

50376  
1991  
84

65777

50376  
1991  
84

N° d'ordre : 707

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE - FLANDRES - ARTOIS

THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE - FLANDRES - ARTOIS  
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

par Brigitte FACON

CLONAGE MOLECULAIRE D'UNE PROTEINE D'ECHINOCOCCUS GRANULOSUS  
EXPRIMANT UN EPITOPE IMMUNOGENE DE L'ANTIGENE 5



Présentée à l'Université de Lille I, le 20 mars 1991  
devant la commission d'examen :

Président : M. J. Montreuil

Rapporteurs : Mlle G. Spik

Mme D. Vuitton

Examineurs : M. A. Capron

Mme C. Dissous

M. S. Ball

## REMERCIEMENTS

L'ensemble de 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 (1 rue de Pr. Calmette - 59 000 Lille), sous la direction de M. le Professeur André Capron. Je le remercie sincèrement d'avoir été l'initiateur et l'animateur de ce travail. Qu'il trouve dans ces remerciements le témoignage de mon respect et de ma reconnaissance.

Je remercie vivement Mme C.Dissous pour sa participation à ce Jury de thèse ainsi que pour l'intérêt qu'elle a montré tout au long de ce travail, pour son analyse scientifique et ses propositions constructives quant à l'exploitation et l'interprétation de mes résultats.

Ma reconnaissance s'adresse également à Mlle G.Spik et Mme D.Vuitton, qui ont bien voulu accepter la charge de rapporteurs, ainsi qu'à M. S.Ball qui me fait l'honneur de juger cette thèse.

Je tiens à associer à ce travail M. Mustapha Chamekh dont l'aide amicale et la collaboration scientifique m'ont été précieuses.

Je tiens également à remercier M. Jacques Trolet et Mlle Josette Fontaine pour leur compétence technique et leurs conseils judicieux. Que M. Christian Drolet et Mme Jacklyne Derryck soient assurés de toute ma gratitude pour leur assistance et leur gentillesse. Et je ne saurais oublier la contribution précieuse de tout le personnel du laboratoire.

Les résultats présentés dans ce mémoire ont fait l'objet des publications suivantes :

Facon B., Chamekh M., Dissous C. & Capron A. (1991).

Molecular cloning of an Echinococcus granulosus protein expressing an immunogenic epitope of antigen 5. Mol. Biochem. Parasitol. sous presse

Chamekh M., Facon B., Dissous C., Haque A. & 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 : 129-137.

Présentation lors de congrès :

Facon B., Dissous C. & Capron A.

Molecular cloning of Echinococcus granulosus antigens. Joint Spring Meeting of the British Society for Parasitology, Southampton (England), 20-22 mars 1989.

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

Molecular characterization of Echinococcus granulosus antigen 5 and identification of specific protein epitope. Second International Symposium on Echinococcosis, Faculty of Veterinary Medicine, Zurich, 16-17 août 1990.

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

Molecular characterization of Echinococcus granulosus antigen 5 by a specific monoclonal antibody. VII Congrès International de Parasitologie, Paris, 20-24 août 1990

Brevet d'invention :

Facon B., Chamekh M., Dissous C., Capron A., Tartar A. & Gras Masse H.

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 - Institut Pasteur de Lille - Institut National de la Santé et de la Recherche médicale )

**RESUME**

## RESUME

L'hydatidose est une maladie parasitaire due au cestode Echinococcus granulosus. Les tests actuels de diagnostic de la maladie s'avèrent insuffisants, surtout quant au critère de spécificité parasitaire, du fait d'un manque de standardisation des préparations antigéniques utilisées. Le sérodiagnostic actuel repose sur la détection au sein des sérums de patients, d'anticorps dirigés contre une fraction antigénique appelée antigène 5. Très immunogène, cette molécule reconnue par la majorité des sérums de patients et d'animaux, possède en outre un épitope protéique spécifique d'E.granulosus, caractérisé par un anticorps monoclonal, EG 02 154/12.

Afin de répondre aux exigences de spécificité nécessaires au développement d'un nouveau test sérologique, une approche moléculaire a été entreprise par le biais du clonage moléculaire d'antigènes échinococciques. A partir de protoscolex d'E.granulosus, nous avons préparé de l'ARN dont la capacité à traduire in vitro a été testée en extrait de germes de blé. Par immunoprécipitation, nous avons pu mettre en évidence la présence, au sein de cet ARN, de messagers codant pour des structures peptidiques reconnues par des sérums de patients. Nous avons pu aussi vérifier à nouveau la nature protéique de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12. A partir de cet ARN, une banque d'ADNc a été réalisée en vecteur d'expression lambda gt11, qui a ensuite été criblée à l'aide d'un mélange de 5 sérums de patients hydatiques. Treize clones ont ainsi été sélectionnés. Parmi ceux-ci, 10 ce sont avérés être les différents représentants du même ADNc. Parmi ces derniers, l'un d'entre eux, le clone Eg6, a été plus particulièrement étudié. La détermination de sa séquence nucléotidique (456 pb) a permis de mettre en

évidence un cadre de lecture ouvert sur la totalité du clone, en phase avec le vecteur phagique, et codant pour une protéine de 152 acides aminés (de masse moléculaire calculée de 17,3 kDa). Ce polypeptide de structure secondaire principalement  $\alpha$ -hélicoïdale ne possède aucune homologie de séquence avec des molécules déjà caractérisées et présentées dans les banques de données Swissprot et NBRF. La protéine de fusion correspondante au clone Eg6 (PF6) a été reconnue par 11 des 12 sérums humains hydatiques ainsi que par certains sérums de patients infestés par d'autres parasites (E.multilocularis, Fasciola hepatica, Schistosoma mansoni, Taenia saginata), mais de manière moins marquée et selon des intensités variables. FP6 a aussi été reconnue de manière distincte par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 et apparaît donc être porteuse de l'épitope spécifique de l'antigène 5 d'E.granulosus. Une sélection d'anticorps humains a été réalisée sur le clone recombinant lambda Eg6 exprimant la protéine de fusion. Testés vis à vis des antigènes du liquide hydatique, ces anticorps ont reconnu une molécule de 37 kDa, de même masse moléculaire que celle mise en évidence par un sérum de patient hydatique spécifique de l'antigène 5 (IEP : un arc = arc 5), et correspondant à la masse moléculaire d'une des sous-unités de l'antigène 5. Ces résultats mettent en évidence l'existence d'une corrélation entre l'antigène 5 et le polypeptide cloné.

Par analyse peptidique de la séquence de la protéine recombinante, la définition de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal et les sérums de patients hydatiques pourra être réalisée afin évaluer la participation du polypeptide cloné ou de peptides synthétiques dérivants, à l'élaboration d'un nouveau test sérologique de diagnostic de l'hydatidose.

## SOMMAIRE

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	2
RESUME.....	3
SOMMAIRE.....	8
INTRODUCTION.....	11
GENERALITES	
I - HYDATIDOSE OU ECHINOCOCCOSE A <u>ECHINOCOCCUS GRANULOSUS</u> .....	14
II - LES ANTIGENES ECHINOCOCCIQUES.....	27
III - REPONSE ANTICORPS ET DIAGNOSTIC.....	36
IV - DIAGNOSTIC : NECESSITE DE L'OBTENTION D'UN ANTIGENE STANDARDISE SPECIFIQUE DE L'HYDATIDOSE.....	53
RESULTATS-DISCUSSION	
I - EXTRACTION D'ARN - TRADUCTION <u>IN VITRO</u> .....	57
II - CLONAGE MOLECULAIRE DES ANTIGENES D' <u>E.GRANULOSUS</u> .....	64
III - ETUDE DU CLONE Eg6 D' <u>E.GRANULOSUS</u> .....	71
IV - ANALYSE DE LA PROTEINE DE FUSION DU CLONE Eg6 (PF6).....	80
CONCLUSION.....	92
MATERIEL ET METHODES	
I - MATERIEL BIOLOGIQUE.....	101
II - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES PROTEINES.....	102
III - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES...	106
APPENDICES : Milieux et tampons.....	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	130
TABLE DES MATIERES.....	146
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	151

## INTRODUCTION

L'échinococcose est une maladie parasitaire liée au développement chez l'homme ou chez certains animaux, de la larve d'un cestode de petite taille du genre Echinococcus. Ce parasite est présent dans toutes les parties du monde et l'incidence de la maladie constitue un problème économique et sanitaire sur tous les continents. Les conséquences de cette maladie ont des répercussions médicales et aussi vétérinaires.

Quatre espèces sont couramment reconnues au sein du genre Echinococcus : Echinococcus granulosus (échinococcose à kyste ou uniloculaire), E.multilocularis (échinococcose multiloculaire), E.vogeli (échinococcose à kystes multiples) et E.oligarthrus. Deux espèces prédominent : E.granulosus et E.multilocularis. Bien que très proches, la répartition géographique, l'épidémiologie et le rôle pathogène de ces deux espèces sont nettement distinctes. Il existe néanmoins des zones géographiques de co-existence des deux espèces.

L'échinococcose à E.granulosus est une affection connue depuis l'antiquité et dont l'impact est d'autant plus important que son cycle biologique implique deux vertébrés qui sont généralement des animaux domestiques. L'homme ne constitue pour le parasite qu'un hôte accidentel. Néanmoins, les échinocoques représentent, parmi les cestodes, les espèces les plus dangereuses, surtout en ce qui concerne les souches d'E.granulosus possédant un cycle chien-mouton.

De nombreux travaux parasitologiques furent menés afin de différencier les espèces ou sous-espèces du parasite et d'étudier les relations hôte-parasite. Les études actuelles se tournent principalement vers la caractérisation et l'isolement des antigènes échinococciques en vue de l'élaboration de nouvelles méthodes de diagnostic biologique, plus sensibles et plus spécifiques.

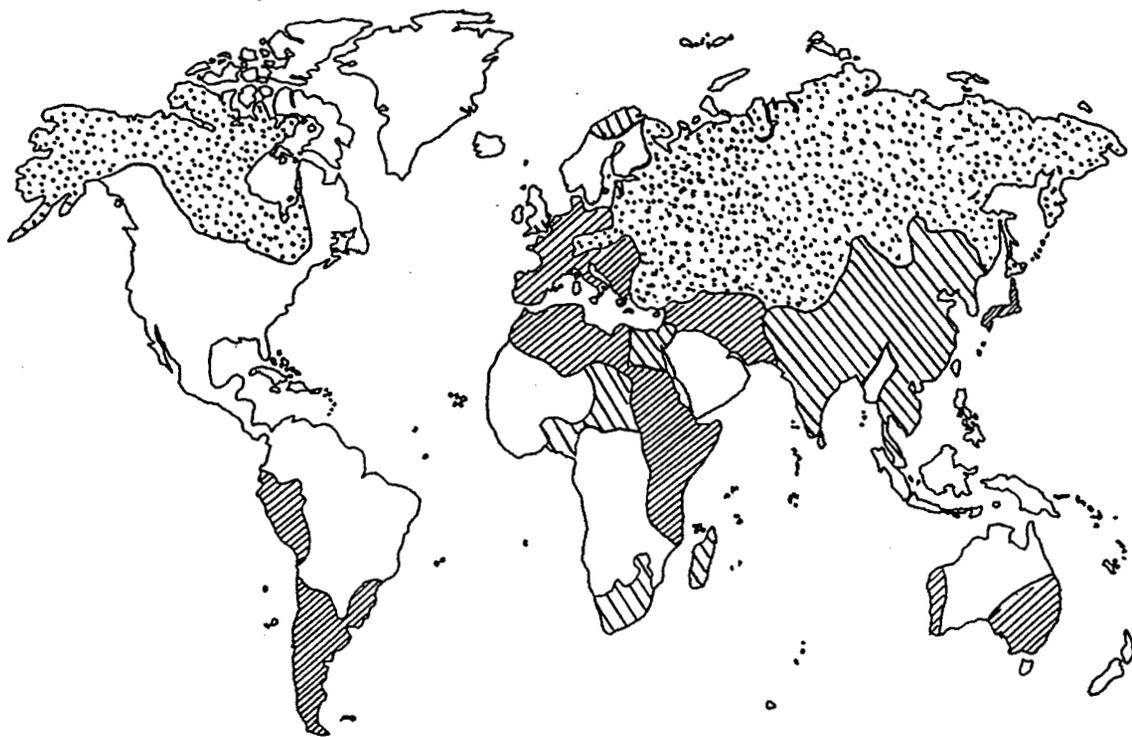
## GENERALITES

## I - HYDATIDOSE OU ECHINOCOCCOSE A ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

### A - CYCLE BIOLOGIQUE ET MORPHOLOGIE

L'échinococcose à Echinococcus granulosus possède une répartition géographique très large mais sévit avec une fréquence particulièrement importante dans tous les pays d'élevage de moutons de type extensif. Les grands foyers mondiaux d'endémie sont le bassin méditerranéen, l'Amérique du Sud, l'Australie, la Nouvelle Zélande et l'Est de l'Afrique. La figure 1 montre les principales régions d'endémie et de co-existence d'E.granulosus et d'E.multilocularis. Il semble cependant que contrairement à ce qui est présenté par Matossian et al.-1977, le Nord de l'Europe et de la France ne soient actuellement pas considérés comme régions d'hyperendémie. On compte en France, un grand nombre de cas en provenance de foyers très actifs du bassin méditerranéen. Mais il subsiste encore quelques foyers d'infection traditionnels bien que l'on note une tendance à la régression dans certaines régions du Sud (Sud-Est, Pyrénées, Corse...).

Le cycle du parasite nécessite la présence successive de deux agents vertébrés pour son accomplissement complet (cf figure 2). L'adulte d'Echinococcus granulosus vit dans les villosités de l'intestin grêle d'un mammifère carnivore, de la famille des Canidés (le chien en général). A maturité, le dernier anneau se détache et libère dans les faeces les oeufs qui iront souiller le sol ou les végétaux. Des phénomènes comme le vent, la pluie ou les insectes pourront intervenir dans la dissémination des oeufs. La plupart des mammifères herbivores, en majorité les moutons et les bovins, sont susceptibles d'être infestés par ingestion des oeufs ou par contact avec le chien. De la même manière, l'homme peut aussi être infesté, mais il correspond, pour le parasite, à un "cul de sac" évolutif. L'oeuf



**Figure 1 : distribution globale de l'hydatidose humaine et animale (Matossian et al.- 1977) .**

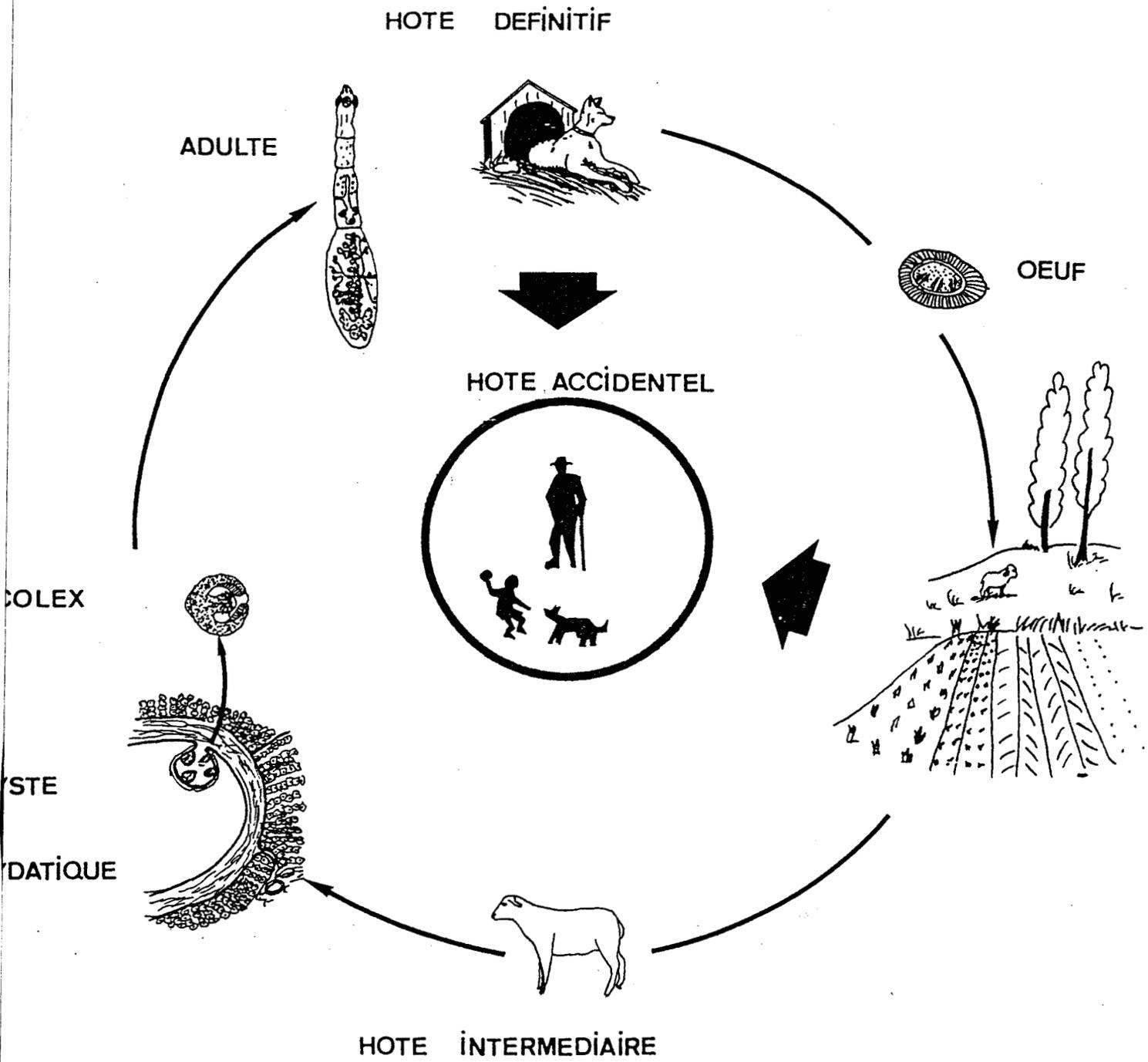


FIGURE 2 : Cycle biologique du parasite Echinococcus granulosus.

ingéré libre dans le tube digestif l'embryon hexacanthé qui traverse la paroi intestinale. Celui-ci, par le système sanguin, va se loger dans le foie, le poumon ou n'importe quel autre point de l'organisme. Là, il va se transformer en une larve ou hydatide à l'intérieur de laquelle, après plusieurs mois, bourgeonneront des protoscolex. A terme, le kyste formé pourra contenir des milliers d'éléments infestants. La poursuite du cycle nécessite l'ingestion de ces protoscolex par un nouvel hôte définitif. Chacun d'entre eux donnera naissance à un ténia qui deviendra adulte en six semaines.

