ag. The strong inhibition capacities observed confirmed both the hypothesis of a correct folding of the peptide during interaction with antibodies and the occurrence, within its 34 amino-acids, of a major epitope recognized by the monoclonal antibody.

When used as inhibiting antigen towards the binding of human hydatid sera to the native hydatid cyst fluid antigen, the peptide 89-122 was able to inhibit as much as 50% of the reaction. This result could be explained by the existence of several copies of identical or closely-related, cross-reactive, epitopes in the native antigen that are mimicked by the synthetic peptide.

This explanation is in agreement with the structural hypothesis of a periodic, myosin-related structure. Indeed, the observed ability of the EG 02 154/12 monoclonal antibody to precipitate antigen 5 in immunoelectrophoresis (7) provide an additional argument in support of this hypothesis.

We have previously reported (8) that the capacity of human hydatid sera to recognize FP6 in westernblotting is correlated with their ability to precipitate antigen 5 in immunoelectrophoresis. Also, human antibodies eluted from FP6 could bind to one subunit of antigen 5 (8). Testing the same sera for their reactivity in ELISA-IgG-A-M with a peptide 89-122 derived from FP6, we have found the same correlation. Moreover, the cross-reactions observed with FP6 have decreased with the use of a peptide 89-122 in ELISA. This synthetic peptide appears to mimick probably one of the specific epitopes of antigen 5.

The isotypic profile of human antibody response to HCF Ag has been shown to have an interesting prognostic role in hydatidosis (29, 30, 31).

According to Dessaint et al.(5), a higher concentration of specific IgE antibodies is detected in patients with living *E. granulosus* cysts. The IgE level seems to decrease with the loss of viability of the cysts after treatment of hepatic hydatid disease with mebendazole (32).

In view of this important IgE response, immediate-type hypersensitivity test, also known as Casoni test (33), has contributed to the immunodiagnosis of hydatidosis (3, 4, 34), although, the use of whole HCF Ag leads to false positive reactions with other helminthiasis (35, 36).

Among *E. granulosus* antigens identified as allergens (37, 38, 39), antigen 5 is a major antigen reacting with reaginic antibodies (5). Using the

peptide 89-122 as a solid-phase antigen in ELISA, we could demonstrate that IgE antibodies from 60% of hydatid patient sera bound specifically to this peptide. Such sensitivity remained important in comparison with that obtained with HCF Ag (72%). These data suggest that the peptide 89-122 may represent one major hydatid allergen binding-site recognized by reaginic antibodies from hydatid patient sera.

A quantitative determination of specific IgE antibodies to the peptide 89-122 in terms of clinical cases of different hydatid patients needs to be investigated. Also, the use of this peptide as a standardized antigen in immediate-type hypersensitivity test should be of value for the diagnosis of hydatidosis both in man and animals. Such a test may prove a useful adjunct to detection of specific antibody against this defined peptide in serodiagnosis and treatment surveillance.

REFERENCES

1. Gemmel, M.A., J.R. Lawson, and M.G. Roberts. 1987. Towards global control of cystic and alveolar hydatid diseases. *Parasitol. Today*. 3, 5:144-151.
2. Capron, A., J. Biguet, A. Vernes, and D. Afchain. 1970. Le diagnostic immunologique de l'echinococose humaine (bilan presonnel à propos de 400 observations). *Pathol. Biol.* 18:357-365.
3. Capron, A., A. Vernes, J.P. Dessaint, and M. Capron. 1976. Contribution à l'etude de l'hypersensibilité dans l'echinococose hydatique. A propos de 111 observations. *Rev. Franç. Allergol.* 16, 1:9-15.
4. Yarzabal, L. A., P. M. Schantz and M. H. Lopez-Lemes. 1975. Comparative sensitivity and specificity of the Casoni intradermal and the immunoelectrophoresis tests for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:283.
5. Dessaint, J.P., D. Bout, P. Watre, and A. Capron. 1975. Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology*. 29:813-823.
6. Afferni, C., C. Pini, P. Misiti-Dorello, L. Bernardini, M. Conchedda, and G. Vicari. 1984. Detection of specific IgE antibodies in sera from patients with hydatidosis. *Clin. exp. Immunol.* 55:587-592.

7. Chamekh, M., B. Facon, C. Dissous, A. Haque, and A. Capron. 1990. Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Methods.* 134:129-137.
8. Facon, B., M. Chamekh, C. Dissous, and A. Capron. 1991. Molecular cloning of an *Echinococcus granulosus* protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45:233-239.
9. Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. Mac Donald, and W.J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18:5294-5299.
10. Wattson, C.J., and J.F. Jackson. 1985. An alternative procedure for the synthesis of double-stranded cDNA for cloning in phage and plasmid vectors. In: *DNA Cloning. A Practical Approach, (Vol. 1) (Glover, D.M., Ed.), pp. 79-88, IRL Press, Oxford.*
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
12. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
13. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.

14. Smith, L.M., J.Z.J. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Doon, C.R. Connel, C. Heiner, S.B.H. Kent, and L.E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 321:674-679.
15. Merrifield, R.B. 1963. Solid-phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2155.
16. Lemesle-Varloot, L., B. Henrissat, C. Gaboriaud, V. Bissery, A. Morgat, and J.P. Mornon. 1990. Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie*. 72:555-574.
17. Shoemaker K. R., P. S. Kim, E. J. York, J. M. Stewart and R. L. Bladwin. 1987. Tests of the helix dipole model for stabilization of α -helices. *Nature*. 326:563-565.
18. Arturo Londono J., Gras-Masse H., C. Dubeaux, A. Tartar, and P. Druilhe. 1990. Secondary structure and immunogenicity of hybrid synthetic peptides derived from two *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens. *J. Immunol.* 145:1557-1563.
19. Guerin, C., P. Druilhe, B. Galey, J. A. Londono, J. Patarapotikul, R. L. Beaudoin, A. Tartar, O. Mercereau-Puijalon and G. Langsley. 1987. A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature* 329:164-169.
20. Williams, J.F., M.V. Perez-Esandi, R. Oriol. 1971. Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in the immunodiagnosis of human infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20:575-579.

21. Farag, H., D. Bout, and A. Capron. 1975. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Biomedicine*. 23:276-278.
22. Cameron, G.L., and J.M. Staveley. 1957. Blood group P substance in hydatid cyst fluids. *Nature*.179:147-149.
23. Ben-Ismael, R., B. Carme, G. Niel, and M. Gentilini. 1980. Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens. Role of anti-P1 antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19:239-245.
24. Shepherd, J.C., and D.P. McManus. 1987. Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 25:143-154.
25. Lightowers, M.W., A. Haralambous, and M.D. Rickard. 1989. Amino acid sequence homology between cyclophilin and a cDNA-cloned antigen of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36:287-290.
26. Shepherd, J.C., A. Aitken, and D.P. McManus. 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44:81-90.
27. Gaboriaud C., V. Bissery, T. Benchetrit, and J.P. Mornon. 1987. Hydrophobic Cluster Analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* 224:149-155.

28. Gras-Masse H., M. Jolivet, H. Drobecq, J.P. Aubert, E.H. Beachey, F. Audibert, L. Chedid, and A. Tartar. 1988. Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Mol. Immunol.* 25:673-678.
29. 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. *Parasit. Immunol.* 8:171-188.
30. Pinon, J.M., J. Poirriez, H. Lapan, R. Geers, R. Penna, D. Fernandez. 1987. Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by Enzyme-Linked Immuno-Filtration Assay. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6,3:291-295.
31. Sampaio Silva, M. de L., J. David Moraes, P. Watre, et M.L. Bermonte. 1989. Apport du dosage radioimmunometrique des anticorps IgG, IgA et IgE au diagnostic et à la surveillance de l'hydatidose humaine. A propos de 75 cas. *Med. Mal. Inf.* 19,6/7:367-371.
32. Bekhti, A., J.P. Schaaps, M. Capron, J.P. Dessaint, F. Santoro, and A. Capron. 1977. Treatment of hepatic hydatid disease with mebendazole: preliminary results in four cases. *Br. Med. J.* 2:1047-1051.
33. Casoni, T. 1911. La diagnosi biologica de l'echinococcosi umana mediante l'intradermoreazione. *Fol. clin. chem. microbiol.* 4:5-16.

34. Williams J. F. 1972. An evaluation of the Casoni test in human hydatidosis using an antigen solution of low nitrogen concentration. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:160-164.
35. Schantz P.M., R. E. Ortiz-Valgui and H. Lumbreras. 1975. non-specific reactions with the intradermal test for hydatidosis in persons with other helminth infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24:849-855.
36. Varela-Diaz V. M., J. Guisantes, M. J. Ricardes, U. Prezioso, P. M. Schantz, and R. Garcia. 1976. Evaluation of immunodiagnostic techniques for the detection of human hydatid cyst carriers in field studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25:617-621.
37. Bout, D., J.P. Dessaint, Dupas H., L. Yarzabal, and A. Capron. 1977. Characterization of allergens in *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* and *Echinococcus granulosus*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*.128C: 687-698.
38. Vuitton D.A., S. Bresson-Hadni, D. Lenys, F. Flausse, M. Liance, P. Wattre, J.P. Miguet, and A. Capron.1988. IgE-dependent humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection: circulating and basophil-bound specific IgE against *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. exp. Immunol.* 71:247-252.
39. Williams J.F., and M.V. Perez-Esandi. 1971. Reaginic antibodies in dogs infected with *Echinococcus granulosus*. *Immunol.* 20:451-455.

DISCUSSION - CONCLUSION

La complexité antigénique du liquide hydatique est le problème majeur auquel est confronté le diagnostic immunologique de l'hydatidose (Biguet et al. 1962, 1965, Norman et al. 1964, Chordi & Kagan 1965, Capron et al. 1968, Gottstein et al. 1987, Larralde et al. 1989). Parmi ces antigènes, l'antigène 5 a été défini comme l'immunogène marqueur de l'infection par *E. granulosus* (Capron et al. 1967, 1970, Williams et al. 1971, Farag et al. 1975).