E. granulosus est un des plus petits cestodes intervenant dans la pathologie humaine. L'adulte d'Echinococcus granulosus mesure 3 à 6 mm. La tête ou scolex comporte 4 ventouses et une double couronne de crochets (scolex armés) (cf figure 3). Elle est portée par un cou très court. Le corps est constitué de 3 anneaux dont le dernier est rempli de plusieurs centaines d'œufs ou embryophores. Les œufs mesurent de 30 à 37  $\mu\text{m}$  de diamètre et ne sont pas distinguables ni de ceux d'Echinococcus multilocularis, ni de ceux de Taenia hydatigena ou des sous-espèces de Multiceps. Ils sont très résistants et peuvent survivre de 6 à 12 mois dans le sol.

L'hydatide se développe à partir de l'embryon par formation de vésicules et constitue très progressivement (en plusieurs mois ou années) un kyste de taille parfois énorme (de 10 à 300 mm), refoulant par compression les tissus de l'organe parasité. A terme, cette masse hydatique est constituée, de l'extérieur vers l'intérieur, de l'adventice, de la membrane anhiste ou cuticulaire, de la membrane prolifère ou germinative et des protoscolex (cf figure 4). L'adventice n'est pas une structure parasitaire. Elle est constituée par le parenchyme de l'organe-hôte refoulé par la croissance de l'hydatide. La membrane anhiste représente la paroi

FIGURE 3 : MORPHOLOGIE DU PARASITE. A : Ver adulte

B et C : Protoscolex (B : Forme parasitaire trouvée dans le kyste

C : Forme parasitaire trouvée chez l'hôte définitif)

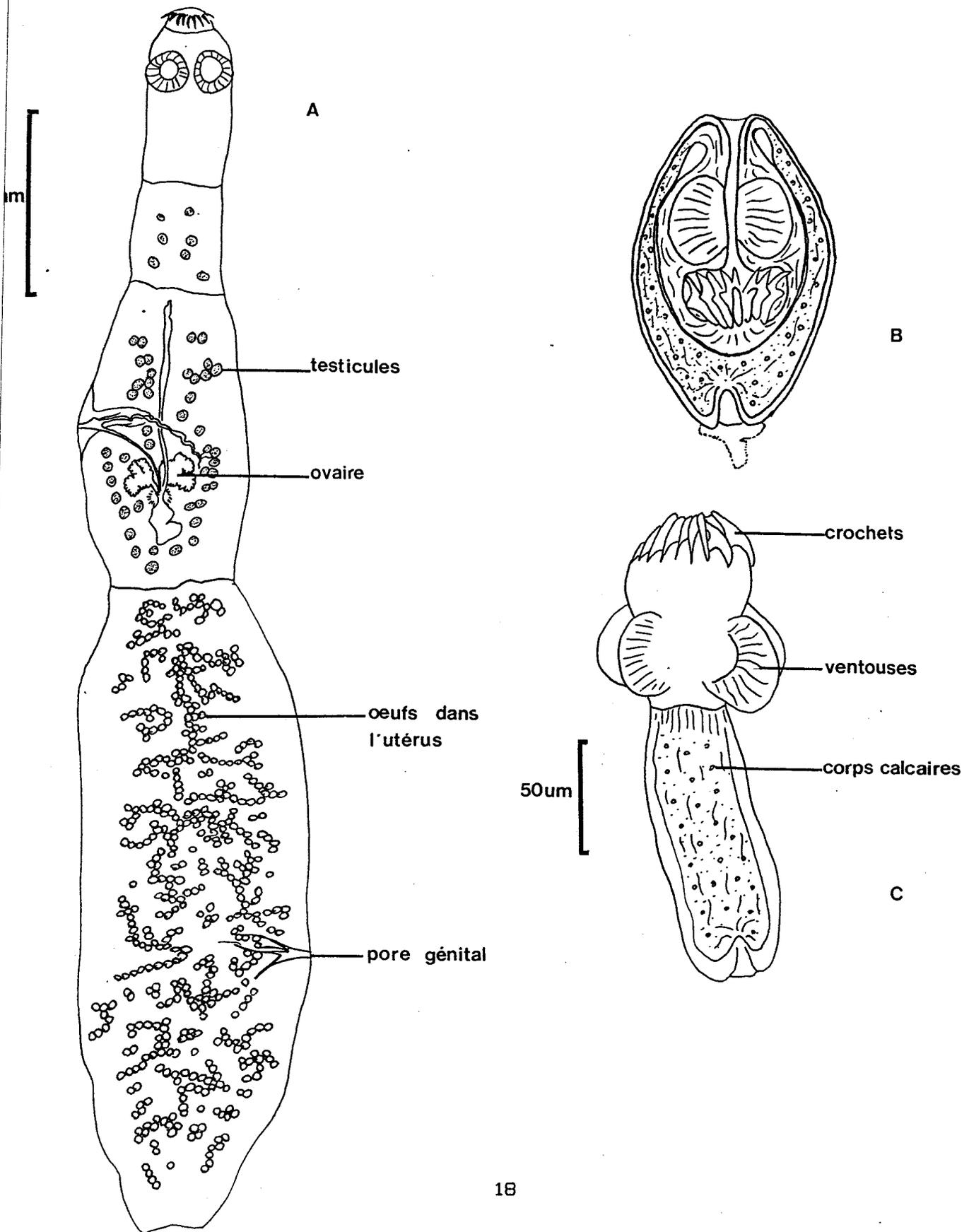
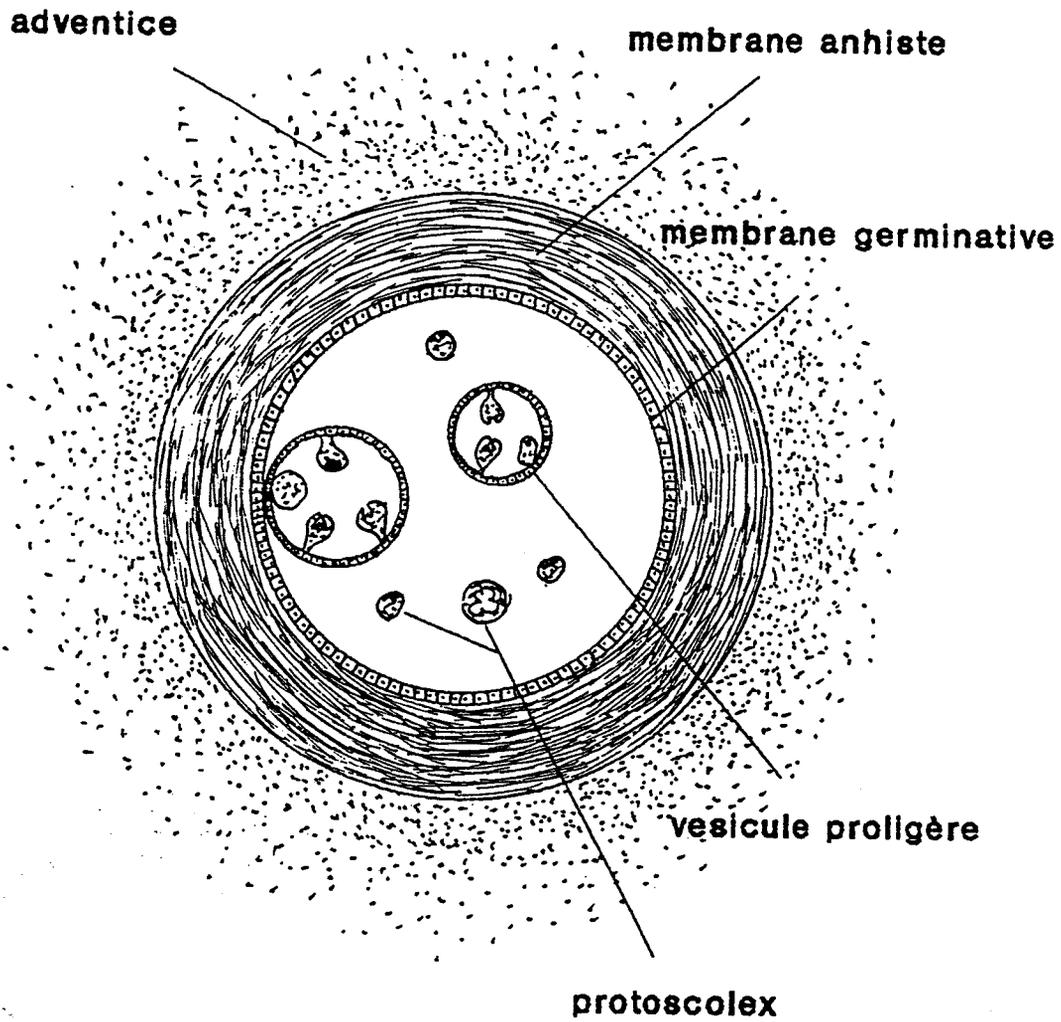


FIGURE 4 : Le kyste hydatique.



externe de l'hydatide. Elle est constituée de couches concentriques d'une substance proche de la chitine, de couleur blanche ou ivoire et peut atteindre l'épaisseur de 1 à 2 mm. Elle se comporte comme une membrane de dialyse tout en empêchant la pénétration des bactéries. Elle protège la membrane prolifère qui produit les protoscolex. Celle-ci est une couche fine et fragile de cellules syncytiales, de couleur blanche. Elle donne naissance aux protoscolex qui peuvent exister sous forme libre dans le liquide hydatique ou réunis par 10 ou 20 dans de petites sphères de membrane germinative (vésicules prolifères). Ils pourront par la suite, soit redonner naissance à un ténia adulte après ingestion par un hôte définitif, soit former à nouveau des vésicules. La formation de vésicules peut avoir lieu dans l'hydatide primitive. Ce phénomène endogène aboutit à la création de vésicules filles qui, après fissuration ou rupture, colonisent d'autres parties de l'organisme. C'est alors l'échinococcose secondaire. Des vésicules filles de type exogène peuvent aussi prendre naissance à partir d'ilôts de membrane germinative situés entre les lames cuticulaires. Ils se transforment en vésicules qui font saillie, s'accolent à la paroi extérieure du kyste et peuvent même s'en détacher. Ce type de vésicules existe rarement chez l'homme mais apparaît plus couramment chez l'animal.

## B - TAXINOMIE

Un certain nombre de populations parasitaires initialement décrites comme espèces ou sous-espèces font maintenant l'objet de travaux afin de définir leur réel statut taxinomique. Elles sont actuellement nommées sous le terme non formel de "souches". E.granulosus possède le plus haut degré de telles variations intraspécifiques et un certain nombre de ces souches

ont été rapportées par Thompson-1986. L'étude des différentes souches n'a pas seulement permis de mettre en évidence des variations au niveau métabolique, anatomique ou biologique (hôte - type de transmission), mais aussi d'observer des modifications de la manifestation pathologique voire même de la susceptibilité aux traitements (Saimot et al.-1981, Schantz et al.-1982, Kammerer & Schantz-1984), influant directement sur l'épidémiologie locale et le contrôle de la maladie. De telles différences intra- et interspécifiques apparaissent donc comme un facteur d'importance intervenant dans le développement de tests d'immunodiagnostic ou de vaccination (Schantz et al.-1982, Gottstein et al.-1983, Lightowlers et al.-1984).

## C - EPIDEMIOLOGIE

Bien que l'hydatidose ne soit pas une parasitose très courante, la gravité même de cette maladie en fait un problème de santé publique très important pour un certain nombre de pays. Les chiffres les plus élevés répertoriés sont ceux de l'Uruguay où un taux de morbidité de 17,7 a été enregistré entre 1962 et 1971 (exprimé en nombre de cas nouveaux / 100000 habitants) (Eckert et al.-1981). Actuellement, ce pays reste la zone d'endémie où la maladie a la plus forte incidence. Mais il faut aussi noter un taux de morbidité de 12,9 pour Chypre, 7,8 pour le Chili, 7,9 pour la Grèce et 5,6 pour l'Algérie. L'incidence de la maladie s'avère être prévalente chez les communautés rurales (Schantz-1984).

Dans certaines zones où le cycle du parasite E.granulosus s'achève en milieu sauvage (par exemple le Nord du Canada où les carnivores sauvages servent d'hôtes définitifs), il n'est pas exclu que les chiens domestiques

puissent être contaminés par ingestion de rongeurs ou d'herbivores sauvages parasités qui constituent une part importante de leur alimentation, et représentant ainsi un nouveau risque pour l'homme.

La résistance particulière de l'oeuf apparaît aussi un facteur important dans la transmission de la maladie et la pérennité du cycle, tant en milieu froid (ex. l'hiver en Nouvelle-Zélande) qu'en atmosphère chaude et sèche (ex. pays méditerranéen).

#### D - INCIDENCE ECONOMIQUE

Si l'incidence de la maladie est clairement établie d'un point de vue médical ou vétérinaire, il est beaucoup plus difficile d'en évaluer l'importance économique. Une étude en Italie (Arru et al.-1984) a évalué les coûts médicaux de cette maladie à approximativement 6 millions de dollars par an, pour 1000 à 1500 cas répertoriés chaque année.

Mais en dehors de l'aspect médical, les effets économiques se font aussi ressentir dans le domaine agricole et industriel, de par l'implication des animaux domestiques dans le cycle du parasite et tout particulièrement des ovins et des bovins. Le coût de condamnation des organes ou des carcasses parasités représentent des pertes importantes auxquelles viennent s'ajouter des restrictions d'importation conséquentes à la maladie. Les effets directs sur la production animale se font aussi ressentir (baisse de rendement de lait, laine, impact sur la qualité de la viande, retards de croissance, baisse de fertilité), sans tenir compte des coûts indirects des campagnes de contrôle. L'importance des pertes est évidemment liée au type d'élevage pratiqué (intensif, extensif, ovin, bovin...) ainsi qu'au type de production (viande, laine...). Les conséquences de cette parasitose ont ainsi été évaluées à 18 millions de

dollards/an pour l'élevage ovin et 7 millions de dollars/an pour la production bovine en Italie (Arru et al.-1984). Pour certains pays, les pertes sont si considérables que l'hydatidose est considérée comme la zoonose la plus importante, économiquement parlant.

#### E - PROPHYLAXIE

Les moyens prophylactiques mis en œuvre visent essentiellement à interrompre le cycle biologique du parasite afin de prévenir la maladie. Pour E.granulosus, l'action peut être menée à trois niveaux, sur le chien, le bétail ou sur l'homme.

Des programmes de contrôle ont été mis en place dans certaines régions d'endémie, en Nouvelle Zélande, en Australie (Tasmanie), en URSS, en Argentine, à Chypre et en Uruguay. Ces opérations de lutte sont essentiellement basées sur l'éducation de la population dans le but de limiter ou d'empêcher l'infection du chien. Une baisse significative de la fréquence de la maladie a pu être notée lors de ce type de prophylaxie (Gemmel & Lawson-1986). La campagne de contrôle la plus satisfaisante a été mise en place en Islande, basée sur le traitement des chiens à l'aide d'antihelminthiques associé à des mesures d'hygiène publique. Cette prophylaxie a permis l'éradication de la maladie dans l'île (auparavant 1/4 de la population était infesté).

#### F - MANIFESTATIONS CLINIQUES ET PATHOGENICITE

Les signes cliniques de l'hydatidose sont fonction de la localisation et du nombre de kystes dans l'organisme parasité. Les symptômes de la maladie sont peu caractéristiques et le diagnostic est souvent déterminé

soit par un examen systématique du malade, soit par l'observation de complications survenues par la compression des organes voisins du kyste ou de la rupture (fissuration) de ce dernier. La progression est très lente et les symptômes ressemblent à ceux causés par une tumeur à développement lent. Les troubles sont discrets et, sauf pour une localisation au cerveau ou à l'oeil, ils passent inaperçus du fait de la longue période d'incubation (plusieurs années). Les effets sur le patient amènent des phénomènes d'inappétance, de nausées ou, plus spécifiquement, des problèmes de réactions allergiques comme des prurits, des poussées d'urticaire, ou une hyperéosinophilie sanguine. La rupture d'un kyste peut avoir des conséquences allergiques importantes chez le malade déjà sensibilisé aux allergènes hydatiques, pouvant conduire au choc anaphylactique voire à la mort du patient. En moyenne, on compte 6 à 10% des cas d'échinococcose diagnostiquée ayant une fin fatale pour le patient. Le pronostic est meilleur lorsque le ou les kystes sont accessibles au chirurgien. Il est d'autant plus favorable que la maladie est dépistée précocement.

#### 1 - Hydatidose hépatique

C'est la localisation la plus fréquente chez l'homme (50 à 60% des cas) et celle dont la latence clinique est la plus longue (10 à 15 ans, voire plus). Elle peut prendre 2 formes : une forme biliaire amenant des troubles fonctionnels du foie ou une forme tumorale, moins fréquente, se traduisant par une hépatomégalie isolée, indolore et sans signes fonctionnels d'accompagnement. La forme biliaire se manifestera par des complications telles que la compression des voies biliaires ou des systèmes veineux, porte ou cave, la fissuration ou la rupture du kyste, conduisant soit à un choc anaphylactique immédiat, soit à une évolution

vers une échinococcose secondaire tardive, locale ou générale, concourant à l'aggravation de l'état du malade. L'infection d'un kyste fissuré ou rompu peut aussi se produire, évoluant vers un abcès du foie.