Devant l'exploitation intensive de la spécificité de l'antigène 5 en immunoélectrophorèse, plusieurs auteurs ont tenté de le caractériser par une approche immunochimique, afin d'améliorer la sensibilité du diagnostic sérologique. Cependant, la diversité des sources d'approvisionnement du liquide hydatique était à l'origine des observations différentes rapportées sur les poids moléculaires et les potentialités diagnostiques d'une série de molécules (Piantelli et al. 1976, Di Felice et al. 1985, Shepherd & Mc Manus 1987, Lightowlers et al. 1989, Maddison et al. 1989, Al-Yaman & Knobloch 1989).

L'utilisation de techniques plus sensibles, comme l'ELISA ou le Western blot, dans le diagnostic sérologique de l'hydatidose, a révélé des réactions faussement positives non négligeables. Ceci est dû, en grande partie, à la contamination des antigènes du liquide hydatique par des déterminants de l'hôte (Ben-Ismaïl et al. 1980, Shepherd & Mc Manus 1987).

La caractérisation moléculaire et la standardisation de ces antigènes s'imposent comme la stratégie de choix pour toute amélioration de la sensibilité et la spécificité du diagnostic immunologique.

Nous avons essayé, dans ce travail, de contribuer à la caractérisation immunochimique de l'antigène 5 et de définir, par une approche moléculaire le(s) épitope(s) ayant des potentialités diagnostiques.

La production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux (Hamrioui et al. 1988b), des protéines recombinantes et des peptides synthétiques ont été les principales démarches de notre travail.

L'anticorps monoclonal (EG 02 154/12), nous a permis la caractérisation immunochimique de l'antigène 5, en immunotransfert et immunoprécipitation sur protéine A. Nos résultats ont été confirmés par d'autres chercheurs utilisant la même stratégie (Lightowers et al. 1989). L'antigène 5 est donc constitué de deux molécules de 37-38 et 20-22 kDa liées de façon covalente.

Comme l'ont montré Shepherd & Mc Manus (1987), nous avons confirmé que la sous-unité 37-38 kDa portait un déterminant phosphorylcholine, responsable de la réactivité croisée observée avec d'autres parasitoses et particulièrement avec les nématodes (Perry et al. 1974).

Dans une étude d'immunoprécipitation des antigènes totaux du liquide hydatique par différents "pools" de sérums d'infection, Shepherd & Mc Manus (1987) ont montré que des sous-unités de l'antigène B sont spécifiques d' *E. granulosus*. En utilisant une série de sérums individuels de différents patients, nous n'avons pas pu confirmer cette spécificité. Lightowers et al. (1989) ont souligné que des anticorps anti-antigène B existent dans quelques sérums de malades infectés par d'autres parasites, mais se trouvent dilués dans un "pool" de sérums, et donc difficilement détectables.

L'utilisation de l'anticorps monoclonal, dans un test d'inhibition, nous a permis de mettre en évidence la spécificité épitopique de l'antigène 5. La performance d'une telle technique d'inhibition a été précédemment soulignée dans le diagnostic d'autres infections parasitaires, comme la

maladie de Chagas causée par *Trypanosoma cruzi* (Lemesre et al. 1986). Ce genre de techniques est néanmoins peu courant dans le diagnostic de routine, car elles nécessitent la maîtrise de plusieurs paramètres qui influencent le bon développement de la réaction.

Compte tenu de la nature protéique de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal, celui-ci a été utilisé comme sonde pour l'identification des antigènes recombinants sélectionnés par des sérums humains hydatiques.

La production de tels antigènes par génie génétique, représente actuellement, une des principales étapes dans la standardisation d'antigènes d'intérêt diagnostique ou immunoprophylactique. Dans l'échinococcose alvéolaire, causée par *E. multilocularis*, d'importants travaux ont montré récemment les potentialités diagnostiques de certains antigènes recombinants (Vogel et al. 1988, Hemmings et al. 1989). Néanmoins, l'utilisation directe de ces antigènes, dans des tests plus sensibles comme l'ELISA, exige une grande pureté de ces protéines qui doivent être débarrassées de tous contaminants bactériens (Müller et al. 1989, Hemmings & Mc Manus 1991).

Les peptides synthétiques apparaissent comme de bons outils de choix, permettant de surmonter les problèmes de contamination rencontrés couramment lors de la synthèse des antigènes recombinants. Dans notre cas, cette stratégie était primordiale pour définir la structure de l'épitope, reconnu à la fois par l'anticorps monoclonal et les sérums humains hydatiques.

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis le clonage et le séquençage d'un nombre important de protéines parasitaires.

L'identification de ces protéines se fait, généralement, par la comparaison de leurs structures primaires à celles d'autres protéines connues dans les banques de données. Si cette méthode d'alignement linéaire des séquences permet de donner une idée sur l'homologie des structures primaires, elle ne permet pas, cependant, de tirer de conclusions si le taux d'homologie est inférieur à 25% (Taylor et al. 1988). Pour cela, l'analyse de la répartition des résidus hydrophobes, combinée aux méthodes de prédiction de la structure secondaire des protéines, constitue un bon critère de comparaison (Lemesle-Varloot et al. 1990). Elle pourrait élucider la réactivité immunologique croisée, observée fréquemment entre différents antigènes ayant une faible homologie de structure linéaire.

En utilisant cette méthode, nous avons pu mettre en évidence une homologie topographique qui explique la reconnaissance des deux protéines recombinantes Eg6 et Eg14 par l'anticorps monoclonal.

De nombreux travaux ont montré que des anticorps dirigés contre une protéine native sont capables de réagir avec un peptide court, dérivé de sa structure primaire et inversement. Une telle réactivité croisée semble être limitée par la faible affinité des anticorps vis à vis des peptides courts, alors que cette réactivité est renforcée si le peptide correspond à une portion mobile de la protéine (Tainer et al. 1984, Westhof et al. 1989), ou si le peptide est suffisamment grand pour adopter une structure secondaire proche de la protéine native (Rhodes et al. 1984).

Des études récentes ont souligné l'intérêt de mimer une conformation à l'aide d'un peptide synthétique, en bloquant les charges des extrémités N et C terminales qui, normalement, défavorisent l'organisation d'un peptide. Cette conformation confère une grande antigénicité et une forte

immunogénicité à ces peptides synthétiques (Gras-Masse et al. 1988). En effet, dans le modèle du paludisme à *Plasmodium falciparum*, il a été montré qu'un peptide α -hélicoïdal correspondant à une zone probablement hélicoïdale d'un antigène natif (Liver Stage Antigen: LSA), est mieux reconnu par les anticorps de sujets infectés que le peptide non structuré (Guerin et al. 1987, Arturo Londono et al. 1991).

Si nous n'avons pas encore prouvé que la protéine recombinante FP6 représente une partie intégrale de l'antigène 5, elle exprime au moins un déterminant antigénique de cet antigène, mimé par le peptide synthétique α -hélicoïdal 89-122.

La valeur diagnostique de ce peptide a été étudiée en ELISA en testant la réponse anticorps de différents patients. La très grande sensibilité obtenue avec des IgG-A-M prouve le grand intérêt de ce peptide pour l'immunodiagnostic de l'hydatidose. La particularité du peptide 89-122 est qu'il représente probablement un déterminant allergénique majeur de l'antigène 5. Cette réponse IgE est très significative en comparaison avec la réponse IgE vis à vis des antigènes totaux du liquide hydatique.

Plusieurs investigations diagnostiques peuvent être alors entreprises avec ce peptide. A la différence de la technique enzymatique ELISA qui nécessite un lecteur automatique, l'immunodétection du peptide fixé sur un support de nitrocellulose (Dot blot) offre un avantage de lecture visuelle pratique. Des études sont actuellement en cours pour réduire la taille du peptide, tout en cernant l'épitope spécifique pour ainsi faciliter la fixation du peptide sur un support solide, comme la nitrocellulose.

Malgré son importance dans l'immunité à *E. granulosus*, la réponse cellulaire est très peu exploitée dans le diagnostic de l'hydatidose. Du fait de sa propriété allergénique, le peptide 89-122 pourrait être utilisé dans un test d'hypersensibilité immédiate, connue sous le nom d'intradermoréaction de Casoni.

L'exploration de ce peptide, dans un test de transformation lymphocytaire, peut amener des informations complémentaires, en particulier lors d'une sérologie négative rencontrée souvent pour les kystes pulmonaires.

Lors d'une intervention chirurgicale ou d'une chimiothérapie, il est important de suivre la réponse immunitaire du patient pour évaluer l'efficacité du traitement. La persistance d'une forte réponse IgE témoigne souvent d'une récurrence; le dosage des IgE vis à vis du peptide 89-122 aura certainement un intérêt considérable dans le pronostic et le suivi thérapeutique de l'hydatidose, de même que le dosage des anticorps spécifiques IgA peut orienter vers une localisation pulmonaire.

Le diagnostic et le contrôle de l'évolution de l'hydatidose ne peuvent être limités à l'homme. Le domaine vétérinaire représente un champ large d'investissements diagnostiques et immunoprophylactiques. Lors des études épidémiologiques, le diagnostic parasitologique, effectué chez les chiens, constitue un critère de base pour évaluer le risque de la transmission de la parasitose. Dans une étude portée sur l'hôte définitif d'*E. granulosus* en Australie, des sérums de chiens parasités reconnaissent spécifiquement un composant moléculaire de 35 kDa parmi les antigènes somatiques, ou excrétés/secrétés des protoscolexes (Gasser et al. 1989). Cette molécule pourrait correspondre à la sous unité 37 kDa de l'antigène 5, d'où l'utilité du peptide 89-122 dans le diagnostic sérologique. Cette

démarche représenterait une alternative à la détection des antigènes ou des oeufs dans les excréments de chiens, réduisant ainsi le risque de contamination (Craig et al. 1986).

A côté du rôle diagnostic apporté par la protéine recombinante FP6 et le peptide 89-122, le rôle biologique de ces molécules reste à élucider.

Les programmes prophylactiques de l'hydatidose se heurtent souvent à des pratiques socio-culturelles très difficiles à contrôler. Malgré des résultats encourageants obtenus en Australie, en Nouvelle-Zélande et à Chypre, le caractère transitoire de ces programmes indique que le déclin réel de la prévalence de cette parasitose est peu évident (Gemmell & Johnston 1977, Matossian et al. 1977). De plus, la chimiothérapie dont la pratique reste encore limitée, ne prévient pas la réinfection. Devant ces difficultés, une stratégie vaccinale paraît plus convaincante (Gottstein et al. 1990). Dans ce contexte, des progrès considérables ont été réalisés dans l'identification des antigènes protecteurs, vis à vis du parasite trématode: *Schistosoma mansoni* (Capron et al. 1987). Cette stratégie s'est avérée très efficace dans la cysticercose causée par la larve d'un parasite cestode: *Taenia ovis* chez les ovins. En effet, une protection de 90% a été obtenue chez des moutons immunisés par un antigène recombinant, produit à partir d'ARN d'oncosphères de *T. ovis* (Johnson et al. 1989). Cette stratégie pourra être envisagée pour la protéine recombinante FP6, de même que pour le peptide 89-122.

Le développement d'un tel programme pour l'hydatidose nécessite d'abord un modèle expérimental approprié, puis la compréhension des mécanismes immunitaires impliqués vis à vis de la larve d' *E. granulosus*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achour N., Dammak J., Zouari B., Nacef T., Belaid A. (1988). Epidémiologie du kyste hydatique en Tunisie (à propos de 4 124 dossiers de malades opérés entre 1977 et 1982). *Tunis Med.* 66, 1, 21.
- Afferni C., Pini C., Misiti-Dorello P., Bernardini L., Conchedda M. & Vicari G. (1984). Detection of specific IgE antibodies in sera from patients with hydatidosis. *Clin. Exp. Immunol.* 55, 587.
- Ali-Khan Z. (1974). Host-parasite relationship in *Echinococcosis*. I. Parasite biomass and antibody response in three strains of inbred mice against graded doses of *Echinococcus multilocularis*. *J. Parasitol.* 60, 231.
- Ali-Khan Z. (1978a). *Echinococcus multilocularis*: cell mediated immune response in early and chronic alveolar murine hydatidosis. *Exp. Parasitol.* 46, 157.
- Ali-Khan Z. (1978b). Cellular changes in the lymphoreticular tissues of C57 L/J mice infected with *Echinococcus multilocularis* cysts. *Immunology* 34, 831.
- Ali-Khan Z. and Siboo R. (1980a). Pathogenesis and host response in subcutaneous alveolar hydatidosis. I. Histogenesis of alveolar cyst and a qualitative analysis of the inflammatory infiltrates. *Zeit. Parasiten.* 62, 241.
- Ali-Khan Z. and Siboo R. (1980b). Pathogenesis and host response in subcutaneous alveolar hydatidosis. II. Intense plasmacellular infiltration in the paracortex of draining lymph nodes. *Zeit. Parasiten.* 62, 255.
- Al-Yaman F. M. & Knobloch J. (1989). Isolation and partial characterization of species-specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 101.
- Ambroise-Thomas P. (1976). Immunofluorescence in the diagnostic, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. *Trans. Roy. Trop. Med. Hyg.* 70, 107.
- Annen J., Kolher P., Eckert J. and Speck S. (1980). Cytotoxic properties of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. In "The Host-Invader Interplay" (H. Van den Bossche, ed.), pp. 339. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Ansari A. and Williams J. F. (1976). The eosinophilic response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 62, 728.
- Ansari A., Williams J. F. and Musoke A. J. (1976). Antibody mediated secondary eosinophilic response to *Taenia taeniaeformis* in the rat. *J. Parasitol.* 62, 737.
- Araj G. F., Matossian R. M. and Malakian A. H. (1977). The host response in secondary hydatidosis of mice. II. Cell mediated immunity. *Zeit. Parasiten.* 52, 31.
- Arrue E., Mantovani A. & Vicari C. (1984). Echinococcosis-hydatidosis and taeniasis cysticercosis in Italy. In "Agriculture. Some Important Parasitic Infections in Bovines considered from Economic and Social (Zoonosis) Point of View". Parasitological symposium, Lyons, 24-26 october 1983. Ed. Euzéby J., Gevrey J., Luxembourg, France: Commission of European Communities, p. 215.
- Arturo-Londono J., Gras-Masse H., Dubeaux C., Tartar A. and Druilhe. (1990). Secondary structure and immunogenicity of hybrid synthetic peptides derived from the *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic antigens. *J. Immunol.* 145, 1557.

Assadourian R., Leynaud G., Dufour J. and Ati N. (1980). Traitement du kyste hydatique du foie. Notre attitude actuelle. *J. Chir. (Paris)*, 117, 715.

Ayuya J. M. and Williams J. F. (1979). Immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VII. Oral and parenteral immunization with parasite antigens. *Immunology*. 36, 825.

Baron R. W. & Tanner C. E. (1976). The effect of immunosuppression on secondary *Echinococcus multilocularis* infections in mice. *Int. J. Parasitol.* 6, 31.

Baron R. W. & Tanner C. E. (1977). *Echinococcus multilocularis* in the mouse; the *in vitro* protoscolicidal activity of peritoneal macrophages. *Int. J. Parasitol.* 7, 489.

Bchir A., Jaiem A., Jemmali M., Rousset J. J., Gaudebout C. and Larouze B. (1987). Possible existence of an urban cycle of *Echinococcus granulosus* in central Tunisia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 650.

Beard T. C. (1978). Evidence that a hydatid cyst is seldom "as old as the patient". *Lancet* 2, 30.

Ben-Ismaïl M., Fourati M., Bousnina A., Zouari F. and Lacronique L. (1977). Le kyste hydatique du coeur. A propos de 9 cas. *Arch. Mal. Coeur.* 20, 2, 119.

Ben-Ismaïl R., Carme B. & Gentilini M. (1978). Activité anti-P1 anormale au cours de la distomatose hépatique (Fasciolose). *Nouvelle Presse Médicale* 7, 4300.

Ben-Ismaïl R., Carme B. & Gentilini M. (1979). Mise en évidence de substances P1 ou P1-like dans *Fasciola hepatica* et *F. gigantica*. *Pathol. Biol.* 27, 487.

Ben-Ismaïl, R., Carme, B., Niel, G., Gentilini, M. (1980) Non-specific serological reactions with *Echinococcus granulosus* antigens. Role of anti-P1 antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 19, 239.

Bekhti A., Schaaps J. P., Capron M., Dessaint J. P., Santoro F. & Capron A. (1977). Treatment of hepatic hydatid diseases with mebendazole preliminary results in four cases. *Br. Med. J.* 2, 1047.

Biguet J., Capron A., Tran Van Ky P. and D'Aussy R. (1962). Etude immuno-électrophorétique comparée des antigènes de divers helminthes. *C. R. Acad. Sc.* 254, 3500.

Biguet J., Rose G., Capron A. and Tran Van Ky P. (1965). Contribution de l'analyse immuno-électrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immuno-électrophorèse. *Rev. Immunol. (Paris)* 29, 5.

Boudah F., Guermouche M. H., Abdeddaim K., Hammrioui B. and Belkaid M. (1988). Analyse des acides aminés dans le liquide hydatique par HPLC. *Arch. Inst. Pasteur Algérie* 56, 109.

Bout, D., Fruit, J., Capron, A. (1974). Purification d'un antigène spécifique du liquide hydatique. *Ann. Institut Pasteur (Immunology)* 125C, 775.

Bout D., Dessaint J. P., Dupas H., Yarzabal L. and Capron A. (1977). Characterisation of allergens in *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica* and *Echinococcus granulosus*. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128C, 687.

Bout D., Carlier Y. and Capron A. (1979). Immunodiagnosis of hydatidosis using monospecific immune serum anti-antigen 5. *Biomedecine*. 31, 214.

Bresson-Hadni S., Liance M., Vuitton D., Bresson J. L., Guerrets S., Meyer J. P., Grimaud J. A. and Houin R. (1986). La réponse immune cellulaire de souches murines de sensibilité différente à l'infestation intra-hépatique par *E. multilocularis*: étude expérimentale. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 4, 2, 247.

Bresson-Hadni S., Vuitton D. A., Lenys D., Liance M., Racadot E. and Miguet J. P. (1989). Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 78, 61.

Bretagne S., Liance M. Bresson-Hadni S. et Houin R. (1988). Isolement d'une sonde ADN pouvant distinguer *Echinococcus multilocularis* d'*E. granulosus* et des autres cestodes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*

Bryant C. and Flokhart H. A. (1986). *Adv. Parasitol.* 25, 275.

Butterworth A. E., Vadis M. A. and David J. R. (1980). Mechanisms of eosinophil mediated helminthotoxicity. In: "The Eosinophil in Health and Disease" (A.A.F. Mahmoud and K.F. Austen, Eds), pp. 253-273. Grune and Stratton, New York.

Cameron T. W. M. (1960). *Parasitologia* 2, 371.

Cameron G. L. and Staveley J. M. (1957). Blood group P substance in hydatid cyst fluid. *Nature* 179, 147.

Cameron T. W. M. and Webster G. A. (1961). In: "Studies in Disease Ecology", vol. 2, pp. 141-160. American Geographic Society, New York.