## 2 - Hydatidose pulmonaire

Elle apparaît dans 30 à 40% des cas humains et sa latence est moins longue que dans le cas d'une localisation hépatique. Des manifestations telles que toux, dyspnée, hémoptysies peuvent apparaître comme symptômes de la maladie. Les complications sont les mêmes que pour le foie et sont généralement dues à des phénomènes de compression d'une bronche, de fissuration et/ou rupture du kyste entraînant des vomissements et le rejet d'un liquide "eau de roche" assez caractéristique. La vomique peut être discrète et les phénomènes allergiques minimes ou totalement absents. La fissuration peut aussi entraîner des hémoptysies à répétition. Une contamination du kyste peut survenir amenant une infection. L'ensemble évolue alors comme un abcès du poumon.

## 3 - Autres localisations

Le kyste peut se développer au sein de n'importe quel organe du corps : rein, rate, cerveau... Le caractère tumoral se révélera rapidement dans des localisations telles que le cerveau, le bulbe rachidien, ou l'œil.

L'échinococcose osseuse correspond à 1% des cas. Le parasite peut se développer dans tout le squelette mais possède une prédilection pour la colonne vertébrale et les os iliaques. Il ne se constitue pas d'adventice et l'hydatide, non limitée, se développe de manière anarchique et envahissante entraînant des fractures pathologiques. L'évolution est lente et le pronostic est généralement défavorable.

## G - TRAITEMENTS

### 1 - Traitement chirurgical

Actuellement, le traitement de l'hydatidose reste essentiellement chirurgical. Il consiste en une kystectomie voire une exérèse partielle ou totale de l'organe parasité, selon l'état de gravité de la maladie. Afin d'éviter une récurrence par dissémination des protoscolex, le kyste est généralement rendu stérile par injection d'une solution formolée à 2%. Le contenu est évacué par ponction en évitant la contamination.

### 2 - Traitement chimique

Chez le chien, le traitement chimique apparaît comme le meilleur moyen de contrôle de la maladie. L'utilisation régulière d'antihelminthiques spécifiques tel que le praziquantel permettra l'élimination des vers adultes et l'interruption du cycle biologique.

Chez l'homme, l'utilisation de produits chimiques n'apparaît qu'en complément de cure. La chimiothérapie n'est envisagée que dans les cas "chirurgicalement dépassés", ou lors d'un refus d'intervention chirurgicale ou encore en cas de risque élevé d'échinococcose secondaire (kyste fertile, fissuré ou rompu). On utilise généralement des dérivés imidazolés tels que le mébendazole, le flubendazole et l'albendazole. Considérant son action sur l'adulte, le praziquantel a été testé sur les métacestodes dans des tests expérimentaux sur animaux, mais il s'est révélé sans grande efficacité sur le kyste (Heath & Lawrence-1978), bien qu'une activité positive ait été enregistrée contre les protoscolex d'E.granulosus (Thomas & Gonnert-1978). D'autres substances sont à l'essai (Eckert-1986) mais montrent en général une efficacité moindre que celle du mébendazole ou du flubendazole (Tinar-1979). Ces derniers agissent directement sur le kyste

d'E.granulosus, lequel apparaît après traitement, irrégulier, dégénéré. On observe une perte du liquide hydatique après l'attaque de la paroi du kyste. Les protoscolex sont tués et la membrane germinative est détruite, ce qui élimine tout risque de récurrence (Heath et al.-1975, Schantz et al.-1982, Santiago et al.-1980, Swiderski-1985). Utilisé chez l'homme, le mébendazole s'est révélé efficace dans les cas d'hydatidose primaire (Bekhti et al.-1977) mais il faut néanmoins l'administrer en quantité importante et durant de longues périodes. Un effet tératogène ayant été détecté chez le rat en cas d'une utilisation à fortes doses (Bourée et al.-1977), on préconise plus généralement l'emploi de dérivés fluorés, tel que le flubendazole, dont les effets secondaires sont moindres, tout en ayant les mêmes propriétés.

## II - LES ANTIGENES ECHINOCOCCIQUES

### A - COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES EXTRAITS PARASITAIRES

La caractérisation des structures moléculaires parasitaires des échinocoques est à l'étude depuis déjà longtemps. De nombreux travaux ont tenté de définir tant biochimiquement, qu'immunologiquement, les constituants de la larve hydatique. L'analyse du liquide hydatique a permis de mettre en évidence, outre les protéines qui en sont les composants majeurs (Chordi & Kagan-1965, Coltorti & Varela Diaz-1972, Hustead & Williams-1977, Edwards-1982), la présence d'acides nucléiques (Fraya & Haddad-1980), d'acides aminés (Krvavica et al.-1959, Sanchez & Sanchez-1971), de carbohydrates, de lipides (Fraya & Haddad-1980,

Benito-1984), d'électrolytes (Fraya & Haddad-1980, Benito et al.-1983) ainsi que d'enzymes (McManus & Smyth-1979) et de composés azotés (Fraya & Haddad-1980). La matière sèche représente 1,3% du liquide hydatique (Lemaire & Ribere-1935). Parmi les protéines, on compte en majorité albumine et globulines (en quantité deux fois plus importante) (Fraya & Haddad-1980). Des polysaccharides de petites masses moléculaires ont été identifiés au sein du liquide hydatique : glucose, sucrose, tréhalose (Frayha & Haddad-1980). Le glycogène de masse moléculaire plus importante n'est trouvé qu'en quantité infime (Frayha & Haddad-1980).

L'analyse biochimique des protoscolex définit sensiblement les mêmes composants généraux. Les larves sont constituées de 14,8% de matière sèche parmi laquelle les protéines sont majoritaires (62,5%). Comme pour le liquide hydatique, albumine et globulines en représentent les principaux composés (Agosin et al.-1957, McManus & Smyth-1978a, Frayha & Haddad-1980). Les acides nucléiques, ADN et ARN, sont présents à des taux variables selon les souches (McManus & Smyth-1978a, Agosin et al.-1957, Frayha & Haddad-1980). Les sucres représentent 19,8% des composés secs des protoscolex (Agosin et al.-1957). On y trouve des polysaccharides de masse moléculaire importante et tout particulièrement du glycogène en grande quantité (Agosin et al.-1957, McManus & Smyth-1978a, Frayha & Haddad-1980). Une analyse complète des acides gras a été réalisée par Digenis et al.-1970, complétée par Frayha & Haddad-1980. Cholestérol, esters de cholestérol, mono- et triglycérides furent caractérisés ainsi que divers composants des phospholipides. La présence d'enzymes (phosphatases, transaminases GOT, GPT et lactate déshydrogénase) fut détectée en quantité significativement plus importante chez le protoscolex que dans le liquide hydatique (Frayha & Haddad-1980).

## B - ANALYSE DES ANTIGENES DU LIQUIDE HYDATIQUE

### 1 - Caractérisation

Le liquide hydatique est constitué de molécules et de macromolécules, produits du métabolisme du parasite. Il représente, pour l'individu-hôte, une source de substances étrangères susceptibles de devenir les cibles du système immunitaire. L'ensemble de ces produits parasitaires forme une mosaïque d'antigènes qui a été largement étudiée par de nombreux auteurs (Biguet et al.-1962a, 1962b, 1965, Chordi et al.-1964, 1965, Norman et al.- 1964). Bien qu'une grande variété de techniques ait été utilisée, le liquide hydatique se définit généralement selon ses caractéristiques électrophorétiques (IEP) (Chordi & Kagan-1965, Capron et al.-1968, D'Amelio et al.-1985, Gottstein et al.-1987). Il se compose de molécules qui migrent de manière prépondérante dans les régions bêta et gammaglobulines (Biguet et al.-1962c, Kagan & Norman-1963b, Norman et al.-1964). Au sein de celles-ci, deux lipoprotéines majeures ont été mises en évidence, l'antigène 5 et l'antigène B qui font l'objet de deux paragraphes de ce chapitre (Capron et al.-1968, Oriol et al.-1971).

### 2 - Variations antigéniques

Du fait de la grande diversité des composants du liquide hydatique, la définition même de celui-ci peut se moduler selon la sensibilité et la spécificité des méthodes d'analyse, mais aussi selon le mammifère infesté ou la souche d'E.granulosus. En dehors des altérations métaboliques et/ou physiologiques, l'existence de modifications biochimiques a été révélée chez les larves des différentes sous-espèces du parasite. Elles

apparaissent responsables des variations antigéniques observées par de nombreux auteurs chez les différentes souches d'E.granulosus (Smyth & Davies-1974, McManus-1981, Thompson & Kuramatilake-1982, Thompson et al.-1984, Pezzela et al.-1984b, McManus & McPherson-1984). Il a aussi été montré l'existence de profils antigéniques modifiés, variant selon le mammifère infesté (McManus & Smyth-1978, 1979, 1982, McManus-1981, McManus & Simpson-1985, Gottstein et al.-1987).

L'ensemble des travaux réalisés sur le liquide hydatique a non seulement permis de caractériser les composants antigéniques parasitaires immunologiquement actifs, mais aussi de mettre en évidence l'existence de substances d'origine étrangère provenant de l'hôte (Biguet et al.-1962, Kagan-1963, 1968, Chordi & Kagan-1965, Capron et al.-1967, Kagan & Agosin-1968, Bouchara et al.-1985). Ainsi, il a été découvert parmi les antigènes hydatiques des substances ayant des activités croisées avec des fractions albuminique et globuliniques de l'homme ou du mouton (Kagan & Norman-1963b, Norman et al.-1964, Pezzela et al.-1984b, Bouchara et al.-1985) ou montrant de fortes similitudes avec les molécules sériques (Chordi & Kagan-1965). La présence d'immunoglobulines dans la paroi du kyste et au sein des antigènes du liquide a été montrée (Varela-Diaz & Coltorti-1972, 1973, Coltorti & Varela-Diaz-1974). L'existence de telles substances provenant de l'hôte semble à l'origine de la création de réactions faussement positives lors des tests de diagnostic sérologiques utilisant le liquide hydatique brut comme source d'antigènes (Chordi & Kagan-1965, Kagan-1968). La présence de simples déterminants antigéniques identiques à ceux de l'hôte et portés par des molécules parasitaires suffit à créer un résultat positif (Edwards-1982). Ainsi, une substance possédant une activité immunologique identique à l'antigène P1 du groupe sanguin humain (Cameron & Staveley-1957, Morgan & Watkins-1964, Russi et al.-1974)

apparaît être responsable de la création de réactions faussement positives chez les individus exprimant des anticorps anti-P1, de manière naturelle ou non (Ben Ismail et al.-1980). Ce déterminant d'origine parasitaire a été retrouvé chez d'autres parasites, notamment chez Fasciola hepatica (Ben Ismail et al.-1978, 1979) où il semble induire le même type de réaction immune chez l'individu-hôte, réaction pouvant interagir avec le déterminant hydatique lors de tests de dépistage.

Ce type de communautés ou d'interaction hôte-parasite représente une partie importante des fractions hydatiques et concerne directement les phénomènes de non-spécificité. Mais, il ne faut pas non plus exclure les problèmes de communautés entre parasites. En effet, les cestodes apparaissent comme une famille possédant une remarquable homogénéité structurale. Les communautés antigéniques concernent près de 2/3 des fractions parasitaires (Capron et al.-1968). De fortes réactions croisées ont ainsi été mises en évidence entre E.granulosus et E.multilocularis (Capron et al.-1970, Rickard et al.-1977, Davies et al.-1978) et d'autres cestodes proches comme les Taeniae (Kagan & Agosin-1968, Kagan-1968, Capron et al.-1968), et tout particulièrement pour l'antigène 5 et l'antigène B (cf paragraphes suivants). Mais d'autres parasites, plus ou moins proches, semblent aussi être impliqués dans des phénomènes de croisements comme Schistosoma mansoni, Fasciola hepatica ... (Biguet et al.-1962, 1965, Capron et al.-1968, Kagan & Agosin-1968, Bout et al.-1974, Varela-Diaz et al.-1975b, Yarzabal et al.-1977a). Dans certains cas, les composants responsables ont pu être définis. Ainsi le déterminant hydatique semblable à l'antigène P1 humain retrouvé chez F.hepatica est considéré comme l'un des principaux responsables des erreurs entre la distomatose et l'échinococcose. Pareillement, l'existence d'épitopes phosphoryl choline (PC) chez un grand

nombre d'organismes, retrouvé chez E.granulosus par Maizels et al.-1987, semble induire une réponse anticorps anti-PC, responsable de réactions croisées avec d'autres parasites tels que F.hepatica, S.mansoni ou avec des nématodes (Shepherd & McManus-1987). L'existence de fractions communes entre parasites semble être responsable d'un grand nombre d'interactions lors de tests d'immunodiagnostic (Schantz et al.-1980, Speiser-1980, Craig-1986).

## C - L'ANTIGENE 5 ET L'ANTIGENE B

### 1 - L'ANTIGENE 5

La méthode de référence la plus couramment employée pour le sérodiagnostic de l'hydatidose reste l'immunoélectrophorèse (IEP). La présence d'un arc appelé arc 5 révélé par un sérum humain ou animal est considéré comme le critère de positivité de ce test (cf schéma) (Capron et al.-1970, Wattre et al.-1980). Identifié par Capron et al.-1967, l'antigène 5 correspond à la fraction antigénique majeure du liquide hydatique et détermine l'apparition précoce d'anticorps dans l'affection ou l'immunisation. La dénomination de cette molécule varie selon les auteurs. Il semble que la fraction 5 corresponde à l'antigène A d'Oriol et al.-1971 et de Williams et al.-1971, ainsi qu'à l'antigène 4 de Piantelli et al.-1977 et de Pozzuoli et al.-1975. Elle est décrite comme une lipoprotéine thermolabile ayant des activités  $\alpha$  et  $\beta$  carboxyl-estérasique, et capable de fixer la concanavoline A (Oriol et al.-1971, Bout et al.-1974, Pozzuoli et al.-1975). Elle peut exister sous une forme agrégée de très haute masse moléculaire de 100 à 400 kDa (Oriol et al.-1971,

Dottorini & Tassi-1977), constituée de sous-unités liées de manière non covalente d'environ 60 kDa (Bout et al.-1974, Dottorini & Tassi-1977, Piantelli et al.-1977, Shepherd & McManus-1987). Analysé en conditions réductrices, ce monomère donne naissance à 2 molécules de 37 et 22 kDa (Chamekh et al.-1990, ou de 38 et 20 kDa selon Shepherd & McManus-1987).

On retrouve l'antigène 5 associé aux cellules parenchymateuses des protoscolex, de la paroi des capsules proligères, dans la membrane germinative, et aussi en faible quantité, dans les conduits excréteurs et les cellules flammes (Yarzabal et al.-1976, Rickard et al.-1977, Davies et al.-1978).

Bien que présent en quantité 10 fois moins importante que l'antigène B (Musiani et al.-1978), l'immunoréactivité de l'antigène 5 est pourtant nettement supérieure avec les sérums de patients (Shepherd & McManus-1987). Très immunogène, cette fraction est reconnue par la majorité des sérums humains (Capron et al.-1967, 1970, Williams et al.-1971, Yarzabal et al.-1974, Pozzuoli et al.-1975, Musiani et al.-1978) ou d'animaux d'élevage (Schantz -1973, Yong et al.-1978, Conder et al.-1980). La localisation du kyste dans l'individu (homme ou animal) n'influe pas sur la réponse anticorps anti-Ag5 (Capron et al.-1970, Yarzabal et al.-1974, Varela-Diaz et al.-1976, Yong & Heath-1979).

La possibilité de produire des immunosérums monospécifiques dirigés contre l'antigène 5 a conduit à la standardisation de nouveaux tests sérologiques : tests d'ELISA avec l'antigène purifié (Bout et al.-1975, Farag et al.-1975, Mérouia et al.-1982), tests de RAST ou dosage d'IgE spécifiques (Dessaint et al.-1975, Mérouia et al.-1982), de double diffusion en gel d'agarose ou DDS (Coltorti & Varela-Diaz-1978, Bout et al.-1979, Conder et al.-1980). Dans l'ensemble, les auteurs s'accordent

pour constater une meilleure sensibilité des tests lorsque l'antigène purifié est utilisé. Par contre, la spécificité des tests n'est apparemment pas améliorée par rapport à l'IEP.

Des phénomènes de réactions croisées avec d'autres parasitoses, déjà observés avec les autres techniques sérologiques, n'ont pu être évités par l'utilisation de l'antigène 5 purifié. Il semble que cet antigène, ou tout au moins certains de ses épitopes, soient communs à d'autres parasites. Une communauté antigénique a été mise en évidence entre les genres voisins E.granulosus et E.multilocularis (Farag et al.-1975, Rickard et al.-1977, Varela-Diaz et al.-1977b, Yarzabal et al.-1977a), E.vogeli (Varela-Diaz et al.-1978), ainsi qu'avec Taenia solium (Schantz et al.-1980), T.hydatigena (Varela-Diaz et al.-1977a, Yong & Heath-1979, Conder et al.-1980), T.ovis (Yong & Heath-1979), ou d'autres hémintes moins proches comme les trématodes Schistosoma mansoni et S.haematobium (Shepherd & McManus-1987). Cependant, la présence d'épitopes phosphoryl choline (PC) sur l'antigène 5 semble être principalement responsable de ces interactions (Shepherd & McManus-1987).

## 2 - L'ANTIGÈNE B

L'antigène B décrit par Oriol et al.-1971 constitue le composant majeur du liquide hydatique. Il correspond à l'antigène 5 de Piantelli et al.-1977 et de Pozzuoli et al.-1975. C'est une lipoprotéine stable à 100°C pendant 15 mn et dont les propriétés antigéniques ne sont altérées ni par la chaleur ni par la délipidation (Oriol et al.-1971, Bout et al.-1974). Sa masse moléculaire est voisine de 150 kDa (Pozzuoli et al.-1972, Bout et al.-1974, Oriol & Oriol-1975). Analysé en gel de polyacrylamide-SDS, cet

antigène se décompose en trois sous-unités dont les masses moléculaires se situent entre 10,5 et 20 kDa, en conditions réductrices ou non. celles-ci peuvent se lier de manière non covalente et former des agrégats de masses moléculaires importantes et variables, et selon un équilibre réversible (Oriol et al.-1971, Piantelli et al.-1977). Certains auteurs ont mis en évidence la présence d'une activité  $\alpha$  et  $\beta$  carboxyl-estérasique liée à cette molécule (Bout et al.-1974). Ses caractéristiques optiques la décrivent comme une structure organisée en hélice alpha pour 50% (Oriol & Oriol-1975). L'antigène B est présent dans le cytoplasme des cellules tégumentales proches et antérieures aux ventouses des protoscolex, ainsi que dans la substance interne des capsules proligères et dans la membrane cuticulaire (Yarzabal et al.-1977b, Rickard et al.-1977, Davies et al.-1978). On le retrouve associé aux substances PAS-positives (Kilejian et al.-1961) recouvrant le tégument des protoscolex (Yarzabal et al.-1977b, Rickard et al.-1977). Il est probablement secrété par les cellules de la région tégumentale et s'y accumule. En dehors du phénomène de sécrétion, la présence de l'antigène B au sein du liquide hydatique apparaît aussi être la conséquence de la dégradation des cellules parenchymateuses du protoscolex et de la membrane des capsules proligères où on le trouve en quantité moindre (Davies et al.-1978). Bien qu'identifié en quantité 10 fois plus importante que l'antigènes 5 dans le liquide hydatique, l'antigène B apparaît nettement moins immunogène que celui-ci, tout au moins chez l'homme (Pozzuoli et al.-1975, Shepherd & McManus-1987). Facilement purifiable et prédominant, il pourrait être un outil intéressant pour le sérodiagnostic de l'hydatidose. Mais, il apparaît être commun à plusieurs parasites dont E.multilocularis (Bout et al.-1974, Mérouia et al.-1982, Rickard et al.-1977, Davies et al.-1978), ainsi que Schistosoma mansoni, Fasciola hepatica (Korach & Benex-1966, Bout

et al.-1974, Mérouia et al.-1982). Néanmoins il semblerait qu'il puisse être utilisable dans certains tests basés sur la recherche d'IgE spécifiques, où aucune réaction croisée n'a encore été enregistrée (Mérouia et al.-1982). Sa participation à des tests sérologiques pourrait être envisageable, notamment pour le suivi des malades.

### III - REPONSE ANTICORPS ET DIAGNOSTIC

Au cours d'une infestation par des larves échinococciques, l'organisme-hôte met en place toute une série de mécanismes visant à la destruction du parasite. Chez certains individus, l'existence d'une résistance naturelle évite l'infestation. Ce phénomène observé dans l'hydatidose met en jeu un certain nombre d'éléments variables incluant des facteurs dûs à l'hôte, comme la souche animale (Pennoit-De Cooman & De Rycke-1970), l'âge (Schwabe et al.-1959), ou le sexe de l'hôte (Kozakiewicz-1980), ainsi que des facteurs d'origine parasitaire, tel que le pouvoir infestant, variant selon la souche d'E.granulosus (Smyth-1984, Thompson-1986). Les mécanismes sont peu décrits, certainement d'origine physiologique ou anatomique. Une participation du système immunitaire, de manière spécifique ou non spécifique, notamment par l'intermédiaire des macrophages, a été envisagée (Thompson-1976) sans cependant être prouvée. L'acquisition par l'organisme-hôte d'une immunité, dirigée contre les parasites déjà établis ou contre les larves concurrentes, consiste en une activation des mécanismes immuns humoraux et cellulaires. L'immunité cellulaire à E.granulosus reste assez peu décrite dans la littérature. Seul, un phénomène d'immuno-dépression de la population lymphocytaire T a été décrit, représentant une activité immunorégulatrice engendrée par le

parasite et favorisant l'activation des clones T à activité suppressive (Ts). Cette manipulation de la réponse cellulaire permet ainsi au cestode d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Cependant, aucune action directe de la réponse cellulaire sur le parasite n'a été décrite à ce jour. Une activité mettant en jeu des macrophages, des mastocytes et des éosinophiles semble être impliquée dans un phénomène d'immunité à la réinfection (Riley et al.-1985), mais n'a pas réellement été mise en évidence. D'autre part, l'action directe des cellules du système immunitaire sur le parasite apparaît limitée par la présence du kyste qui constitue une barrière.

Seuls les phénomènes humoraux mettant en jeu les anticorps ont été largement étudiés. La connaissance du type de réponse induite, des différents facteurs mis en jeu ainsi que des variations au cours de l'évolution de la maladie sont autant de facteurs susceptibles d'intervenir lors du diagnostic. Nous ne détaillerons ici que ces mécanismes immunitaires, pour leur importance dans le choix ou l'établissement d'un test de dépistage de l'hydatidose.

## A - LA REPONSE ANTICORPS DANS L'HYDATIDOSE

### 1 - Production d'anticorps

Les anticorps jouent un rôle central dans l'immunité acquise contre l'établissement des larves échinococciques. La production d'anticorps spécifiques représente la réponse à une stimulation du parasite résultant d'une diffusion permanente de substances antigéniques à travers la paroi du kyste. Ainsi, tout phénomène de suppuration ou d'inflammation des tissus

adjacents amène une réponse immunitaire forte et facilement décelable par les tests immunologiques du fait d'une forte production d'anticorps (Todorov et al.-1979b, Capron et al.-1970). L'infection à E.granulosus résulte en la production d'immunoglobulines de classes différentes. Des Ig A, M, E ont été détectées par une grande variété de techniques. Bien que le phénomène d'hyperglobulinémie soit observé depuis longtemps dans les infections parasitaires, il n'est cependant pas toujours représenté dans les cas d'hydatidose. De plus, le taux d'anticorps spécifiques n'est pas nécessairement significativement élevé (Moriarty-1968, Matossian et al.-1972,1976).

La production d'IgE est généralement considérée comme caractéristique de la réponse immune aux helminthiases. L'observation fréquente de chocs anaphylactiques liés à la rupture d'un kyste ou de signes d'allergie immédiate (urticaire, oedème de Quincke) indique l'implication d'un facteur IgE dans l'hydatidose (Williams & Perez-Esandi-1971). Environ 70% des malades possèdent une réponse spécifique E (Afferni et al.-1984, Dessaint et al.-1975, Huldt et al.-1973, Capron et al.-1976, Matossian et al.-1976, Vervloet et al.-1976, Sorrice et al.-1979). La synthèse de ces anticorps correspond en général à une réponse immune précoce et rapide et peut persister durant plusieurs mois. Il semble qu'elle soit liée à la sévérité de la maladie (Dessaint et al.-1975). L'état du kyste apparaît particulièrement important : les fissurations sont associées à des proportions élevées d'IgE sériques et spécifiques. A l'inverse, les kystes calcifiés ont tendance à n'induire qu'une faible production d'anticorps de ce type, du fait d'une stimulation antigénique plus faible (Dessaint et al.-1975). La situation du kyste dans l'organisme semble n'avoir que peu

d'influence (Afferni et al.-1984, Dessaint et al.-1975, Capron et al.-1976) mais les valeurs d'anticorps spécifiques de cette classe sont augmentées en cas de kystes multiples (Dessaint et al.-1975).

## 2 - Dynamique de la réponse anticorps

### 2-1 - Variations lors d'un traitement chirurgical

Après kystectomie, la réponse anticorps subit des modifications qui se traduisent généralement par une diminution du taux d'anticorps, à plus ou moins longue échéance, voire une disparition complète de toute sérologie positive (Todorov et al.-1976). Néanmoins, la persistance d'un taux élevé peut être observée dans certains cas (Matossian et al.-1976) : les taux d'Ig G et M peuvent être significativement élevés chez certains patients opérés alors que les IgA restent à un niveau normal. Pour certains malades (41% selon Matossian et al.-1976), le taux d'IgE spécifiques peut se maintenir élevé longtemps après l'intervention. Si, par la suite, la réponse anticorps spécifique disparaît effectivement, sa durée de persistance semble varier selon les malades en fonction de certains facteurs. Il apparaît clairement que des éléments tels que la localisation du kyste (Todorov & Stojanov-1979) ou encore son état physiologique (Yarzabal et al.-1974) peuvent influencer directement sur cette période. D'autre part, le type de test utilisé pour la détection sérologique constitue aussi un élément de variation (Todorov et al.-1976). D'après les travaux de Todorov & Stojanov-1979, il existe 2 types de diminution du taux d'anticorps chez les malades opérés. Chez certains (majorité des suivis chirurgicaux), une baisse rapide observée et les tests deviennent négatifs entre le sixième mois et la seconde année. Chez les autres, on observe une

baisse tardive où l'on n'obtient jamais la négativité des tests. Dans 50% de ces derniers cas, la diminution observée dans la première ou la deuxième année est suivie d'une nouvelle augmentation des taux sériques. Pour les autres 50%, les valeurs restent toujours élevées. Selon les auteurs, la tendance de la dynamique du titre d'anticorps permettrait ainsi l'établissement d'un pronostic post-opératoire de la maladie. Celui-ci serait plutôt favorable si les taux diminuent dans un délai de 12 à 18 mois, jusqu'à des valeurs très faibles ou négatives ou si la tendance à la baisse est observée jusqu'à la fin de la seconde année. A l'inverse, on peut craindre un phénomène de récurrence (Todorov & Stojanov-1979) si les taux subissent une hausse après avoir chuté ou s'ils restent inchangés ou élevés.

## 2-2 - Variations lors d'un traitement chimique

De la même manière qu'après une ablation chirurgicale, la réponse anticorps subit des variations lors d'une chimiothérapie. L'action de substances actives sur le kyste et les larves provoque la libération massive d'antigènes liée, en général, à une lyse partielle des membranes du kyste. La stimulation du système immun qui s'ensuit, se voit, par la suite, freinée par suppression brutale du stimulus antigénique causée par la perte de la viabilité du kyste. La production d'anticorps hautement spécifiques se trouve donc être diminuée et même, dans certains cas, annulée, comme en particulier la production d'anticorps anti-antigène 5, lors de la destruction de la membrane germinative (Bekhti et al.-1977). Les anticorps de classe E, réagissant plus tôt que les autres immunoglobulines,

offrent un moyen sensible et rapide de détection de la perte de viabilité du kyste, particulièrement intéressant pour l'évaluation de l'efficacité de la chimiothérapie (Bekhti et al.-1977).

### 3 - Phénomène de séronégativité

Le diagnostic de l'hydatidose repose actuellement sur la détection d'anticorps sériques. Néanmoins, on observe une sérologie négative dans 3 à 20% des cas d'échinococcose confirmée. Plusieurs hypothèses ont été avancées dans la littérature afin d'expliquer ce phénomène :

- La présence d'anticorps est liée à l'état et la vitalité d'un kyste. Chez l'homme, la présence d'un kyste hyalin ou vieillissant est généralement associée à une sérologie négative (Schantz & Gottstein-1986, Rickard & Lightowers-1986), tout comme les cas d'infertilité n'induisent qu'une faible réponse anticorps (Kagan et al.-1976, Coltorti & Varela-Diaz-1976).

- La localisation d'un kyste intervient directement sur la réponse anticorps. En effet, on note dans les cas d'hydatidose pulmonaire ou osseuse un pourcentage de positivité aux tests sérologiques inférieur à celui observé en cas de localisation hépatique (Kagan et al.-1966, Capron et al.-1970, Yarzabal et al.-1974, Matossian & Araj-1975, Todorov et al.-1979b). Le manque d'intensité de la réponse immune résulterait d'un faible stimulus antigénique dû à un épaissement des tissus connectifs du kyste (Kagan-1963, Kagan et al.-1966). Mais il se peut aussi que le type d'évolution de la larve diffère selon qu'il s'agisse d'un parenchyme hépatique ou pulmonaire où, dans ce dernier cas, le développement du kyste

serait plus court et plus rapide (Purriel & Tomalino-1960). La nature et l'intensité du stimulus antigénique s'en trouveraient alors modifiées, influant directement sur la réponse anticorps (Capron et al.-1970).

- L'existence de sous-espèces d'E.granulosus de virulence différente peut être à l'origine d'un tel phénomène, surtout si l'expression des allergènes majeurs, comme l'antigène 5, est modifiée (Thompson & Kumaratilake-1982).

- Les anticorps spécifiques potentiellement détectables lors d'un diagnostic sont immobilisés par la formation de complexes immuns avec des antigènes circulants. La formation de tels complexes est souvent observée lors de maladies chroniques comme c'est le cas dans l'hydatidose (Richard-Lenoble et al.-1978, Bekhti et al.-1977, Pini et al.-1983, D'Amelio et al.-1983), surtout pour les formes pulmonaires (Pini et al.-1983). L'hypothèse que la création de complexes soit à l'origine des réactions sérologiques faussement négatives, a été émise (Richard-Lenoble et al.-1978) sans cependant être prouvée. Néanmoins, la détection d'antigènes parasitaires circulants semblerait la confirmer (Craig & Nelson-1984, Gottstein-1984). Mais il n'est actuellement pas démontré que les individus faussement séronégatifs soient tous significativement porteurs d'antigènes circulants.

- Il apparaît dans certains cas que la réponse anticorps est essentiellement constituée d'IgE et/ou d'IgA non précipitantes et non agglutinantes (Afferni et al.-1984, Huldt et al.1973) difficilement détectables lors des tests classiques de diagnostic de l'hydatidose, ce qui expliquerait en partie l'existence du phénomène de séronégativité observé.

#### 4 - Passage d'immunoglobulines dans le kyste hydatique

La présence d'IgG possédant des déterminants antigéniques identiques à ceux de l'hôte a été mise en évidence dans les liquides hydatiques de kystes humains ou animaux (Coltorti & Varela-Diaz-1972), ainsi que fixées à la membrane laminée (Varela-Diaz & Coltorti-1973, Coltorti & Varela-Diaz-1974). La présence d'autres composants sériques tels que l'albumine, fut aussi détectée. Bien que le mécanisme de pénétration soit encore inconnu, une diffusion de ces molécules à travers les membranes du kyste semble être l'hypothèse retenue (Varela-Diaz & Coltorti-1972, 1973). Certains pensent aussi que des macromolécules sont impliquées dans la synthèse même de la membrane laminée, par un phénomène d'interaction entre la membrane germinative et les tissus de l'hôte (Kilejian & Schwabe-1971). La membrane laminée semble constituer une barrière aux cellules du système immunitaire, protégeant ainsi la membrane germinative qui régulerait le mouvement des macromolécules de l'hôte vers le liquide hydatique (Coltorti & Varela-Diaz-1974). Le passage de grosses molécules semble difficile ; ce serait le cas des IgA ou des IgM dont la taille importante gênerait la pénétration (Edwards-1982). Le rôle biologique et les implications immunologiques de la pénétration de macromolécules provenant de l'hôte ont été considérées surtout quant à leur importance dans le phénomène de survie du parasite. On peut supposer que les immunoglobulines sont adsorbées de manière non spécifique à la surface membranaire du parasite, ce qui permettrait à ce dernier d'échapper aux défenses du système immunitaire de l'hôte par masquage des antigènes parasitaires. Ces immunoglobulines peuvent aussi se fixer spécifiquement sur les antigènes parasitaires, sans effet néfaste sur la viabilité du kyste ou bloquer l'action du système humoral ou cellulaire de l'hôte par un mécanisme

interactif généré par le parasite en sa faveur (Varela-Diaz & Coltorti-1972). Jusqu'ici l'ignorance du mécanisme de liaison des IgG aux membranes du kyste ainsi que du mode de pénétration des macromolécules n'a pas permis d'apprécier réellement les conséquences du phénomène, ni d'en évaluer les possibles répercussions médicales ou thérapeutiques (élimination chimique du kyste ou stérilisation).

## B - LE DIAGNOSTIC DE L'HYDATIDOSE

L'examen parasitologique chez l'homme ou chez tout hôte intermédiaire est rarement utilisé pour le diagnostic de l'hydatidose, voire même impossible car cette maladie constitue une impasse parasitaire sans voie de sortie ou d'évacuation naturelle. En général, les médecins utilisent l'association d'au moins deux techniques de diagnostic dont une analyse sérologique. Le dépistage est généralement effectué par radiologie. Différentes explorations radiologiques peuvent être effectuées, allant de la radioscopie et radiographie après opacification, l'angiographie, la scintigraphie. Elles fournissent de multiples renseignements, utiles lors de l'établissement d'une conduite thérapeutique et/ou chirurgicale. Il leur est toutefois généralement associé une étude biologique et tout particulièrement sérologique afin de confirmer le diagnostic d'hydatidose. Un grand nombre de techniques sérologiques sont disponibles. Nous ne détaillerons ici que les principales, ainsi que leur principe, et leurs possibles applications.

## 1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte ( ou Indirect Fluorescent Antibody Test - IFAT).

C'est un test couramment utilisé pour des infections parasitaires comme l'hydatidose (Ambroise-Thomas-1976, Coudert et al.-1967, Capron et al.-1970). Cette technique permet de mettre en évidence la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes hydatiques par des anticorps anti-immunoglobulines conjugués à la fluorescéine. Les antigènes les plus couramment utilisés se présentent sous forme lyophilisée et correspondent à des protoscolex ou des particules de protoscolex. Il existe aussi des préparations d'antigènes immobilisés sur matrice de cellulose (Gore et al.-1970) ou sur bille de sépharose (Matossian et al.-1978). C'est une technique très sensible, ne nécessitant pas de grosses quantités d'antigènes, positive dans 90% des formes hépatiques et 55% des formes pulmonaires. Il existe néanmoins des cas de fausse positivité. Ce test est peu utilisé pour le suivi des patients car la réaction reste positive longtemps après le traitement.