Candolfi E., Kien T., Chaker E., Fourati M. and Benyounes A. (1985). Intérêt de l'antigénémie et des anticorps IgG, IgM, IgA et IgE dans l'immunologie du kyste hydatique. Résultats de l'enzymologie. A propos de 87 cas. *Bull. Soc. Path. Ex.* 78, 700.

Candolfi E., Molet B. and Kien T. (1986). L'antigénémie et les complexes immuns circulants spécifiques dans l'échinococcose hydatique humaine. A propos de 16 cas. *Med. Mal. Infect.* 16, 5 bis, 369.

Capron A., Vernes A. and Biguet J. (1967). Le diagnostic immunoelectrophorétique de l'hydatidose. Journées lyonnaises d'Hydatidologie. (Ed. SIMEP), Lyon, pp 27.

Capron, A., Biguet, J., Vernes, A. and Afchain, D. (1968). Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.* 16, 121.

Capron, A., Yarzabal, L., Vernes, A., Fruit, J. (1970) Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine. (bilan personnel à propos de 400 observations) *Path. Biol.* 18, 357.

Capron A., Dessaint J. P., Capron M. and Bazin H. (1975a). Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophages to *Schistosoma mansoni* schistozomules. *Nature* (London) 253, 474.

Capron A., Bout D. and Dugimont J. C. (1975b). Apport des méthodes immunoenzymologiques utilisant des antigènes purifiés au diagnostic spécifique et automatisé des infections parasitaires. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 55, 443.

Capron A. (1975c). Le diagnostic immunologique des parasitoses pulmonaires. *Rev. Fr. Mal. Resp.* 3, 5, 421.

Capron A., Vernes A., Dessaint J. D. and Capron M. (1976). Contribution à l'étude de l'hypersensibilité dans l'échinococcose hydatique. *Rev. Franc. Allergol.* 16 (1), 10.

Capron A. and Dessaint J. P. (1985). Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Ann. Rev. Immunol.* 3, 455.

Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Ouma J. H. and Butterworth A. E. (1987). Immunity to schistosomes: Progress toward vaccine. *Science* 238, 1065.

Capron M., Capron A., Torpier G., Bazin H., Bout D. and Joseph M. (1978). Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and the role of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 8, 127.

Capron M., Bazin H., Torpier G., Joseph M. and Capron A. (1981). Evidence for IgE-dependent cytotoxicity by rat eosinophil. *J. Immunol.* 126, 1764.

Carlier Y., Bout D. and Capron A. (1979). Application de l'ELISA en parasitologie et mycologie. *Rev. Inst. Pasteur (Lyon)* 12, 1, 25.

Casoni T. (1911). La diagnosi biologica de l'echinococcosi umana mediante l'intradermoreazione. *Fol. Clin. Chem. Microbiol.* 4, 5.

Chamekh M., Facon B., Dissous C. and Capron A. (1990). Use of a monoclonal antibody specific for a protein epitope of *Echinococcus granulosus* antigen 5 in a competitive antibody radioimmunoassay for diagnosis of hydatid disease. *J. Immunol. Meth.* 134, 129.

Cherubin D. E. (1963). Non-specific reactions to Casoni antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 387.

Chordi A. and Kagan I. (1965). Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J. Parasitol.* 51 (1), 63.

Coltorti E. A. and Varela-Diaz V. M. (1972). IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol.* 58 (4), 753.

Chou Y. and Fasman G. (1974). Conformational parameters for amino-acids in helical β -sheet and random coil regims calculated from proteins. *Biochemistry* 13, 222.

Coltorti E. A. and Varela-Diaz V. M. (1974). *Echinococcus granulosus*: penetration of macromolecules and their localization on the parasite membrane of cysts. *Exp. Parasitol.* 35, 225.

Coltorti E. A. and Varela-diaz V. M. (1976). Survival of hydatid cysts after puncturing. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 51, 647.

Coltorti E. A. and Varela-Diaz V. M. (1978). Detection of antibodies againts *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72 (3), 226.

Conder G. A., Andersen F. L. and Schantz P. M. (1980). Immunodiagnostic tests for hydatidosis in sheep: an evaluation of double diffusion, immunoelectrophoresis, indirect hemagglutination, and intradermal tests. *J. Parasitol.* 66 (4), 577.

Cook B. R. (1989). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83, 51.

Cossey A., Dimichiel A. and Dunstone J. (1979). The use of equilibrium density-gradient ultracentrifugation in the isolation and characterization of glycoproteins with blood group P1 activity hydatid cyst fluid. *Eur. J. Biochem.* 98, 53.

Coudert J., Ambroise-Thomas P., Kieng Truong Thai, Pothier M. A. (1967). Premiers résultats concernant le diagnostic sérologique du kyste hydatique par une nouvelle technique d'immunofluorescence sur lames. *Bull. Soc. Pathol. Ex.* 60, 555.

Coudoumis A. and Polydorides J. (1936). Sur les constituants du liquide hydatique des kystes hydatiques. Proceeding of Third International Congress of Comparative Pathology, Athens, 2, 191.

Cox D. A., Marshall-Clarke and Dixon J. B. (1989). Activation of normal murine B cells by *Echinococcus granulosus*. *Immunology* 67, 16.

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.

Craig P. S. and Nelson G. S. (1984). The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (3), 219.

Craig P. S., Macpherson C. N. L. and Nelson G. S. (1986). The identification of eggs by immunofluorescence using a specific anti-oncospherical monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 152.

Crandall C. A. and Crandall R. B. (1971). *Ascaris suum*: immunoglobulin responses in mice. *Experimental parasitology.* 30, 426.

D'Amelio R., Pontesilli O., Palmisano L., Pezzella M., Vullo V., De Rosa F., Sorice F. and Aiuti F. (1983). Detection and partial characterization of circulating immune complexes in hydatid disease. *J. Clin. Microbiol.* 18, 1021.

Damian R. T. (1979). Molecular mimicry in biological adaptation. In "Host Parasite Interfaces" (B.B. Nickel, ed.), pp. 103-126. Academic Press, New York.

Davies A., Pawlovski Z. S. and Dixon H. (1986). Multicentre clinical trials of benzimidazole carbamates in human echinococcosis. *Bull. W.H.O.* 64, 383.

Davies C., Rickard M. D., Bout D. and Smyth J. D. (1978). Ultrastructural immunocytochemical localization of two hydatid fluid antigens (antigen 5 and antigen B) in the brood capsules and protoscoleces of ovine and equine *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis*. *Parasitology.* 77, 143.

Deplage A., Fontaine J. P., Jean Baptiste B., Lanraire M. C., Fontaine I. and Marin J. (1986). Note préliminaire sur l'hydatidose autochtone dans le Gard. *Bull. Soc. Path. Ex.* 79, 655.

Dessaint J. P., Bout D., Watre P. and Capron A. (1975). Quantitative determination of specific IgE antibodies to *Echinococcus granulosus* and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology* 29, 813.

Dieckmann A. and Frank V. (1988). Isolation of viable cells from *Echinococcus multilocularis* (preliminary results), *Parasitol. Res.* 74, 297.

Di-Felice, G., Pini, C., Afferni, C., Vicari, G. (1986) Purification and partial characterization of the major antigen of *Echinococcus granulosus* (antigen5) with monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20, 133.

Dissous C. and Capron A. (1983). *Schistosoma mansoni*: antigenic community between schistosomula surface and adult worm incubation products as a support for a concomitant immunity. *FEBS Letters* 162, 2, 355.

Dottorini S. and Tassi C. (1977). *Echinococcus granulosus*: characterization of the main antigenic component (arc 5) of hydatid fluid. *Exp. Parasitol.* 43, 307.

Dow C. and Jarrett W. F. H. (1960). Age, strain and sex differences in susceptibility to *Cysticercus fasciolaris* in the mouse. *Exp. Parasitol.* 10, 72.

Dumon H., Veruloet D. and Quilici M. (1976). Adhérence *in vitro* des leucocytes circulants humains aux scolex d'*Echinococcus granulosus*. *Compte rendu des séances de la Société de Biologie* 170, 639.

Dumon H., Raoult P., Ramahandridona N. and Quilici M. (1981). L'hydatidose en Provence et en Corse. Enquête épidémiologique. *Bull. Soc. Path. Ex.* 74, 96.

Eckert J., Gemmel M. A. and Soulsby E. J. L. (1981). Guidelines for surveillance, prevention and control of echinococcosis/hydatidosis. FAO/UNEP/W.H.O., Geneva, 147.

Eckert J. and Ramp T. (1985). Cryopreservation of *Echinococcus multilocularis* metacestodes and subsequent proliferation in rodents. *Zeit. Für Parasiten.* 71, 777.

Eckert J. and Tompson R. C. A. (1988). *Echinococcus* strains in Europe: a review. *Trop. Med. Parasitol.* 39, 1.

Eckert J., Tompson R. C. A., Michael S. A., Kumaratilake L. M. and El-Sawah H. M. (1989). *Echinococcus granulosus* of camel origin: development in dogs and parasite morphology. *Parasitol. Res.* 75, 536.

Engelkirk P. G., Williams J. F. and Signs M. M. (1981). Interaction between *Taenia taeniaeformis* and host cells *in vitro*. I. Rapid adherence of peritoneal cells to strobilocerci. *Int. J. Parasitol.* 11, 463.

Euzéby. J. (1962). *Rev. Méd. Vet.* 113, 111.

Farag, H., Bout, D., Capron, A. (1975) Specific immundiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Biomedecine* 23, 276.

Feizi T. and Kabat E. A. (1972). Immunochemical studies on blood groups. LIV. Classification of anti-I and anti-i sera into groups A, B, H, Le^a, Le^b and precursor substances. *J. Exp. Med.* 135, 175.

Fiori P. L., Lubinu G., Rubino A., Pugliese A. and Tarantini S. M. (1981). Mise au point de cultures cellulaires de kystes d'*Echinococcus granulosus* et leur caractérisation. XII Congrès Intern. d'hydatidologie. Alger, 4-6 mai (Abst).

Flisser A. Pérez-Montfort R. and Larrald C. (1979). The immunology of human and animal: a review. *Bull. W. H. O.* 57, 839.

Frayha G. J. and Haddad R. (1980). Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus* (cestode). *Int. J. Parasitol.* 10, 359.

Gaboriaud C., Bissery V., Benchetrit T. and Mornon J. P. (1987). Hydrophobic Cluster Analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* 224, 149.

- Garabedian G. A., Matossian R. M. and Djanian A. Y. (1957). An indirect hemagglutination test for hydatid disease. *J. Immunol.* 78, 269.
- Gasser, R.B., Lightowers, M.W. and Rickard, M.D. (1989) Identification of protein components of *Echinococcus granulosus* protoscolex antigens for specific serodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs. *Parasite Immunol.* 11,279.
- Gauthier A., Quilici M., Boustière C., Botta D. (1985). Le kyste hydatique du foie: aspects médicaux. In: Actualités digestives médico-chirurgicales. Paris. Masson ed. 83, 8.
- Gemmel M. A. and Soulsby E. J. L. (1968). The development of acquired immunity to tapeworms and progress towards active immunization, with special reference to *Echinococcus* spp. *Bull. W. H. O.* 39, 45.
- Gemmel. M. A. (1972). Some problems of inducing resistance to *Taenia hydatigena* under conditions of strong infection pressure. *Aust. Vet. J.* 48, 29.
- Gemmel M. A. and Macnamara F. N. (1972). Immune responses to tissue parasites II. Cestodes. In "Immunity to animal parasites" (E. J. L. Soulsby, ed.), Academic Press, London and New York. pp. 235.
- Gemmel M. A. (1976). Immunological responses and regulation of cestode zoonoses. In: "Immunology of human parasitic infections" (S. Cohen and E. Sadun, eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 338.
- Gemmel. M. A. and Johnston P. D. (1977). Experimental epidemiology of hydatidosis and cysticercosis. *Adv. in Parasitol.* 15, 311.
- Gemmel. M. A. (1978). Perspectives on options for hydatidosis and cysticercosis control. *Vet. Med. Rev.* 1, 3.
- Gemmel M. A. and Lawson J. R. (1986). Epidemiology and control of hydatid disease. In "The biology of *Echinococcus* and hydatid disease", Ed. Thompson R.C.A., London U.K., Georges Allen & Unwin, 189.
- Gemmel M. A. Lawson J. R. and Roberts M. G. (1987). Towards global control of cystic and alveolar hydatid disease. *Parasitol. Today.* 3, 5, 144.
- Geysen H. M., Rodda S. J., Mason T. J., Tribbick G. and Schoofs P. G. (1987). Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J. Immunol. Meth.* 102, 259.
- Good A. H. and Miller K. L. (1976). Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Inf. Imm.* 14, 449.
- Gottstein, B. (1984). An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 1185.
- Gottstein B. Eckert J. Michael S. A. and Thompson R. C. A. (1987). *Echinococcus granulosus* antigens: immunoelectrophoretic and Western blot analysis of hydatid cysts fluids. *Parasitol. Res.* 73, 186.
- Gottstein B., Müller., Cryz S. J., Vogel M., Tanner I. and Seebeck T. (1990). Humoral and cellular immune response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Parasite Immunol.* 12, 163.

- Gottstein B. and Mowatt M. R. (1991). Sequencing and characterization of *Echinococcus multilocularis* DNA probe and its use in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 183.
- Gras-Masse H., Jolivet M., Drobecq H., Aubert J. P., Beachey E. H., Audibert F., Chedid L. and Tartar A. (1988). Influence of helical organization on immunogenicity and antigenicity of synthetic peptides. *Mol. Immunol.* 25, 673.
- Guerin C., Druilhe P., Galey B., Londono J. A., Patarapotikul J., Beaudoin R. L., Tartar A., Mercereau-Puijalon O., Langsley G. (1987). A liver-stage-specific antigen of *Plasmodium falciparum* characterized by gene cloning. *Nature.* 329, 164.
- Hamrioui B., Ovlaque G., Belkaid M. and Capron A. (1988a). Caractères physico-chimiques de l'antigène 5 du liquide hydatique. *Arch. Inst. Pasteur Algérie.* 56, 124.
- Hamrioui B., Ovlaque G., Belkaid M. and Capron A. (1988b). Production d'anticorps monoclonaux anti-hydatiques. *Arch. Inst. Pasteur Algérie.* 56, 130.
- Heath D. D. (1971). The migration of oncospheres of *Taenia pisiformis*, *T. serialis* and *Echinococcus granulosus* within the intermediate host. *Int. J. Parasitol.* 1, 145.
- Heath D. D. (1976). Resistance to *Taenia pisiformis* larvae in rabbits: Immunization against infection using non-living antigens from *in vitro* culture. *Int. J. Parasitol.* 6, 19.
- Heath D. D. (1986). Immunobiology of *Echinococcus* infections. *Drugs Exp. Clin. Res.* XII, 164.
- Heath D. D., Christie M. J. and Chevis R. A. F. (1975). The lethal effect of mebendazole on secondary *Echinococcus granulosus*, cysticerci of *Taenia pisiformis* and tetrathyridia of *Mescestoides corti*. *Parasitology* 70, 273.
- Heath D. D. and Lawrence S. B. (1978). The effect of mebendazole and praziquantel on the cysts of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *T. ovis* in sheep. *New Zealand Vet. J.* 26 (1/2), 11.
- Heath D. D. and Lawrence S. B. (1981). *Echinococcus granulosus* cysts: Early development *in vitro* in the presence of serum from infected sheep. *Int. J. Parasitol.* 11, 261.
- Heath D. D. and Pavloff P. (1975). The fate of *Taenia taeniaeformis* oncospheres in normal and passively protected rats. *Int. J. Parasitol.* 5, 83.
- Hemmings L. and Mc Manus D. P. (1989). The isolation, by differential antibody screening, of *Echinococcus multilocularis* antigen gene clones with potential for immunodiagnosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33, 171.
- Hemmings L. and Mc Manus D. P. (1991). The diagnostic value and molecular characterisation of an *Echinococcus multilocularis* antigen gene clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 53.
- Huguier M., Leynadier F. and Houry S. (1987). Human basophil degranulation test in liver hydatidosis. *Dig. Dis. Sc.* 32, 12, 1354.
- Hustead S. T. and Williams J. F. (1977). Permeability studies on taeniid metacestodes: I. Uptake of proteins by larval stages of *taenia taeniaeformis*, *T. crassiceps* and *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63, 214.

Iacona A., Pini C. and Vicari G. (1980). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA.) in the serodiagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1), 95.

Jenkins P., Dixon J. B., Rakha N. K. and Carter S. D. (1990). Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Merocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. *Parasitology.* 100, 309.

Johnton K. S., Harrison G. B., Lightowlers M. W., O'Hoy K. L., Cogle W. G., Dempster R. P., Lawrence S. B., Vinton J. G., Heath D. D. and Rickard M. D. (1989). Vaccination of ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 338, 585.

Joseph M. (1982). Effector function of phagocytic cells against helminths. *Clin. Immunol. Aller.* 2, 3, 567.

Joseph M., Auriat C., Capron A., Vorng H. and Viens P. (1983). A new function of platelets: IgE dependent killing of schistosomes. *Nature.* 30, 5920, 810.

Kagan I. G. (1963). Seminar on immunity to parasitic helminths. VI. Hydatid disease. *Exp. Parasitol.* 13, 57.

Kagan I. G. and Agosin M. (1968). *Echinococcus* antigens. *Bull. W.H.O.* 39, 13.

Kagan I. G. and Norman L. (1961). Antigenic analysis of *Echinococcus* antigens by agar diffusion techniques. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 346.

Kagan I. G. and Norman L. (1963). Analysis of helminths antigens (*Echinococcus granulosus* and *Schistosoma mansoni*) by agar gel methods. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 118, 130.

Kagan, I.G., Norman, L., Allain, D.S (1960) Studies on echinococcosis: Serology of crude and fractionated antigens prepared from *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9, 248.

Kagan I. G., Osimani J. J., Varela J. C. and Allain D. S. (1966). Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15, 172.

Kamiya H. (1972). Studies on Echinococcosis. XXIV. Age difference in resistance to infection with *Echinococcus multilocularis* in AKR strain of mouse. *Jap. J. Vet. Sc.* 20, 69.

Kammer W. (1979). Case 25-1979. Medical treatment of echinococcosis. *New Eng. J. Med.* 301, 727.

Kilani T., Ben Safia Z., Jamoussi M. (1983). Les complications pleurales du kyste hydatique du poumon. A propos de seize cas. *Ann Chir.* 37, 2, 145.

Krvavica S., Martincic T. and Asaj R. (1959). Metabolism of amino acids in some parasites. II. Amino acids in the hydatid fluid and germinal layer of *Echinococcus*. *Vet. Archiv.* 29, 314.

Kuramatilake L. M. and Thompson R. C. A. (1983). A review of the taxonomy and speciation of the genus *Echinococcus* Rudolphi 1801. *Z. Parazitenk.* 3, 347.

Kwa B. H. and Liew F. W. (1978). Studies on the mechanism of long-term survival of *Taenia taeniaeformis* in rats. *J. Helminth.* 52, 1.

Labraoui D. et Alloula R. (1979). Etude épidémiologique de l'hydatidose en Algérie. Résultats de deux enquêtes retrospectives portant sur 10 ans. *Tunisie Médicale*. 57, 318.

Laraki A., Bartal M., Sebti M., Capron A., Vernes A., Lefebvre M. N. (1971). Place des réactions immunologiques dans le diagnostic de l'hydatidose pulmonaire. *Ann. Méd. Chir. Avicenne*.