## 2 - Fixation du complément.

Utilisée pour la première fois par Ghedini-1906 et Weinberg-1908 dans l'hydatidose, elle est actuellement réalisée en microplaques. Le liquide hydatique lyophilisé est généralement utilisé pour ce test. L'antigène est déposé au fond de chacun des puits de la plaque dans lesquels on ajoute le sérum à tester. Si les anticorps spécifiques sont présents, il se créera alors des complexes immuns qui fixeront le complément introduit dans un deuxième temps. Si le complément n'est pas consommé (pas de réaction antigène-anticorps), il lui sera alors possible de lyser les cellules

indicatrices (érythrocytes) ajoutées au milieu en même temps qu'une dose subagglutinante d'anticorps. La réaction est positive dans 78% des kystes hépatiques et 63% des kystes pulmonaires à E.granulosus. La réaction s'avère également positive dans les cas de parasitose à E.multilocularis et de cysticercose mais elle est négative chez les sujets porteurs de Taenia solium et de T.saginata. On note des réactions croisées avec le distomatose. Certains auteurs (Matossian et al.-1978) ont aussi noté une fréquence importante de faux positifs, notamment dans d'autres maladies du foie. Il est possible que ce phénomène soit lié à la présence de facteurs anti-complément associés à l'antigène hydatique. On la considère toutefois comme une réaction sensible et reproductible. Elle possède l'avantage de ne pas nécessiter de quantité d'antigène hydatique importante. Elle apparaît aussi comme un outil intéressant pour le suivi post-opératoire des malades (Matossian & Araj-1975, Lass et al.-1973).

Par un principe identique, il est possible de rechercher la présence de complexes immuns au sein des sérums de patients atteints d'hydatidose, par la méthode de fixation du C1q marqué à l'iode 125 (Zubler et al.-1976, Bout et al.-1977b, Pini et al.-1983). Il semblerait, selon certains auteurs (Pini et al.-1983), qu'en cas de localisation difficilement détectable par les techniques sérologiques classiques (comme le kyste du poumon), le taux de positivité de ce test serait nettement supérieur à celui des autres méthodes. Ce procédé possède en outre l'avantage de permettre un suivi thérapeutique des malades tant après chirurgie, qu'après traitement chimique.

### 3 - Réactions d'agglutination

#### 3-1 - Réaction d'agglutination ou de floculation

La réaction d'agglutination décrite par Szyfres & Kagan-1963 utilise des particules de latex recouvertes de liquide hydatique. L'agglutination des billes sensibilisées se produit lors de la présence d'anticorps spécifiques au sein des sérums testés. Il n'a pas été montré de réactions croisées avec d'autres parasitoses. Elle apparaît moins sensible que le test d'hémagglutination indirecte. Cette technique est très utile dans certaines études, notamment épidémiologiques, de par sa spécificité et sa simplicité d'utilisation. Néanmoins, la positivité des titres semble persister longtemps après un traitement efficace du malade, limitant ainsi son utilisation pour le suivi des patients.

Le principe de la réaction de floculation est sensiblement le même. On utilise cette fois des particules de bentonite standardisées sur lesquelles sont adsorbés les antigènes du liquide hydatique. Cette technique, préalablement décrite par Bozicevich et al.-1951, a été adaptée à l'hydatidose par Norman et al.-1959 et Fischman-1960.

#### 3-2 - Hémagglutination

La technique utilisée pour la première fois pour le diagnostic de l'hydatidose par Garabédian et al.-1957, a été, par la suite, reprise par de nombreux auteurs et modifiée. Le principe implique l'adsorption de l'antigène hydatique sur des érythrocytes traités et leur agglutination par contact avec des anticorps spécifiques. Le test est actuellement réalisé en microplaques, et utilise généralement des érythrocytes de mouton traités à l'acide tannique et sensibilisés avec le liquide hydatique ovin (Varela-Diaz et al.-1975a). C'est une technique simple et sensible, qui

permet de détecter de faibles quantités d'IgG. Ceci, néanmoins, limite son utilisation pour le suivi thérapeutique des malades après traitement. Il a été noté l'existence de réactions croisées avec d'autres parasitoses, particulièrement avec la schistosomiase (Matossian et al.-1978, Varela-Diaz et al.-1975b). L'hémagglutination reste utilisée pour le dépistage de l'hydatidose, notamment dans des études épidémiologiques. La réaction apparaît comme positive dans 90% des cas d'hydatidose hépatique et 63% des localisations pulmonaires.

#### 4 - Réactions de précipitation en gel.

##### 4-1 - Duchterlony

Cette technique n'est plus guère utilisée aujourd'hui à des fins diagnostiques. Elle a permis néanmoins l'étude des structures antigéniques des extraits hydatiques (Kagan & Norman-1963a, Biguet et al.-1962).

##### 4-2 - Immunoélectrophorèse

Cette réaction est le test de caractérisation de l'hydatidose le plus couramment utilisé. Elle fut mise au point par Capron et al.-1967, revue en 1970. Certains auteurs ont parfois amené des modifications au protocole initial (Yarzabal et al.-1974, Coltorti & Varela-Diaz-1975, Varela-Diaz et al.-1975b). Néanmoins le principe reste identique : les antigènes hydatiques sont soumis à une migration électrophorétique en gel d'agarose, puis mis en contact avec un sérum qui pénètre par diffusion. Il se crée alors des arcs de précipitation, signes d'une réaction antigène-anticorps spécifique. La formation de certaines précipitines et notamment de l'arc 5 (Capron et al.-1967) est considérée comme caractéristique de la maladie. Le test s'avère positif dans 94%

des localisations hépatiques et 70% des localisations pulmonaires. Les anticorps responsables de la formation de l'arc 5 d'E.granulosus ont été décrits par Capron et al.-1967, 1970 comme spécifiques de l'antigène hydatique (fraction 5) et retrouvés de manière précoce et constante dans l'hydatidose humaine.

Cette réaction hautement spécifique présente néanmoins des réactions croisées avec d'autres parasitoses, en particulier avec les espèces les plus proches d'E.granulosus, notamment E.multilocularis (Varela-Diaz et al.-1977b, Yarzabal et al.-1977a, Rickard et al.-1977), E.vogeli (Varela-Diaz et al.-1978) et avec les genres voisins : Taenia hydatigena, T.ovis et T.solium (Varela-Diaz et al.-1977a, 1978, Yong & Heath-1979, Conder et al.-1980, Schantz et al.-1980). Des réactions faussement négatives sont observées (20% des cas), souvent liées à la présence d'un kyste intact ou des localisations particulières (cervicales, pulmonaires). Bien que facile à réaliser, cette technique nécessite de grandes quantités d'antigènes et de sérums par rapport aux autres méthodes. Sa sensibilité et sa spécificité permettent une large utilisation de ce test pour la détection de la maladie ainsi que pour le suivi post-opératoire des patients.

#### 4-3 - Double diffusion en gel d'agarose (DD5)

Ce test nécessite un sérum contrôle monospécifique dirigé contre la fraction 5 du liquide hydatique. Le sérum testé sera sélectionné sur sa capacité à induire en double diffusion en agarose une réaction d'identité avec l'arc 5 obtenu par l'antisérum contrôle. Cette technique mise au point par Bombardieri et al.-1974 fut reprise par Coltorti & Varela-Diaz-1978, puis adaptée en microméthode par Bout et al.-1979. La réaction apparaît aussi sensible et aussi spécifique que l'IEP tout en nécessitant moins

de matériel biologique, que ce soit en quantité d'antigène ou de sérum. De plus, de par sa facilité d'utilisation, elle apparaît comme un outil intéressant pour la détection de l'hydatidose humaine en pays d'endémie.

## 5 - Réactions immunoenzymatiques

La réaction d'E.L.I.S.A. (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) peut aussi être utilisée pour le diagnostic de l'hydatidose et s'inspire de la technique de Engvall & Perlman-1972. Elle nécessite au préalable l'immobilisation des antigènes hydatiques sur un support tel que tube ou microplaque. Les sérums sont ensuite testés. La présence d'une réaction antigène-anticorps spécifique est révélée à l'aide d'anti-immunoglobulines marquées à la peroxydase. Ce test sensible et spécifique ne nécessite que de faibles quantités de matériel biologique. Il permet aussi un dosage quantitatif. Il est utilisé tant avec le liquide hydatique total (Bout et al.-1975, Matossian et al.-1979, Farag et al.-1975), qu'avec des antigènes purifiés (Farag et al.-1975). Cette dernière possibilité d'utilisation, de par sa spécificité en augmente les potentialités diagnostiques (Capron et al.-1975, Farag et al.-1975, Iacona et al.-1980). Des phénomènes de réactions croisées avec d'autres parasitoses peuvent se présenter, notamment avec l'échinococcose alvéolaire (Farag et al.-1975) et Fasciola, éventualités apparaissant surtout lors de l'utilisation d'antigènes totaux plutôt que de fractions purifiées (comme la fraction 5). Une automatisation de la technique est réalisable, très utile en cas d'analyses multiples.

## 6 - Tests radioimmunologiques

Le test de RadioImmunoAssay (RIA) a aussi été utilisé pour le diagnostic de l'hydatidose (Matossian-1981, Musiani et al.-1974, Dessaint et al.-1975) Cette technique nécessite l'immobilisation de l'antigène. Après passage des sérums à analyser, l'existence d'une réaction positive est révélée par l'emploi d'anticorps anti-immunoglobulines marqués à l'aide d'un composé radioactif. Cette méthode obtient des résultats comparables à ceux des autres principaux tests, tant en sensibilité qu'en spécificité, sans cependant offrir de réels avantages supplémentaires. Elle est réalisable aussi bien avec du liquide hydatique complet qu'avec des fractions purifiées (Musiani et al.-1974). Il est aussi possible d'adapter le procédé en une microméthode (Musiani et al.-1974).

## 7 - Recherche des IgE

La présence d'un taux élevé d'immunoglobulines de classe E est une caractéristique immunologique importante des maladies parasitaires dont l'hydatidose fait partie. L'existence d'une réaction de type Arthus ou d'hypersensibilité retardée de type IV a pu être mise en évidence dans un peu plus de la moitié des cas d'hydatidose (Capron et al.-1976). Cette réaction n'a malheureusement que peu d'intérêt pour le diagnostic. Par contre la présence d'IgE de type anaphylactique a permis les premiers essais de détection d'IgE dans l'hydatidose par la réaction d'hypersensibilité immédiate de Casoni.

### 7-1 - Intradermo-réaction de Casoni

Cette technique, mise au point par Casoni-1911, détecte l'hypersensibilité immédiate de type anaphylactique (type I de Gell et Coombs). Elle met en évidence l'allergie cutanée par injection intradermique d'antigène hydatique. Elle est positive dans 71,5% des cas d'hydatidose mais on constate de nombreux phénomènes de réactions croisées avec d'autres parasitoses (notamment d'autres cestodes) rendant le test ininterprétable. On note aussi l'existence de cas de faux positifs dus à une réactivité immédiate non spécifique (10 à 18% des cas). Du fait de ces problèmes, le test de Casoni n'est plus guère utilisé à l'heure actuelle.

### 7-2 - Recherche des IgE totales et spécifiques

Environ 70% des malades possèdent un taux d'IgE supérieur à la normale et cette réponse E apparaît être essentiellement tournée vers la reconnaissance de la fraction antigénique 5 du liquide hydatique (Dessaint et al.-1975, Afferni et al.-1984). La méthode comprend généralement une détermination quantitative des IgE totales, ainsi qu'une appréciation qualitative des IgE anti-fraction 5. On utilise fréquemment les techniques d'ELISA ou de RAST (RadioAllergoSorbent Test). Cette dernière analyse est basée sur un principe identique à un RIA, si ce n'est l'utilisation d'anticorps radiomarqués anti-IgE spécifiques. La détection d'IgE spécifiques est observée dans 59% des cas et ne semble pas être soumise à des variations de sensibilité en fonction de la localisation du kyste. De par sa sensibilité, ce procédé apparaît comme une aide appréciable au diagnostic de l'hydatidose, surtout dans les cas de séronégativité (Afferni et al.-1984). Il possède aussi l'avantage de pouvoir être utilisé pour le

suivi des patients, après chirurgie ou traitement chimique, et pourrait aussi permettre l'établissement de critères d'évolutivité de la maladie (Sainte-Laudy et al.-1984).

#### IV - DIAGNOSTIC : NECESSITE DE L'OBTENTION D'UN ANTIGENE STANDARDISE SPECIFIQUE DE L'HYDATIDOSE.

Le dépistage de maladies parasitaires telles que l'échinococcose nécessite de disposer de tests de diagnostic fiables, dont les deux critères majeurs sont la sensibilité et la spécificité. Si les techniques actuelles d'immunodiagnostic de l'hydatidose bénéficient d'une sensibilité suffisante, en réalité, aucune d'entre elles n'est vraiment sûre quant à sa spécificité à Echinococcus. C'est dans la difficulté à standardiser les préparations antigéniques que réside la source des problèmes rencontrés. L'utilisation d'antigènes peu caractérisés, plus ou moins purifiés, représente la cause principale des erreurs enregistrées. La variabilité des sources antigéniques, tant géographique qu'animale, ainsi que la présence de substances contaminantes provenant de l'hôte, engendrent nécessairement des modifications biochimiques et immunologiques interférant directement au niveau des tests sérologiques. De plus, l'analyse des constituants du liquide hydatique a permis de mettre en évidence la présence de substances communes entre E.granulosus et d'autres parasites, ainsi qu'avec les mammifères-hôtes. L'existence de ces communautés expliquent donc les phénomènes de réactions croisées observées par la plupart des auteurs lors des tests sérologiques. L'ensemble de ces événements concourt à générer de nombreuses variations responsables des défaillances des tests d'immunodiagnostic. Le problème actuel est donc de parvenir à éliminer ces

interférences et donc d'établir une standardisation des antigènes parasitaires. Augmenter la spécificité des techniques de diagnostic implique d'intervenir à plusieurs niveaux. Tout d'abord, il s'agit de caractériser et d'éliminer les constituants non parasitaires, ou tout composant exprimant une communauté complète ou partielle avec une substance de l'hôte. Il faut ensuite identifier, isoler et produire à faible coût un ou des antigènes spécifiques du parasite.

C'est vers cet objectif que ce sont naturellement tournés la plupart des travaux récents sur l'hydatidose. Bien que la présence d'épitopes communs avec l'hôte soit encore relevée (Russi et al.-1974, Ben Ismail et al.-1980), la majorité des substances d'origine non parasitaire a pu être éliminée du liquide hydatique grâce à l'utilisation des techniques biochimiques.

Actuellement, le développement des techniques de biologie moléculaire offre, dans ce contexte, de nouvelles possibilités d'investigation et d'étude, de par leur spécificité et leur sensibilité. Elles permettent non seulement d'identifier et de caractériser les produits des gènes, mais aussi d'étudier et d'analyser la structure du génome parasite et son organisation. Des différences génétiques ont ainsi été mises en évidence entre les génomes d'E.granulosus et d'E.multilocularis, voire même entre les génomes des différentes souches d'E.granulosus (McManus et al.-1985, McManus & Simpson-1985). Cette approche moléculaire n'est pas sans importance diagnostique. En effet, le développement de sondes ADN spécifiques d'espèce peut permettre l'identification et la caractérisation, chez l'hôte définitif, des oeufs d'échinocoques, difficilement distinguables de ceux des autres ténias. De récents travaux ont permis l'élaboration de telles sondes nucléiques permettant la différenciation entre les oeufs d'E.granulosus et de T.saginata ainsi que de l'espèce

voisine E.multilocularis (Bretagne et al.-1990), voire même l'identification de souches différentes chez E.granulosus (Rishi & McManus-1987). Ces sondes pourraient conduire à la mise au point de tests simples et facilement réalisables ("Southern blot" ou mieux "dot blot") en vue d'une utilisation diagnostique courante chez l'hôte définitif (Bretagne et al.-1990).

Mais, la mise au point d'un nouveau test de diagnostic chez l'hôte intermédiaire (homme ou animal) nécessite de disposer, pour les tests sérologiques, de quantités importantes d'antigènes aux caractéristiques bien définies et toujours stables, que les modalités actuelles de préparation des antigènes ne sont pas en mesure de fournir. Dans cette optique, la biologie moléculaire constitue aussi un outil intéressant, de grande potentialité par sa capacité à permettre la production d'un polypeptide donné en quantité importante et à faible coût. De récents travaux réalisés sur l'échinococcose alvéolaire ont permis l'identification et l'isolement de clones synthétisant des polypeptides spécifiques d'E.multilocularis (Vogel et al.-1988, Hemmings & McManus-1989). L'application de ces molécules recombinantes à des tests sérologiques de type E.L.I.S.A. s'est révélée particulièrement intéressante pour une application diagnostique, tant en sensibilité qu'en spécificité (Müller et al.-1989). Ces résultats encourageants ont incité à entreprendre le clonage moléculaire des antigènes d'E.granulosus, et en particulier celui de l'antigène 5. Cet antigène caractérisé par Capron et al.-1967, 1970, représente l'antigène majeur du liquide hydatique dont les potentialités diagnostiques sont les plus intéressantes. Très immunogène, il apparaît être majoritairement reconnu par les sérums d'animaux et de patients. Cette molécule, invariablement retrouvée dans tous les liquides hydatiques, quel que soit l'animal parasité ou la localisation du kyste

dans l'organisme, induit chez l'hôte, une réponse anticorps spécifique, observée dans la majorité des cas d'hydatidose. Ce sont cette immunogénicité et cette absence de variabilité qui lui confèrent une réelle valeur diagnostique. De plus, de récents travaux basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-antigène 5, ont permis non seulement de caractériser biochimiquement la molécule (Di Felice et al.-1986), mais encore d'identifier sur celle-ci un épitope protéique spécifique d'E.granulosus (Chamekh et al.-1990).

C'est dans ce contexte qu'ont été réalisés nos travaux qui ont conduit à l'identification et à l'isolement d'un clone d'E.granulosus (Eg6), à partir d'une banque d'ADNc. La caractérisation de ce clone a permis de mettre en évidence l'antigénicité de la protéine de fusion correspondante vis à vis des sérums de patients atteints d'hydatidose, et de l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 spécifique de l'épitope protéique de l'antigène 5 d'E.granulosus.

**RESULTATS - DISCUSSION**

## I - EXTRACTION D'ARN - TRADUCTION IN VITRO

### 1 - Traduction in vitro d'ARNm extrait de protoscolex d'E.granulosus

La technique employée pour l'extraction d'ARN de protoscolex d'E.granulosus est inspirée de celle décrite par Chirgwin et al.-1979, utilisant l'ultracentrifugation sur coussin de chlorure de césium après homogénéisation des cellules en milieu dénaturant (thiocyanate de guanidium 4M). Les protoscolex d' E.granulosus proviennent d'une ponction d'un kyste hépatique ovin de souche algérienne. Ils sont préparés par sédimentation puis directement congelés en azote liquide afin d'éviter au maximum la dégradation enzymatique par les RNases.

Par cette méthode, nous avons obtenu 800 µg d'ARN total à partir d'une quantité d'environ 1g de parasites.

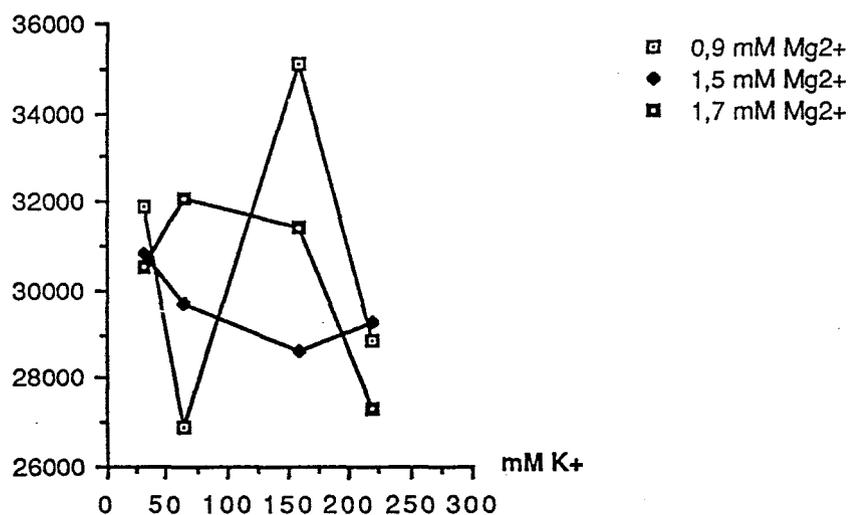
Afin de tester l'intégrité de l'ARN, des essais de traduction in vitro ont été effectués. Dans un premier temps, nous avons utilisé le lysat de réticulocytes de lapin connu pour son efficacité en modèle eucaryote. Afin de standardiser le système avec l'ARN d'E.granulosus, différents rapports en ions K<sup>+</sup> et Mg<sup>2+</sup> ont été testés, variant de 94mM à 225 mM pour les ions potassium et de 0,67mM à 2,6 mM pour les ions magnésium. Cependant, les taux d'incorporation de méthionine <sup>35S</sup> restaient toujours très faibles (au maximum un facteur 4 de stimulation) même pour des valeurs optimales d'ARN (200 ng/µl final), par rapport aux taux obtenus avec l'ARN témoin, ARN du virus de la mosaïque du tabac (facteur de stimulation variant entre 110 et 150). La modification de différents facteurs pouvant agir sur le pourcentage d'incorporation de méthionine (quantité d'acides aminés froids, quantité d'acide aminé radioactif) n'a pas apporté d'amélioration

notable. Une analyse en gel de polyacrylamide-SDS des produits de traduction ainsi préparés a été réalisée et n'a visualisé que des polypeptides de très faibles masses moléculaires. Au vu de ces résultats, un autre système de traduction in vitro a été sélectionné. La traduction a été réalisée dans un système constitué d'un extrait de germes de blé et généralement utilisé pour les modèles procaryotes et parfois parasitaires. Ce modèle possède l'avantage de ne pas contenir d'ions  $K^+$  et une concentration en ions  $Mg^{2+}$  très faible, permettant ainsi de pouvoir ajuster le rapport  $K^+/Mg^{2+}$  pour chaque type d'ARN étudié. Des concentrations non optimales en ions potassium peuvent induire des perturbations au niveau de la synthèse de la chaîne peptidique et amener une terminaison prématurée. C'est pourquoi une standardisation a été réalisée afin d'optimiser les résultats avec l'ARNm de protoscolex. Différentes concentrations en ions potassium et magnésium ont été testées ( $K^+$  : 31,5 mM, 65 mM, 158 mM, 220 mM ;  $Mg^{2+}$  : 0,9 mM, 1,5 mM, 1,7 mM). Il s'est avéré que pour une quantité moyenne de 150ng/ $\mu$ l final d'ARN total, un rapport de 158 mM de potassium pour 0,9 mM de magnésium (concentrations finales) est défini comme optimal et permet d'obtenir les meilleurs rendements de traduction de l'ARN d'E.granulosus (cf figure 5). Dans ces conditions, le taux de stimulation d'incorporation de méthionine marquée au soufre 35 est de 6 pour l'ARN d' E.granulosus à rapporter au taux de 18,1 pour l'ARN témoin (ARN messager du virus de la mosaïque du tabac ). Une cinétique réalisée dans ces conditions a permis de définir un temps optimal de réaction de 60 minutes au terme duquel le taux de synthèse protéique atteint son maximum (résultat non montré).

Les produits de traduction totaux ont été analysés sur gel de polyacrylamide-SDS, en conditions réductrices (cf figure 6 - bande 1). Le profil général montre des polypeptides de tailles variant de 100 kDa à

FIGURE 5 : Traduction *in vitro* d'ARN d'*E.granulosus* en extrait de germes de blé - Détermination des conditions optimales : K<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup>.

cpm/μl d'extrait



Dans les conditions optimales (158 mM K<sup>+</sup> - 0,9 mM Mg<sup>2+</sup>) le taux de stimulation d'incorporation de méthionine marquée au soufre 35 et de :

6 pour l'ARN d'*E.granulosus*

18,1 pour l'ARN témoin

Le taux de stimulation correspond au rapport du taux d'incorporation de l'échantillon considéré sur celui d'un échantillon ne contenant pas d'ARN.

moins de 18 kDa. Une bande majeure est remarquée à 45 kDa. Il apparaît qu'une partie du matériel marqué par la méthionine <sup>35</sup>S ne pénètre pas dans le gel, probablement gêné durant sa migration par des molécules de fortes masses moléculaires.

## 2 - Immunoprécipitation des produits de traduction in vitro

Avant d'envisager le clonage des antigènes d'E.granulosus, nous avons vérifié, au sein de l'ARN extrait, la présence d'ARN messager codant pour des peptides possédant effectivement des propriétés antigéniques. Pour cela, les produits de traduction in vitro ont été testés par immunoprécipitation vis à vis de différents sérums avant d'être soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

### 2-1 - Immunoprécipitation par les sérums humains d'infection

Différents sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée ont été choisis. Après caractérisation par immunoelectrophorèse (IEP), trois types de sérums sont sélectionnés : des sérums de malades possédant entre 3 et 6 arcs en IEP, dont l'arc 5; des sérums ne reconnaissant que l'arc 5; et un autre type de sérum caractérisant 1 arc en IEP qui ne correspond pas à l'arc 5. Les sérums du premier groupe reconnaissent des polypeptides de tailles variant entre moins de 15 kDa et 40 kDa. Les bandes majeures se situent à 33, 17,5, 20 et 15,5 kDa (cf figure 6 - bandes 3 et 4). Les sérums humains spécifiques de l'arc 5 (groupe 2) immunoprécipitent quant à eux deux polypeptides de 33 et 20 kDa (fig. 6 - bandes 6 et 7). Le sérum

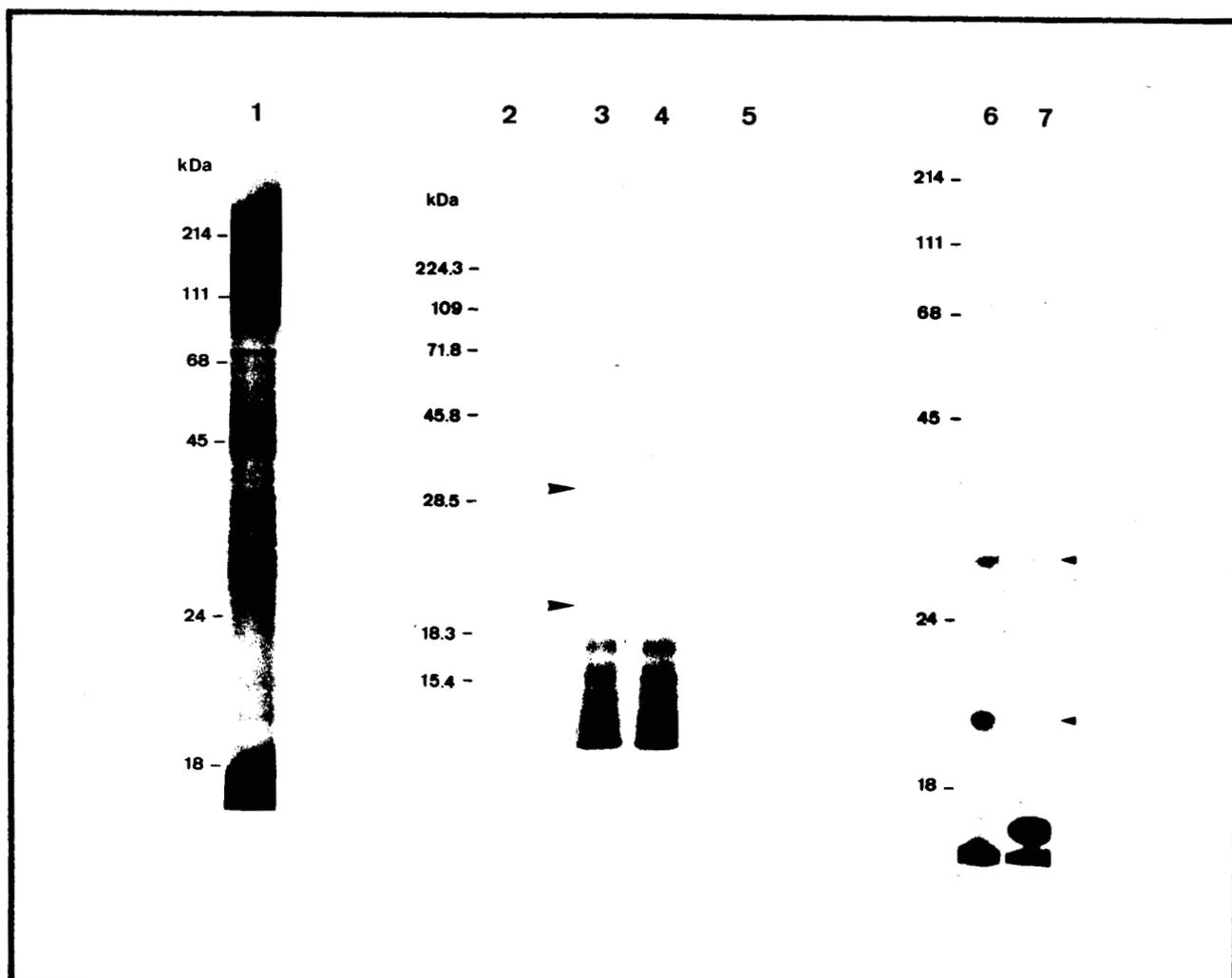


FIGURE 6 : Immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro* d'ARN d'E.granulosus par différents sérums de patients hydatiques et analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS en conditions réductrices.

- 1 : Produits de traduction totaux non immunoprécipités
- 2 : Sérum humain témoin
- 3 et 4 : Sérums de patients infestés par E.granulosus  
(IEP : 6arcs, arc 5+)
- 5 : Sérum de patients hydatiques, IEP : 1 arc, pas d'arc 5
- 6 et 7 : Sérum de patients hydatiques, IEP : 1 arc, arc 5+

humain ne répondant pas vis à vis de l'arc 5 en IEP (groupe 3) réagit faiblement avec des produits de traduction de faibles masses moléculaires (17,5 kDa et moins), (figure 6 -bande 5). Un sérum humain témoin, analysé dans les mêmes conditions, ne réagit vis à vis d'aucun des produits de traduction de l'ARN d' E.granulosus.

Ces résultats démontrent donc que l'ARN de protoscolex code pour certains antigènes d'E.granulosus qui correspondent à des structures peptidiques reconnues par le système immunitaire humain lors d'une infestation et dont le clonage moléculaire peut être envisagé.

#### 2-2 - Immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal EG 02 154/12, spécifique de l'antigène 5.

L'anticorps monoclonal EG 02 154/12 décrit par Chamekh et al.-1990 est dirigé contre l'antigène 5 d'E.granulosus, plus particulièrement contre un épitope spécifique d'E.granulosus, répétitif et également cible des sérums de patients. L'observation selon laquelle aucune modification de reconnaissance de l'antigène par l'anticorps monoclonal n'était induite par la déglycosylation et par la délipidation était en faveur de la nature protéique de l'épitope et nous a donc incité à utiliser l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 pour immunoprécipiter les produits de traduction in vitro de l'ARN extrait des protoscolex. Dans les mêmes conditions d'immunoprécipitation et d'électrophorèse que précédemment, l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 reconnaît une molécule de 33 kDa, ainsi que d'autres polypeptides de masses moléculaires plus faibles, essentiellement

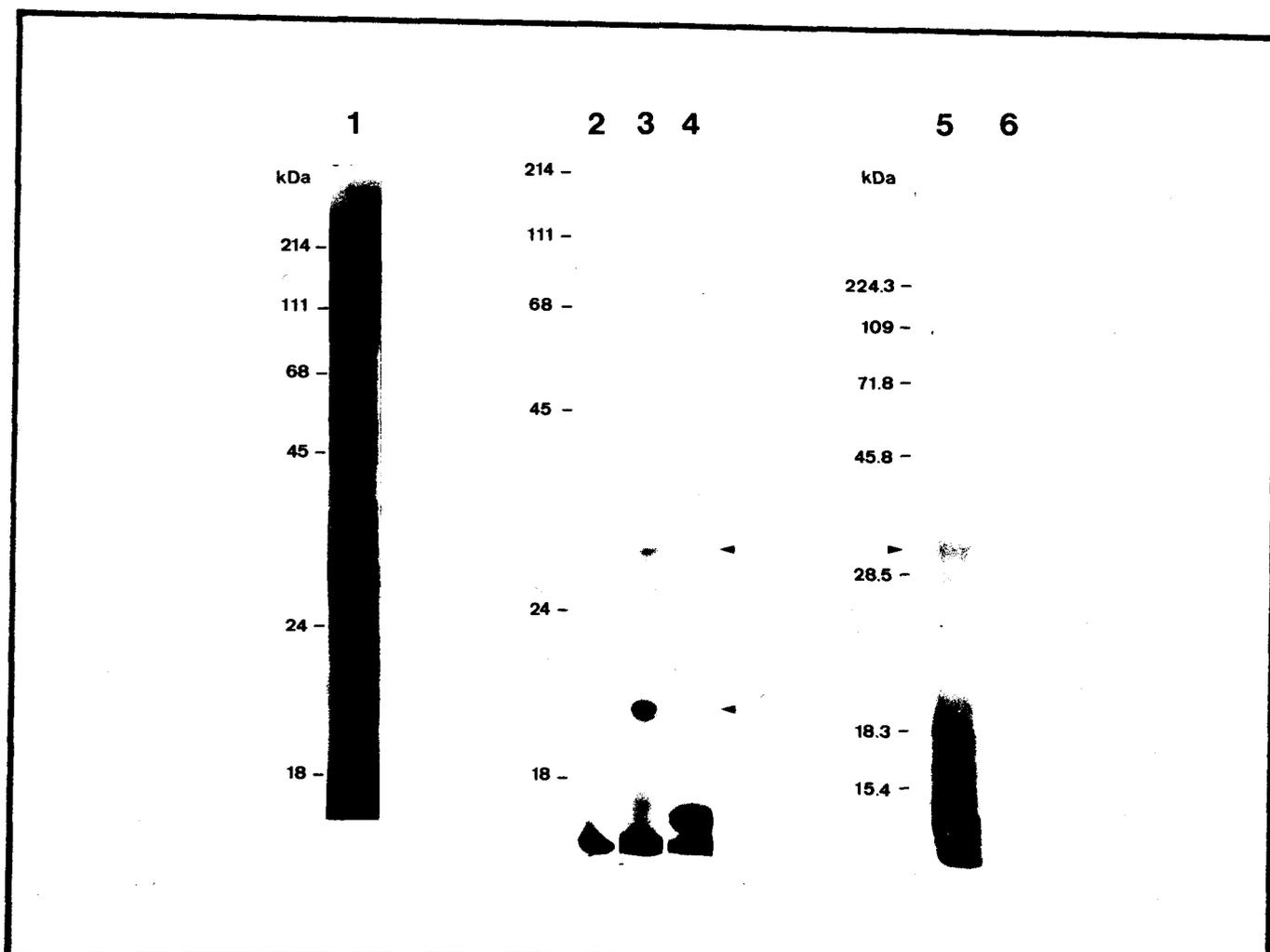


FIGURE 7 : Immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro* d'ARN d'*E.granulosus* par l'anticorps monoclonal EG02 154/12 et analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS en conditions réductrices.