Larralde C., Montoya R. M., Sciuto E., Diaz M. L., Govezensky T. and Coltorti E. (1989). Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 3, 282.

Lass N., Laver Z. and Lengy J. (1973). The immunodiagnosis of hydatid disease: post-operative evaluation of the skin test and four serological tests. *Ann. Allergy*. 31, 430.

Le Goff L., Marty P., Gari-Toussaint M., Dumon H. et Le Fichoux Y. (1987). L'hydatidose humaine dans les Alpes-Maritimes. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 5, 219.

Leid R. W. and Williams J. F. (1974). The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis* II. Characterisation of reaginic antibody and allergen associated with the larval stage. *Immunology*. 27, 209.

Leid R. W. and Williams J. F. (1975). Reaginic antibody response in rabbits infected with *Taenia taeniaeformis*. *Int. J. Parasitol.* 5, 203.

Leid R. W. (1977). Immunity to the metacestode of *Taenia taeniaeformis* in the laboratory rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26, 54.

Lemesle-Varloot L., Henrissat B., Gaboriaud C., Bissery V., Morgat A. and Mornon J. P. (1990). Hydrophobic Cluster Analysis; procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie*. 72, 555.

Lemesre J. L., Afchain D., Orozco O., Loyens M., Breniere F. S., Desjeux P., Carlier Y., Martin U., Nogueira-Queiroz J. A., Le ray D. and Capron A. (1986). Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas disease by competitive antibody enzymimmunoassay using a *Trypanosoma Cruzi*-specific monoclonal antibody (against the component 5 specific for *Trypanosoma cruzi*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 86.

Lightowers M. W., Haralambous A. and Rickard M. D. (1989a). Amino acid sequence homology between cyclophilin and a cDNA-cloned antigen of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 287.

Lightowers M. W., Liu D., Haralambous A. and Rickard M. D. (1989b). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid antigens of *Echinococcus granulosus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 37, 171.

Lloyd S. and Soulsby E. J. L. (1978). The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology*. 34, 939.

Lloyd S. (1979). Homologous and heterologous immunization against the metacestodes of *Taenia saginata* and *Taenia taeniaeformis* in cattle and mice. *Z. Parasiten.* 60, 87.

Macpherson C. N. L. and Mc Manus D. P. (1982). A comparative study of *Echinococcus granulosus* from human and animal host in Kenya using isoelectric focusing and isoenzyme analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12, 6, 515.

- Macpherson C. N. L. (1983). An active intermediate host role for man in the life cycle of *Echinococcus granulosus* in Turkana, Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 2, 397.
- Maddison S. E., Slemenda S. B., Schantz P. M., Fried J. A., Wilson M. and Tsang V. W. (1989). A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 4, 377.
- Mary c., Dumon H. et Quilici M. (1983). Intérêt du dépistage des IgA spécifiques dans le diagnostic immunologique de l'hydatidose par ELISA. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 1, 115.
- Matossian R. M., Kane G. J., Chantler S. M., Batty I. and Sarhadian H. (1972). The specific immunoglobulin in hydatid disease. *Immunology* 22, 423.
- Matossian R. M. and Araj G. F. (1975). Serologic evidence of post-operative persistence hydatid cysts in man. *J. Hyg.* 75, 333.
- Matossian R. M., Alami S. Y., Salti I. and Araj G. F. (1976). Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis. *Int. J. Parasitol.* 6, 367.
- Matossian R. M., Rickard M. D. and Smyth J. D. (1977). *Bull. W.H.O.* 55, 499.
- Matossian R. M., Mc Laren M., Draper C. C., Bradstreet C. M., Dighero M. W., Mc Kinlay L. M. and Rickard M. D. (1979). The serodiagnosis of human hydatid disease. 2. Additional studies on selected sera using Indirect Haemagglutination (IHA), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Defined Mass Antigen Substrate Spheres (DASS). *J. Helminth.* 53, 287.
- Matossian R. M. (1981). A simplified radioimmunoassay technique for hydatid disease and human trichinosis. *J. Helminth.* 55, 49.
- Matskasi J. and Juhasz S. (1977). *Ligula intestinalis* (L. 1785): investigation of plerocercoids and adults for protease and protease inhibitor activities. *Parasitol. Hung.* 10, 51.
- Mc Manus D. P. and Smyth J. D. (1979). Isoelectric focusing of some enzymes from *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 259.
- Mc Manus D.P., Smyth J.D. (1986). Hydatidosis: Changing concepts in epidemiology and speciation. *Parasitol. Today* 2, 163.
- Mc Manus D. P. and Rishi A. K. (1989). Genetic heterogeneity within *Echinococcus granulosus*: isolates from different hosts and geographical areas characterized with DNA probes. *Parasitology.* 99, 17.
- Mc Manus D P., Thompson R. C. A. and Lymbery A. J. (1989). Comment on the status of *Echinococcus granulosus* in the UK. *Parasitol. Today.* 5, 11, 365.
- Mc Manus D. P., Lamsam S. (1990). *Taenia crassiceps* surface immunoglobulins: parasite or host-derived? *Parasitology.* 101, 127.
- Merioua A., Bout D. and Capron A. (1982). Evaluation of ELISA and RAST using purified antigens for diagnosis of hydatidosis. *Path. Biol.* 32, 15.
- Miles M. A., Wallace G. R. and Clarke J. L. (1989). Multiple Peptide Synthesis (Pepsan Method) for the Systematic Analysis of B and T-cell Epitopes: Application to parasite proteins. *Parasitol. Today.* 5, 12, 397.

- Mitchell G. F., Goding J. W. and Rickard M. D. (1977). studies on the immune response to larval cestodes in mice. I. Increased susceptibility of certain mouse strain and hypothymic mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc.* 55, 165.
- Mitchell G. F., Rajasekariah G R. and Rickard M. D. (1980). A mechanism to account for mouse strain variation in resistance to the larval cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Immunology.* 39, 481.
- Mlika N., Larouze B., Gaudebout C., Braham B., Allegue M., Dazza C., Dridi M., Gharbi S., Bchir A., Rousset J. J., Delattre M. and Jemmali M. (1986). Echotomographic and serologic screening for hydatidosis in a tunisian village. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 4, 815.
- Moriarty K. M. (1968). Antibodies hydatid disease. An immunological study of antibodies responsible for haemagglutinating and complement fixing activity in human hydatid disease. *J. Lab. Clin. Med.* 72, 721.
- Müller N., Gottstein B., Vogel. M., Flury K. and Seebeck T. (1989). Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36, 151.
- Murrel K. D. (1971). The effect of antibody on the permeability control of larval *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 57, 875.
- Musiani R., Piantelli M., Arru E., Pozzuoli R. (1974). A solid phase radioimmunoassay for the diagnosis of human hydatidosis. *J. Immunol.* 112, 1674.
- Musoke A. J. Williams J. F. (1975a). The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. V. Sequence of appearance of protective immunoglobulins and the mechanism of action of 7s γ 2a antibodies. *Immunology.* 29, 855.
- Musoke A. and Williams J. F. (1975b). Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to *Taenia Taeniaeformis* in the mouse. *Immunology.* 28, 97.
- Musoke A. and Williams J. F. (1976). Immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis* : Protective antibodies response to implanted parasites. *Int. J. Parasitol.* 6, 265.
- Musoke A., Williams J. F. and Leid R. W. (1978). Immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VI. The role of immediate hypersensitivity in resistance to reinfection. *Immunology.* 34, 565.
- Mzabi R. et Dziri C. (1990). Les echinococcoses extrahepatiques: diagnostic et traitement. *Rev. Prat. (Paris)*, 40, 3, 220.
- Mzabi B. et Hambak. (1978). Traitement des kystes hydatiques du foie ouverts dans les bronches. A propos de 24 cas. *Chirurgie.* 104, 404.
- Neghene E. and Silva R. (1970). A hydatidose como problema médico, sanitario e social e esbo o basico para sua profilaxia. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 16, 279.
- Norman L., Kagan I. G. and Chordi A. (1964). Further studies on the analysis of sheep hydatid fluid by agar gel methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 816.

- Nozais J. P., Danis M., Loisy M., Gentilini M. (1985). Le diagnostic sérologique de l'hydatidose. A propos de 235 cas. *Path. Biol.* 33, 4, 238.
- Oriol C. and Oriol R. (1975). Physicochemical characteristics of a lipoprotein antigen of *Echinococcus granulosus*. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 24 (1), 96.
- Oriol R., Williams J.F., Peres-Escandi M.V., Oriol C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569.
- Pappas P. W. and Read C. P. (1972). Trypsin inactivation by intact *Hymenolepis diminuta*. *J. Parasitol.* 58, 864.
- Pennoit-De Cooman E. and De Rycke P. H. (1970). Experimental secondary echinococcosis of *Echinococcus granulosus* I. Development in different strains of mice. *Z. Parasiten.* 34, 362.
- Pery P., Petit A., Poulain J. and Luffan G. (1974). Phosphorylcholine-bearing components in homogenates of nematodes. *Eur. J. Immunol.* 4, 637.
- Pezzella M., Galli C., Delia S., Vullo V., Zennaro F. and Sorice F. (1984b). *Echinococcus granulosus* antigens: comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (5), 549.
- Pinon J P., Poirtiez J., Lapan H., Geers R., Penna R. and Fernandez D. (1987) Value of isotypic characterization of antibodies to *Echinococcus granulosus* by Enzyme-Linked Immuno-Filtration assay. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 3, 291.
- Piantelli M., Pozzuoli R., Arru E., Musiani P. (1977). *Echinococcus granulosus*. Identification of subunits of major antigens. *J. Immunol.* 119, 1382.
- Pini C., Pastore R. and Valesinin G. (1983). Circulating immune complexes in sera of patients infected with *Echinococcus granulosus*. *Clin. Exp. Immunol.* 51,572.
- Pozzuoli R., Musiani P., Arru E., Piantelli M. and Mazzarella R. (1972). *E. granulosus*: isolation and characterization of sheep fluid antigens. *Exp. Parasitol.* 32, 45.
- Pozzuoli R., Piantelli M., Perucci C., Arru E. and Musiani P. (1975). Isolation of the most immunoreactive antigens of *Echinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. *J. Immunol.* 115, 1459.
- Purriel P. (1973). Human echinococcosis (hydatidosis) in Uruguay: A comparison of indices of morbidity and mortality (1962-1971). *Bull. W. H. O.* 49, 395.
- Ramos G., Duque J. L., Yuste M. G., Heras F., Gallo M. J. et Beltrande Heredia J. M. (1983). La rupture intrapleurale du kyste hydatique du poumon. A propos de 15 observations. *Ann. Chir.* 37, 2, 114.
- Rau M. E. and Tanner C. E. (1976). *Echinococcus multilocularis* in the cotton rat: the *in vitro* protoscolicidal activity of peritoneal cells. *Int. J. Parasitol.* 6, 195.
- Rausch R. L. (1953). In "Tharpar Commemoration Volume Lucknow" (J. Dayal and K. S. Singh, eds.), pp233.
- Rausch R. L. (1985). Parasitology: retrospect and prospect. *J. Parasitol.* 71, 139.