- 1 : Produits de traduction totaux non immunoprécipités.
- 2 : Sérum humain témoin.
- 3 et 4 : Sérums de patients hydatiques spécifiques de l'arc 5 (IEP : 1 arc = arc 5).
- 5 : Anticorps monoclonal EG 02 154/12 spécifique de l'antigène 5.
- 6 : Ascite témoin (SP20).

situées entre 18 et 14 kDa (cf figure 7 - bandes 5 et 6). Une ascite témoin testée de manière identique ne réagit pas vis à vis des produits de traduction.

Il apparaît ainsi clairement que l'épitope cible de l'anticorps monoclonal est de nature protéique. Le fait qu'un peptide de 33 kDa soit à la fois immunoprécipité par l'ensemble des sérums humains (hormis par ceux qui ne réagissent pas vis à vis de l'arc 5) et par l'anticorps monoclonal spécifique de l'antigène 5, suggère que ce polypeptide puisse correspondre à la partie peptidique de l'une des sous-unités de l'antigène 5, d'autant plus que cette observation peut être rapprochée des résultats de Chamekh et al.-1990 montrant la composition de l'antigène 5 en deux sous-unités de 37 et 22 kDa, ou encore aux résultats de Shepherd & McManus-1987 décrivant l'antigène 5 comme l'association non covalente de 2 molécules de 38 et 20 kDa.

Considérant l'ensemble de ces observations, le clonage des antigènes d'E.granulosus a été entrepris et a constitué l'étape suivante de ce travail.

## II - CLONAGE MOLECULAIRE DES ANTIGENES D'ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

### 1 - Construction de la banque d'ADNc.

La technique choisie pour la construction de l'ADN complémentaire utilise l'action de plusieurs enzymes de modification. La transcriptase reverse (RT) permet la synthèse du premier brin de l'ADN complémentaire de l'ARN, utilisant comme initiateur un oligonucléotide de synthèse

(oligodT). La ribonucléase perfore ensuite l'ARN. Les morceaux restants serviront d'amorce à l'ADN polymérase I qui fabrique le second brin de l'ADN. L'utilisation en phase finale de l'ADN polymérase T4 permet de digérer les parties encore simple brin afin de créer des bouts francs. Une quantité égale à environ 300 µg d'ARN total d' E.granulosus a été utilisée pour la synthèse de l'ADNc selon ce protocole. Une quantité estimée à 550 ng d'ADN double brin à bouts francs a pu ainsi être synthétisée. La moitié seulement de cet ADNc a été utilisée pour la construction de la banque en vecteur phagique.

La banque a été réalisée en vecteur d'expression lambda gtl1 afin de pouvoir sélectionner les clones recombinants à l'aide d'anticorps. Le site d'insertion est choisi pour permettre l'expression de la protéine étrangère sous forme d'une protéine de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase dont la synthèse peut être induite par adjonction d'IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside). L'ADNc est intégré dans le site unique EcoRI du phage gtl1 qui se situe à l'intérieur du gène lacZ codant pour la  $\beta$ -galactosidase. Pour cela, des adaptateurs de synthèse de séquence 5'-GGAATTC-3' sont liés aux extrémités franches de l'ADNc à l'aide d'une ligase, permettant ainsi la création de bouts collants EcoRI et l'insertion de l'ADN dans le génome du phage.

Après avoir protégé les sites EcoRI internes par méthylation, l'ADNc d'E.granulosus est intégré dans le site EcoRI du phage lambda gtl1.

Grâce aux propriétés du vecteur  $\lambda$ gt11, les individus génotype parental peuvent être différenciés des individus recombinants. Les premiers produisent une  $\beta$ -galactosidase complète, active, qui peut réagir avec son substrat (le X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), créant ainsi une coloration bleue caractéristique. Les phages recombinants expriment une  $\beta$ -galactosidase sous forme modifiée par sa

fusion avec un polypeptide étranger. Il s'ensuit pour l'enzyme, une perte de réactivité et les plages de lyse apparaissent alors sans coloration. Le titre de la banque est alors aisément estimé et nous avons pu évaluer dans notre expérience à environ  $1,6 \cdot 10^6$  le nombre de recombinants obtenus à partir d'une quantité initiale de 225 ng d'ADNc (équivalent à 2-3  $\mu$ g d'ARNm estimés).

## 2 - Sélection des clones

Pour tester la réactivité des clones avec les anticorps, la banque est étalée sur des boîtes de Pétri à raison de 10000 à 20000 phages par boîte. Une empreinte de chaque étalement est réalisée sur une feuille de nitrocellulose où sont adsorbées les protéines de fusion induites par l'IPTG. Les sérums sont mis en contact avec les filtres puis la présence d'une réaction antigène-anticorps est révélée par l'utilisation d'un deuxième anticorps anti-immunoglobulines humaines marqué par la peroxydase. Malgré la sensibilité de la technique, des artéfacts peuvent apparaître, responsables de l'isolement de clones apparemment positifs. C'est pourquoi un second criblage est généralement réalisé avant la purification complète des phages sélectionnés.

Cinq sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée ont été sélectionnés sur leurs caractéristiques immunoélectrophorétiques (de 3 à 6 arcs en IEP, dont l'arc 5) et utilisés en mélange afin d'augmenter la probabilité de réaction avec les différents antigènes exprimés. Lors d'un premier criblage effectué sur  $5 \cdot 10^5$  phages, 43 clones ont été repérés. Afin de confirmer leur positivité, un second criblage a été réalisé. Pour cela, une purification partielle a été faite pour chacun d'eux et un

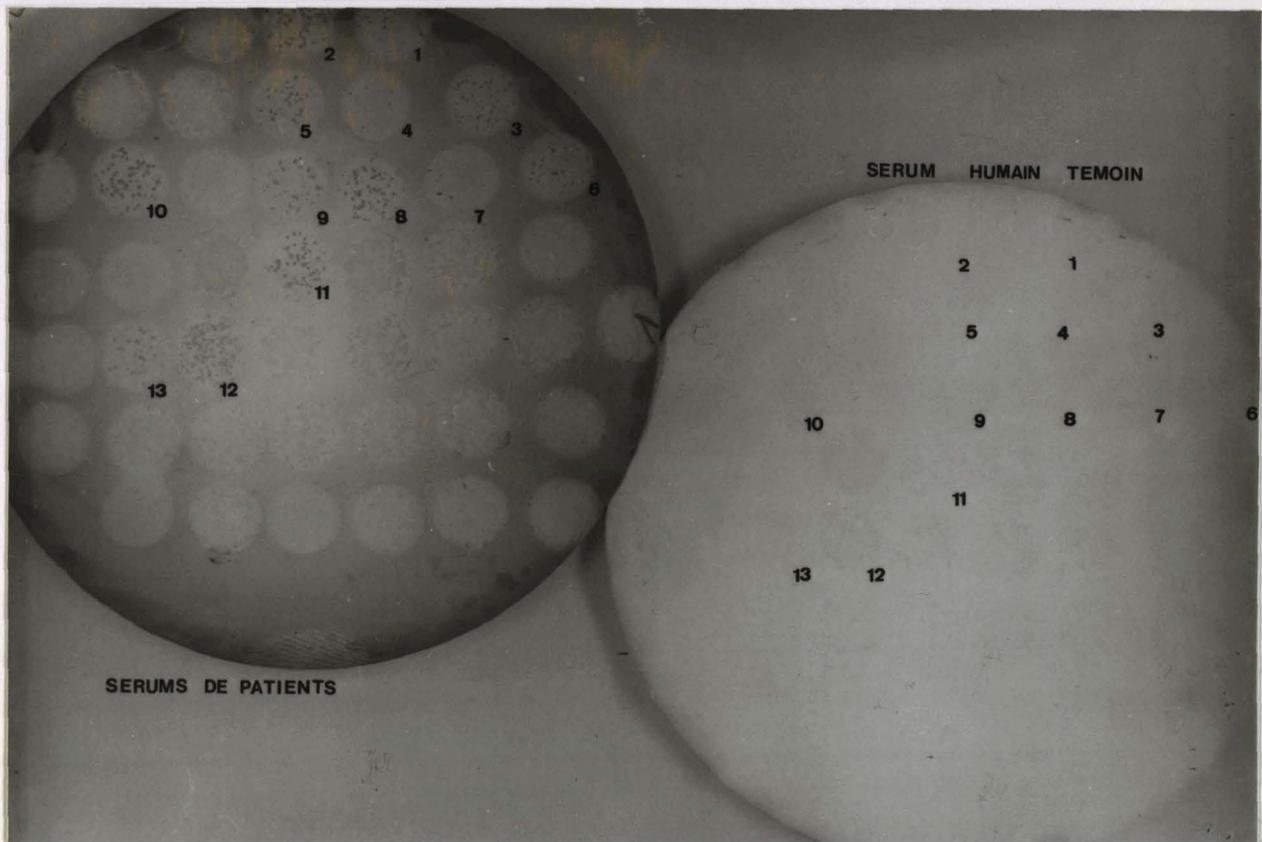


FIGURE 8 : Sélection des clones recombinants. Après une première sélection, les clones choisis sont à nouveau testés vis à vis d'un mélange de sérums de patients hydatiques (IEP : 3 à 6 arcs dont l'arc 5). Un sérum humain témoin sert de contrôle. 13 d'entre eux sont confirmés comme clones recombinants exprimant une protéine reconnue par des sérums humains infestés par E.granulosus.

nouveau test a été pratiqué sur les clones isolés. Cette seconde sélection a permis de confirmer 13 des 43 clones sélectionnés initialement, pour leur capacité à exprimer une protéine de fusion par les anticorps humains d'infection (cf figure 8).

### 3 - Analyse des clones obtenus.

Les treize clones recombinants ont été purifiés puis l'ADN phagique a été extrait pour chacun d'entre eux. Après digestion par EcoRI, une analyse électrophorétique en gel d'agarose-TBE a été réalisée, afin de mettre en évidence les différents inserts (résultats non montrés). Une estimation de leurs tailles a été réalisée, révélant un insert de 130 pb pour le clone 1, de 138 pb pour le clone 2, de 216 pb pour le clone 3 et de 456 pb pour les dix autres. La présence d'inserts de tailles égales dans 10 cas sur 13, nous a amené à soupçonner l'existence d'une identité entre ces clones. Des tests d'hybridation ont donc été effectués, utilisant comme sonde l'insert de l'un de ces dix clones, en l'occurrence le clone Eg6. La technique choisie permet une analyse des clones recombinants directement après empreinte sur nitrocellulose. Les différentes cultures phagiques sont réalisées sur boîte de Pétri, chaque clone étant individualisé sous forme d'une goutte. Afin d'éviter tout risque d'hybridation croisée entre l'ADN phagique et l'insert du clone Eg6 extrait à partir du lambda gt11, un sous-clonage du clone Eg6 (456pb) a été réalisé antérieurement en vecteur M13. La sonde utilisée par la suite a été préparée à partir de l'ADN de l'insert 6 d'un clone M13 recombinant. La figure 9 montre les résultats de l'hybridation de cette sonde avec

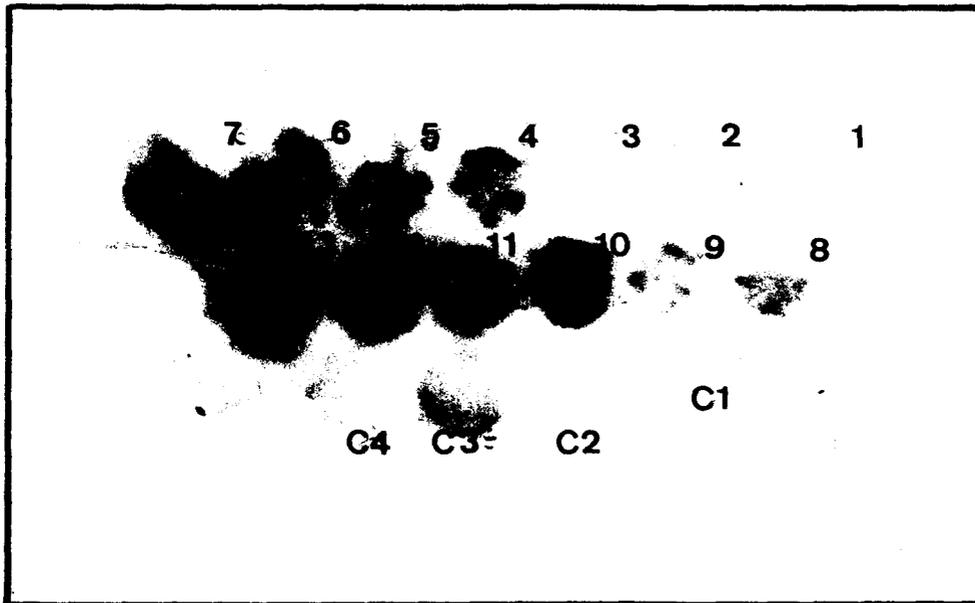


FIGURE 9 : Test d'hybridation entre les clones recombinants  $\lambda$ Eg et l'ADN de l'insert du clone Eg6. La sonde radiomarquée ADN 6 est testée vis à vis des 13 clones  $\lambda$ gt11 sélectionnés par les sérums de patients hydatiques (1 à 13). Le lambda sauvage (C1), le lambda gt11 (C2) et un clone exprimant un antigène de Schistosoma mansoni (C3) ou de Toxoplasma gondii (C4) ont été utilisés comme contrôles.

les 13 clones lambda gt11 recombinants sélectionnés par les sérums humains. Aucun signal n'est mis en évidence vis à vis des clones 1 (130 pb), 2 (138 pb), 3 (216 pb), permettant de penser que ces derniers possèdent des séquences différentes de celle de l'insert 6. Par contre, les clones 4 à 13 paraissent s'hybrider avec la sonde considérée suggérant des séquences similaires. L'utilisation de conditions strictes lors de la réaction d'hybridation nous renforce dans l'idée d'une identité entre ces séquences.

L'existence au sein de la banque non amplifiée d'ADNc d'E.granulosus de 10 clones identiques sur les 13 initialement sélectionnés par les sérums de patients, indique nécessairement une grande représentativité du message au sein de l'ARN qui a permis la construction de l'ADNc. En effet, ces 10 clones constituent en réalité les différents représentants d'un même message présent dans l'ARN extrait des protoscolex d'E.granulosus. Des expériences réalisées sur l'ARN messenger n'ont pu mettre en évidence ni la taille, ni la fréquence de ce message. Néanmoins, considérant à la fois sa grande représentativité dans la banque, ainsi que les propriétés antigéniques de la protéine de fusion correspondante avec les sérums de patients atteints d'hydatidose, l'analyse de l'un de ces 10 clones a été poursuivie. Les résultats suivants concernent plus particulièrement l'étude du clone ADNc 6 d' E.granulosus (Eg 6 - 456 pb).

### III - ETUDE DU CLONE Eg 6 D'ECHINOCOCCUS GRANULOSUS

#### 1 - Spécificité parasitaire

L'ADN de l'insert du clone 6 d'E.granulosus a été préparé afin d'obtenir une sonde radioactive permettant de rechercher au sein du génome d'autres organismes des séquences similaires.

Le hareng et le mollusque Biomphalaria glabrata ont été choisis comme témoins négatifs, car suffisamment éloignés dans l'échelle phylogénique. La sonde a été testée vis à vis de l'ADN de parasites plus ou moins proches. La figure 10 montre les résultats de cette hybridation. En dehors d'une réaction positive avec l'ADN d'E.granulosus, aucun signal n'est mis en évidence contre l'ADN des témoins négatifs, ni contre celui des autres parasites tels que Toxoplasma gondii (protozoaire), et Schistosoma mansoni (trématode). Si aucune homologie ne semble exister entre le clone Eg6 et l'ADN de ces parasites, il ne nous est pourtant pas permis d'affirmer que la séquence clonée est spécifique d'Echinococcus granulosus. Une confirmation serait nécessaire, notamment par hybridation avec l'ADN d'E.multilocularis ou d'autres cestodes proches comme le Taenia.