- Rhodes G., Houghten R., Taulane J. P., Carson D. and Vaughan J. (1984). The immune response to Epstein-Barr nuclear antigen: conformational and structural features of antibody binding to synthetic peptides. *Mol. Immunol.* 21, 1047.
- Rickard M. D. (1974). Hypothesis for the long term survival of *Taenia pisiformis* cysticerci in rabbits. *Z. Parasiten.* 44, 203.
- Rickard M. D., Davies C., Bout D. and Smyth J. D. (1977a). Immunohistological localization of two hydatid antigens (antigen 5 and antigen B) in the cyst wall, brood capsules and protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (ovine and equine) and *Echinococcus multilocularis* using immunoperoxidase methods. *J. Helminth.* 51, 359.
- Rickard M. D., Mackinlay L. M., Kane G. J., Matossian R. M. and Smyth J. D. (1977b). Studies of the mechanism of lysis of *Echinococcus granulosus* protoscoleces incubated in norman serum. *J. Heminth.* 51, 221.
- Rickard M. D., Rajasekariah G. R. and Mitchell G. F. (1981). Immunisation of mice against *Taenia taeniaeformis* using antigens prepared from *T. pisiformis* and *T. hydatigena* eggs or oncospheres. *Z. Parasiten.* 66, 49.
- Rickard M. D. and Williams J. F. (1982). Hydatidosis/Cysticercosis: Immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* 21, 229.
- Rickard M. D. and Lightowers M. W. (1986). Immunodiagnosis of hydatid disease. In: "The biology of *Echinococcus* and hydatid disease". Ed. Thompson R.C.A., George Allen & Unwin, London, p. 217.
- Richard-Lenoble D., Smyth M. D., Loisy M. and Verroust P. J. (1978). Human hydatidosis: evaluation of three serodiagnosis methods, the principal subclasses of specific Ig and the detection of circulating immune complexes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 72, 553.
- Roberts M. G., Lawsol J. R. and Gemmel M. A. (1986). *Parasitology.* 92, 621.
- Rogan M. T. and Richards K. S. (1986). *In vitro* development of hydatid cysts from posterior bladders and ruptured brood capsules of equine *Echinococcus granulosus*. *Parasitology.* 92, 379.
- Riley E. R. and Dixon J. B. (1987). Experimental *Echinococcus granulosus* infection in mice: immunocytochemical analysis of lymphocyte populations in local lymphoid organs during early infection. *Parasitology.* 94, 523.
- Rubino S. Fiori P. L. and Lubino G. (1983). The cytoskeleton of hydatid cyst cultured cells and its sensitivity to inhibitors. *Eur. J. Cell. Bio.* 30, 182.
- Russi S., Siracusano A., Remy G., Dropsy G. (1974). Isolation and characterization of blood P1 active carbohydrate antigen of *Echinococcus granulosus* cyst membrane. *J. Immunol.* 112, 1061.
- Saad B., Ashoush R. et Chinara S. (1983). Reflexions à propos de 512 cas de kystes hydatiques du poumon. *Ann. Chir.* 37, 2, 92.
- Saad H., Hamdi A., Zouari K., Hdhili A., Seghaier M. S. et Tabka M. H. (1990). Le kyste hydatique du rein. A propos de 29 cas. *Sem. Hop. Paris.* 36, 2065.
- Sastre B., Sielezneff I., Agostini S. Dumon H., Arnaud A. (1990). Diagnostic et traitement d'un kyste hydatique du foie. *Rev. Prat (Paris).* 40, 3, 205.

- Sampaio Silva . M. de L., David Moraes J., Watre P. et Bermonte M. L. (1989). Apport du dosage radioimmunométrique des anticorps IgG, IgA, IgE au diagnostic et à la surveillance de l'hydatidose humaine. A propos de 75 cas. *Med. Mal. Inf.* 19, 6/7, 367.
- Sanchez A. F. and Sanchez C. A. (1971). Estudio de algunas propiedades físicas y componentes químicas del líquido y pared germinativa de quistes hidatídicos de diversas especies y de diferente localización. *Rev. Iber. Parasitol.* 31, 347.
- Schantz P. M., Ortiz-Valgui R. E. and lumbreras H. (1975). Non-specific reactions with the intradermal test for hydatidosis in persons with other helminth infections. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 849.
- Schantz P. M. (1984). In: "Tropical and geographical medicine", Ed. Warren K.S. & Mahmoud A.A.F., Mc Graw Hill, New York, p. 487.
- Schantz P. M. and Gottstein B. (1986). Echinococcosis (hydatidosis). In: "Immunoserology of parasitic disease". Ed. Walls K.F., M. Decker, New York.
- Schwabe C. W., Schinazi L. A. and Kilejian A. (1959). Host-Parasite relationships in echinococcosis. II. Age resistance to secondary echinococcosis in the white mouse. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8, 29.
- Shepherd J. C., Mc Manus D. P. (1987). Specific and cross-reactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28, 143.
- Shepherd J. C., Aitken A. and McManus D. P. (1991). A protein secreted by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81.
- Schenone H., Knierim F. Székely R., Del Solar J. A. and Santos R. (1976). Sensibilidad y especificidad de la reacción de Casoni en el diagnóstico de la hidatidosis humana. *Bol. Chil. Parasitol.* 31, 62.
- Smithers S. R. and Terry R. J. (1969). Immunology of schistosomiasis. *Adv. Parasitol.* 7, 41.
- Smyth J. D. and Haeselwood G. A. D. (1963). The biochemistry of bile as a factor in determining host specificity in intestinal parasites, with particular reference to *Echinococcus granulosus*. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 113, 234.
- Smyth J. D. (1964). The biology of hydatid organisms. *Adv. Parasitol.* 2, 169.
- Sweatman G. K. and Williams R. J. (1962). *Tr. Roy. Soc. N. Z. (Zoology).* 2, 221.
- Sweatman G. K. and Williams R. J. (1963). *Parasitology.* 53, 339.
- Swiderski Z. (1985). A study of the effects of mebendazole treatment on the hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *Proc. Electron Microscopy Soc. South. Africa* 15, 183.
- Tainer J. A., Getzoff E. D., Alexander H., Houghten R. A., Olson A. J., Lerner R. A. and Hendrickson W. A. (1984). The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature.* 312, 127.
- Tainer J. A., Desl C. D., Geysen H. M., Roberts V. A. and Getzoff E. D. (1991). Defining antibody-antigen recognition: Towards engineered antibodies and epitopes. *Int. Rev. Immunol.* 7, 165.

- Takahashi N., Hayano T. and Suzuki M. (1989). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cycosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*. 337, 473.
- Testas P. & François M. (1983). La rupture des kystes hydatiques du foie dans les voies biliaires extrahépatiques. *Chirurgie*. 109, 122.
- Thompson R. C. A. (1976). Inhibitor effect of BCG on development of secondary hydatid cysts of *Echinococcus granulosus*. *Vet. Rec.* 99, 273.
- Thompson R. C. A. (1986). Biology and Systematics of *Echinococcus*. In: "The biology of *Echinococcus* and hydatid disease". Ed. Tompson R.C.A., London, UK, G. Allen & Unwin, p. 5.
- Thompson R. C. A. and Lymbery A. J. (1988). The nature, extent and significance of variation within the genus *Echinococcus*. *Adv. Parasitol.* 27, 210.
- Todorov T., Stojanov G., Rohov L., Rasev R. and Alova N. (1976). Antibody persistence after surgical treatment of echinococcosis. *Bull. W.H.O.* 53, 407.
- Todorov T., Dakov I., Kosturkova M., Tenev S. and Dimitrov A. (1979a). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. 1: A comparative study of immunodiagnostic tests. *Bull. W.H.O.* 57, 735.
- Todorov T., Raigev I., Tenev S., Kosturcova M., Dacov I., Dimitrov A. (1979b). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. 2: Evaluation of antibodies response. *Bull. W. H. O.* 57, 741.
- Turner H. M. and Mc Keever S. (1976). The refractory responses of the white Swiss strain of *Mus musculus* to infection with *Taenia taeniaeformis*. *Int. J. Parasitol.* 6, 483.
- Varela-Diaz V. M. and Coltorti E. A. (1972). Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatid cysts. *J. Parasitol.* 58, 1015.
- Varela-Diaz V. M. and Coltorti E. A. (1973). The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *J. Parasitol.* 59 (3), 484.
- Varela-Diaz V. M. and Marchevsky M. (1973). Aspectos inmunológicos del tratamiento biológico de la hidatidosis. *Zoonosis*. 15, 20.
- Varela-Diaz V. M., Coltorti E. A., Prezioso U., Lopez-Lemes M. H., Guisantes G. A. and Yarzabal L. A. (1975). Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 312.
- Varela-Diaz V. M., Coltorti E. A., Ricardes M. I., Prezioso U., Schantz P. M. and Garcia R. (1976). Evaluation of immunodiagnostic techniques for the detection of human hydatid cyst carriers in field studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25, 617.
- Varela-Diaz, V.M., Coltorti, E.A., D'alessandro, A. (1978). Immunoelectrophoresis tests showing *Echinococcus granulosus* arc 5 in human cases of *Echinococcus vogeli* and cysticercosis multiple myeloma. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27 (3), 554 .
- Verheyen A., Vanparijs O., Borgers M.; and Thienpont D. (1978). Scanning electron microscopic observations of *Taenia taeniaeformis* after treatment of mice with mebendazole. *J. Parasitol.* 64, 411.
- Vervloet D., Dumon H., Quilici M. et Charpin J. (1976). Les IgE spécifiques dans l'hydatidose. *Rev. Fr. Allergol.* 16, 73.

Vidor E., Piens M. A. and Garin P. (1987). Host serum protein levels in cysts of human hydatidosis. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 669.

Vogel M., Gottstein B., Müller. and Seebeck T. (1988). Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31, 17.

Vuitton D. A., Lasségue A., Miguet J. P., Hervé P., Barale T., Seillés E. and Capron A. (1984). Humoral and cellular immunity in patients with hepatic alveolar echinococcosis. A 2 year follow-up with or without flubendazole treatment. *Parasite Immunol.* 6, 329.

Vuitton, D.A., Bresson-Hadni, S., Lenys, D., Flausse, F., Liance, M., Wattre, P., Miguet, J.P., Capron, A. (1988). IgE-dependant humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection: Circulating and basophil-bound specific IgE against *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 71,247.

Vuitton D. A., Bresson-Hadni S., Laroche L., Kaiserlian D., Guerret-Stocker S., Bresson J. L. and Gillet M. (1989). Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural Killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol.* 78, 67.

Wattal C., Malia N., Ahmad-Khan I., and Agarwal S. C. (1986). Comparative evaluation of ELISA for the diagnosis of pulmonary echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 24, 1, 41.

Wattre P., Capron M., Bekhti A. and Capron A. (1980). Diagnostic immunologique de l'hydatidose. 139 observations. *Nouvelle Presse Médicale* 9 (5), 305.

Webster G A. and Cameron T. W. A. (1961). *Canad. J. Zool.* 39, 877.

Weimann C. J. (1970). Cestodes and Acanthocephala. In "Immunity to parasitic animals" (G. J. Jackson ed.), 2, pp. 1021-1059. Appleton-Century-Crofts, New York.

Westhof E., Altschuh D., Bloomer A. c., Mondragon A., Klug A. and Van Regenmortel M. H. V. (1984). Correlation between sequential mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature.* 311, 123.

Williams, J. F., Perez-Escandi, M.V. and Oriol, R. (1971). Evaluation of purified lipoprotein antigens of *Echinococcus granulosus* in immunodiagnosis of human infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20, 569.

Williams J. F. (1972). An evaluation of the Casoni test in human hydatidosis using an antigen solution of low nitrogen concentration. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66, 166.

Williams J. F. (1979). Recent advances in the immunology of cestode infections. *J. Parasitol.* 65, 337.

Williams J. F., Picone J. and Engelkirk P. (1980). Evasion of immunity by cestodes. In "The host-Invader Interplay" (H. Van des Bossche, ed.), pp. 205-216. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Williams R. J. and Sweatman H. K. (1963). *Parasitology.* 53, 391.

Willms K. and Arcos L. (1977). *Taenia solium* :host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique *Exp. parasitol.* 43, 396.

Witassek F., Burkhardt B., Eckert J., and Bircher J. (1981). Chemotherapy of alveolar echinococcosis. Comparison of plasma mebendazole concentrations in animals and man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 20, 427.

Yamashita J., Ohbayashi M., Sakamoto T., Suzuki K. and Okugi M. (1963). Studies on echinococcosis XIV. Further observations on the difference of susceptibility to *Echinococcus multilocularis* among uniform strains of the mouse. *Jap. J. Vet. Res.* 11, 50.

Yarzabal, L., Bout, D., Naquira, F.R., Capron, A. (1977a). Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63, 495.

Yarzabal L., Dupas H., Bout D., Naquira F. and Capron A. (1977b). *Echinococcus granulosus*: the distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage. II. Localization of the thermostable lipoprotein of parasitic origin (antigen B). *Exp. Parasitol.* 42 (1), 115.

Yarzabal L., Dupas H., Bout D. and Capron A. (1976). *Echinococcus granulosus*: the distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage. I. Localization of the specific antigen of hydatid fluid (antigen 5). *Exp. Parasitol.* 40 (3), 391.

Yarzabal L. A., Leiton J. and Lopez-Lemes M. H. (1974). The diagnosis of human pulmonary hydatidosis by immunoelectrophoresis test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23, 662.

Yarzabal L. A., Schantz P. M. and Lopez-Lemes M. H. (1975). Comparative sensitivity and specificity of the Casoni intradermal and the immunoelectrophoresis tests for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24, 843.

Yong W. K., Heath D. D. and Parmeter S. N. (1978). *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T. ovis*: evaluation of cyst fluids antigen for serodiagnosis of larval cestode in sheep. *New Zealand Vet. J.* 26 (9), 231.

Yong, W.K and Heath, D.D. (1979). Arc 5 antibodies in sera of sheep infected with *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena* and *Taenia ovis*. *Parasite Immunol.* 1, 27.

Yusuf J. N., Frayha J. and Pfasinski J. (1975). *Echinococcus granulosus*: The stimulation of host lymphocytes by parasites antigens. *Exp. Parasitol.* 38. 30.

Zhanqing S., Xinhua F., Zhongxi Q., Ruilin L. and Chunrong Y. (1988). Application of Biotin-Avidin system, determination of circulating immune complexes, and evaluation of antibody response in different hydatidosis patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39, 1, 93.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	10
RESUME	11
GENERALITES SUR L'HYDATIDOSE	14
I. Qu'est-ce que l'hydatidose ?	
A. Cycle biologique d' <i>Echinococcus granulosus</i>	16
B. Evolution anatomopathologique du kyste hydatique	19
C. Variation intraspécifique d' <i>Echinococcus granulosus</i>	21
D. Répartition géographique, épidémiologie et répercussion économique de l'hydatidose	23
E. Moyens de controle et traitement	25
1. Education sanitaire	25
2. Traitement chirurgical	26
3. Chimiothérapie	27
II. Immunité à <i>Echinococcus granulosus</i>	
A. Immunité naturelle à l'infection	30
1. Facteurs de l'hôte	31
2. Différence de l'inféctivité des sous-espèces d' <i>E. granulosus</i>	31
3. Mécanismes de la résistance naturelle	32
B. Immunité aqoise à l'infection	33
1. Immunité vis à vis de l'établissement de la larve (pré-enkystement)	33
1.1. Immunité humorale	34
1.2. Immunité cellulaire	35
2. Immunité vis à vis des métacestodes établis (post-enkystement)	36
2.1. Rôle des anticorps	37
2.2. Immunité cellulaire	37

III. Mécanismes d'évasion

A. Acquisition des antigènes de l'hôte et mimétisme moléculaire	41
B. Enkystement	42
C. Interférence directe avec le système de défense de l'hôte	42

IV. Les immunogènes majeurs du liquide hydatique

A. L'antigène 5	45
B. L'antigène B	46

V. Diagnostic et pronostic de l'hydatidose

A. Le diagnostic clinique	49
1. Hydatidose hépatique	49
2. Hydatidose pulmonaire	50
3. Autres localisations	50
B. Le diagnostic immunologique	51
1. Exploration de la réponse anticorps	51
1.1. Intérêt diagnostique de l'antigène 5	52
1.2. Techniques sérologiques	53
1.3. Réponse anticorps et pronostic de l'hydatidose	54
1.3.1. Dosage des IgE	55
1.3.2. Dosage des IgG, IgA, IgM	55
2. Exploration de la réponse cellulaire	56
2.1. Hypersensibilité immédiate (intradermoréaction de Casoni)	56
2.2. Le test de dégranulation des basophiles	57
2.3. Hypersensibilité retardée	57

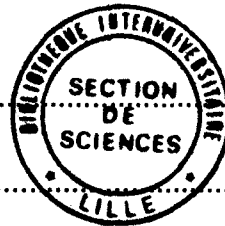
3. Limites du diagnostic immunologique	58
3.1. Réactions faussement négatives	58
3.2. Réactions faussement positives	59
3.2.1. Communauté antigénique des helminthes	60
3.2.2. Contamination des antigènes par des déterminants de l'hôte	61
3.2.3. Variabilité des sources d'approvisionnement des antigènes	61

APPORT DES OUTILS MOLECULAIRES DANS LA STANDARDISATION DES ANTIGENES

A. Préviation des épitopes	65
B. Notion des épitopes conformationnels	66
C. Analyse de la répartition des résidus hydrophobes des protéines (Hydrophobic Cluster Analysis: HCA)	67

TRAVAUX PERSONNELS

Introduction	71
Article 1	73



Utilisation d'un anticorps monoclonal, spécifique d'un épitope protéique de l'antigène 5 d' *Echinococcus granulosus*, dans un test de compétition radioimmunologique, pour le diagnostic de l'hydatidose.

Article 2	84
-----------------	----

Clonage moléculaire d'une protéine d' *Echinococcus granulosus* exprimant un épitope immunogène de l'antigène 5.

Article 3	92
-----------------	----

Valeur diagnostique d'un peptide synthétique dérivé d'une protéine recombinante d' *Echinococcus granulosus*.

DISCUSSION - CONCLUSION	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	132