#### 2 - Séquençage nucléotidique du clone Eg 6

Afin de déterminer la séquence nucléotidique de l'insert d'ADNc du clone Eg 6, un sous-clonage a été effectué en vecteur M13. Un grand nombre de vecteurs M13 existent, tous dérivés du M13 sauvage et qui se

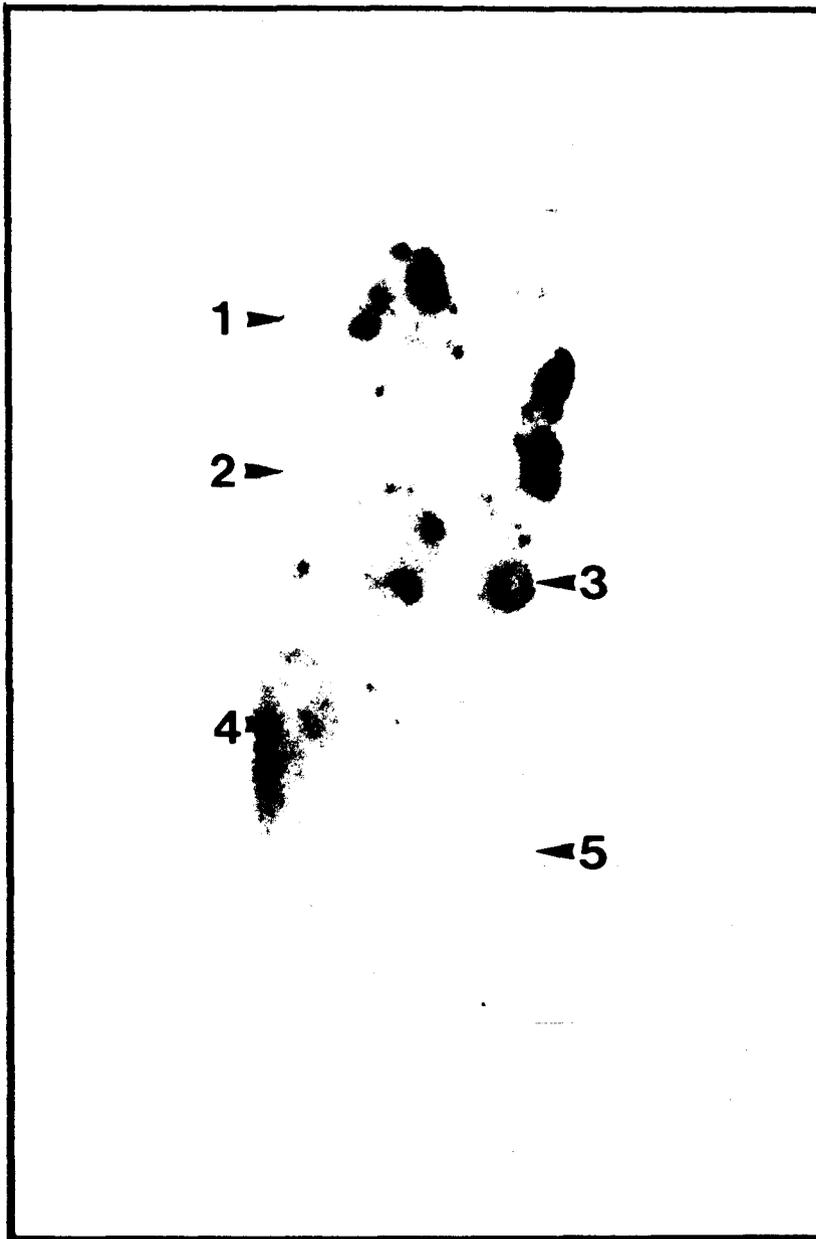
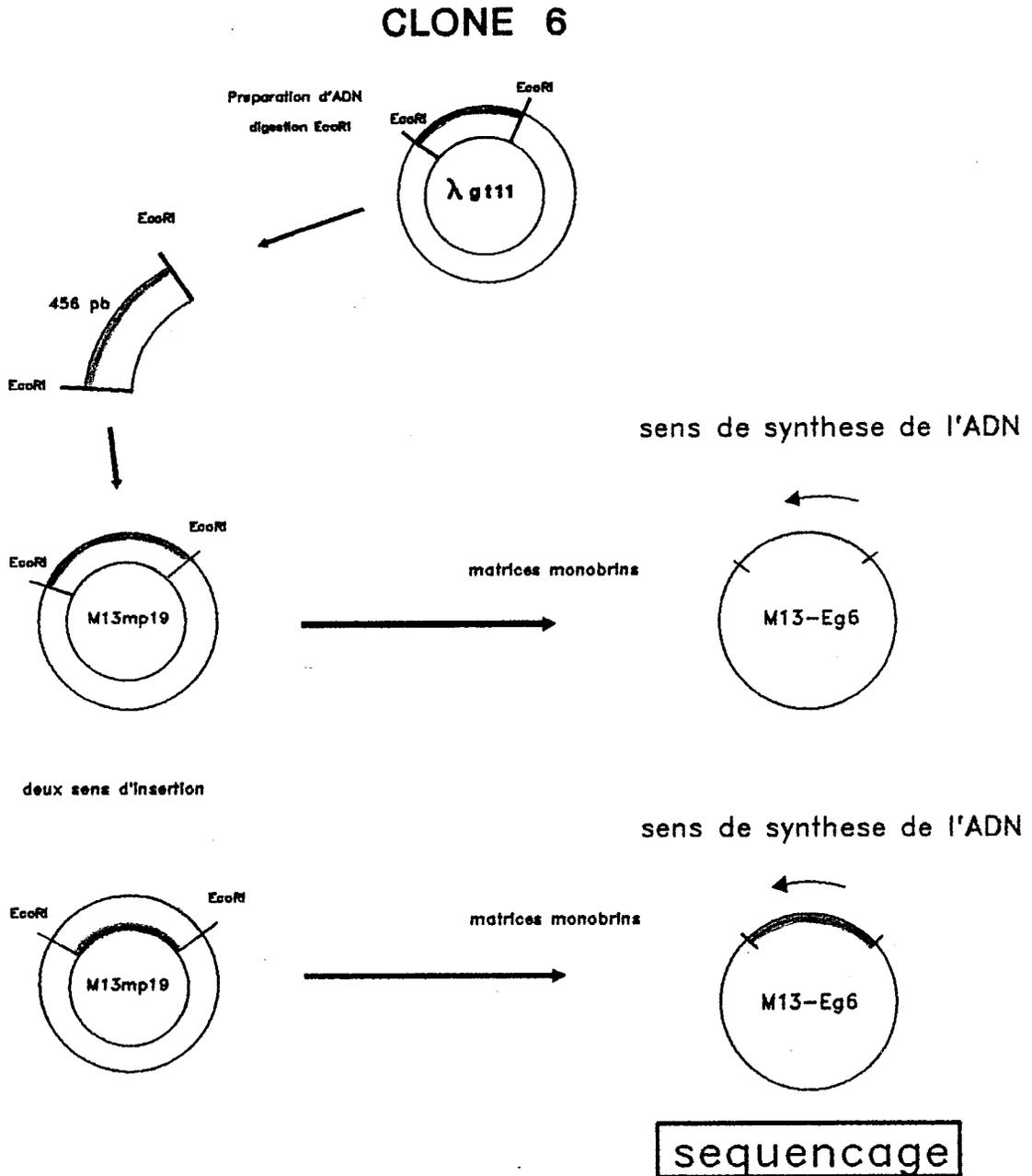


FIGURE 10 : Spécificité parasitaire du clone recombinant Eg6. La sonde radiomarquée ADNc 6 est testée par hybridation vis à vis de l'ADN de divers organismes.

- 1 : ADN de hareng.
- 2 : ADN de Biomphalaria glabrata.
- 3 : ADN d'E. granulosus.
- 4 : ADN de Toxoplasma gondii.
- 5 : ADN de Schistosoma mansoni.

FIGURE 11 : Sous-clonage du clone Eg6 en vecteur M13 avant séquençage nucléotidique.



différencient les uns des autres par leur séquence "polylinker" (rassemblement de plusieurs sites de restriction enzymatique). Ils sont en général construits par paire, l'un possédant l'ordre inverse des sites de restriction du polylinker de l'autre. Ceci permet l'insertion de fragments d'ADN à terminaisons asymétriques et favorise le clonage directionnel. Le séquençage est alors réalisé simultanément sur chacun des deux brins. Pour le clone Eg 6, la petite taille de l'insert (456 pb) n'a pas nécessité d'envisager la coupure enzymatique de l'ADN pour effectuer l'analyse de la séquence. Le clonage directionnel était inutile. L'insert a été extrait de l'ADN phagique du vecteur  $\lambda$ gt11 recombinant par coupure à l'aide de l'enzyme de restriction EcoRI. Après purification, il a été intégré dans le site correspondant du phage M13 mp19. L'orientation de l'insert lors de cette intégration s'est faite de manière aléatoire. Il s'est avéré que, parmi les clones M13 recombinants obtenus, les deux orientations de l'insert étaient représentées, permettant un séquençage de chacun des brins complémentaires (voir figure 11). Étant donné que l'utilisation du séquenceur automatique 370A (Applied Biosystem), permettait alors la lecture d'environ 500 pb par essai, nous avons pu séquencer l'insert 6 dans sa totalité en un seul temps. L'analyse a permis de déterminer une séquence nucléotidique de 456 pb pour le clone 6 (cf figure 12). Afin de confirmer les lectures, l'analyse a été effectuée au moins deux fois, sur chacun des brins complémentaires, en utilisant à chaque essai des matrices provenant de clones M13 recombinants différents.

```

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

```

FIGURE 12 : Séquence nucléotidique et séquence peptidique correspondante du clone Eg6. Les sites EcoRI (soulignés) font partie de la séquence qui contient 456 pb codant pour 152 acides aminés. La masse moléculaire calculée du peptide est évaluée à 17,3 kDa.

Les résultats ont montré que la séquence des adaptateurs de l'ADNc n'est pas retrouvée, ni à l'extrémité 5', ni à l'extrémité 3' de la séquence de l'insert (cf figure 12). Les sites EcoRI obtenus apparaissent donc comme des sites de restriction internes de l'ADNc, non protégés durant la réaction de méthylation qui précède l'intégration dans le phage gt11. De toute évidence, l'insert Eg6 ne constitue qu'une partie interne du gène codant pour l'antigène parasitaire.

### 3 - Séquence de la protéine codée par l'insert Eg 6.

Un seul cadre de lecture ouvert est retrouvé sur la séquence nucléotidique de l'insert Eg 6 (cf figure 12). Il apparaît en phase avec celui du phage lambda, permettant ainsi l'expression du polypeptide correspondant sous la forme voulue d'une protéine de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase. Ce polypeptide est constitué de 152 acides aminés dont la masse moléculaire calculée est évaluée à 17,3kDa (cf figure 13).

Une étude théorique de cette séquence protéique est réalisée à l'aide du logiciel PC Gene (Genofit). L'analyse de la structure secondaire a défini une structure majoritairement  $\alpha$ -hélicoidale, pour plus de 90% (cf figure 14).

Des sites potentiels de glycosylation ont été retrouvés sur les acides aminés 72 et 84, ainsi que 5 sites potentiels de phosphorylation, sur les acides aminés 25, 39, 62, 106 et 148 (cf figure 13).

Une prédiction des déterminants antigéniques a été faite selon la méthode de Hopp & Woods-1981. Elle a permis de définir 6 zones de forte antigénicité (de A à F, cf figure 15), établies selon le profil d'hydrophilicité.

FIGURE 13 : Analyse de la séquence protéique déduite du clone Eg6.

1 Glu Phe Val Asp Ile Asn Ile Ala Ser Lys Val Ala Asp Ala Phe  
16 Gln Lys Asn Lys Glu Lys Ile Thr Thr Thr Asp Lys Leu Gly Thr  
31 Ala Leu Glu Gln Val Ala Ser Gln Ser Glu Lys Ala Ala Pro Gln  
46 Leu Ser Lys Met Leu Thr Glu Ala Ser Asp Val His Gln Arg Met  
61 Ala Thr Ala Arg Lys Asn Phe Asn Ser Glu Val Asn Thr Thr Phe  
76 Ile Glu Asp Leu Lys Asn Phe Leu Asn Thr Thr Leu Ser Glu Ala  
91 Gln Lys Ala Lys Thr Lys Leu Glu glu Val Arg Leu Asp Leu Asp  
106 Ser asp Lys Thr Lys Leu Lys Asn Ala Lys Thr Ala Glu Gln Lys  
121 Ala Lys Trp Glu Ala Glu Val Arg Lys Asp Glu Ser Asp Phe Asp  
136 Arg Val His Gln Glu Ser Leu Thr Ile Phe Glu Lys Thr Cys Lys  
151 Glu Phe

**Composition en acides aminés :**

Ala (A) : 16	Cys (C) : 1	His (H) : 2	Met (M) : 2	Thr (T) : 15
Arg (R) : 5	Gln (Q) : 8	Ile (I) : 5	Phe (F) : 8	Trp (W) : 1
Asn (N) : 8	Glu (E) : 17	Leu (L) : 12	Pro (P) : 1	Tyr (Y) : 0
Asp (D) : 11	Gly (G) : 1	Lys (K) : 21	Ser (S) : 10	Val (V) : 8

Nombre de résidus : 152 acides aminés.

Masse moléculaire calculée : 17 288 Da.

Sites potentiels de N-glycosylation : 2 sites

- 1 : Acide aminé 72 : FNSEV N TTFIE.
- 2 : Acide aminé 84 : LKNFL N TTLSE.

Sites potentiels de phosphorylation (protéine kinase C) : 5 sites

- 1 : Acide aminé 25 : EKITT T DKLGT.
- 2 : Acide aminé 39 : QVASQ S EKAAP.
- 3 : Acide aminé 62 : HQRMA T ARKNF.
- 4 : Acide aminé 106 : RLDD S DKRKL.
- 5 : Acide aminé 148 : TIFEK T CKEF.

FIGURE 14 : Analyse de la structure secondaire de la protéine déduite de la séquence nucléotidique du clone Eg6.

```

1  EFVDINIASKVADAFQKNKEKITTTDKLGTALEQVASGSEKAAPQLSKML
   XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX—XXX*XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
   XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX—XXX*XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

51 TEASDVHQRMATARKNFNSEVNTTFIEDLKNFNLTTLSEAGKAKTKLEEV
   XXXXXXXXXXXXXXX*XXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
   XXXXXXXXXXXXXXX*XXXXXXXX-XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

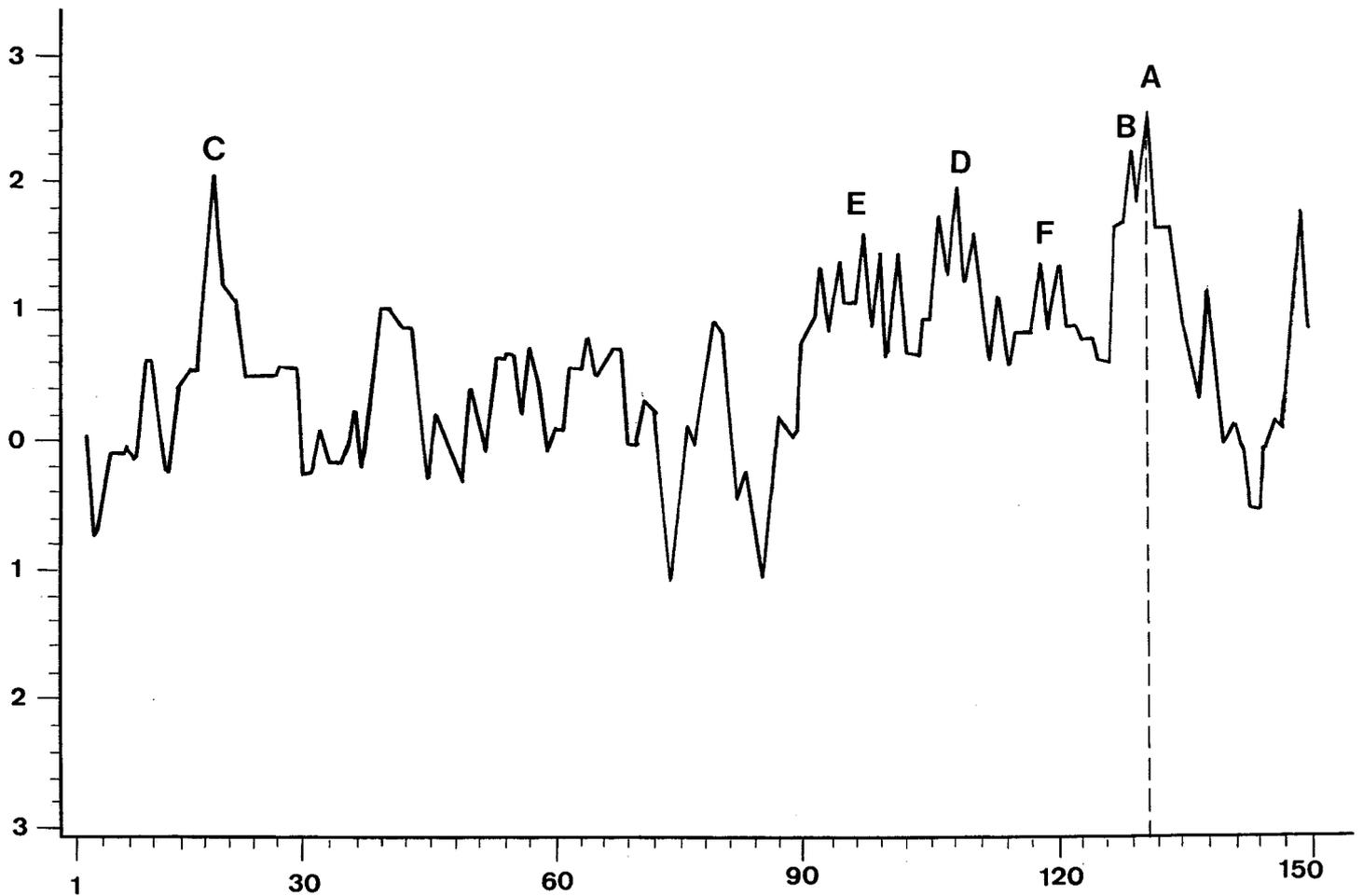
101 RLDLDSDKTKLKNAKTAEQKAKWEAEVRKDESDFDRVHGESLTIFEKTK
   XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
   XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

151 EF
   XX
   XX

```

X : hélice  
 \* : enroulement  
 - : extension

FIGURE 15 : Prédiction des déterminants antigéniques présents sur la protéine déduite de la séquence nucléotidique du clone Eg6 (152 acides aminés) par analyse du profil d'hydrophilicité.



Profil d'hydrophilicité de la séquence peptidique déduite du clone Eg6.

Les trois moyennes d'hydrophilicité les plus importantes sont situées aux points (selon Hopp & Woods-1981) :

A : de l'acide aminé 128 à 133 : Arg-Lys-Asp-Glu-Ser-Asp.

B : de l'acide aminé 126 à 131 : Glu-Val-Arg-Lys-Asp-Glu.

C : de l'acide aminé 16 à 21 : Gln-Lys-Asn-Lys-Glu-Lys.

La recherche d'homologie de séquence avec des molécules déjà caractérisées a été effectuée par consultation des banques de données Swissprot et NBRF. Aucune homologie significative n'a été retrouvée. Les scores les plus importants enregistrés (20% d'homologie) ont été obtenus en comparant la séquence protéique du clone Eg 6 (résidus 10 à 126) avec la chaîne lourde de la myosine de lapin du muscle squelettique (résidus 100 à 216) ou du muscle cardiaque (résidus 508 à 620).

#### IV - ANALYSE DE LA PROTEINE DE FUSION DU CLONE Eg 6 (PF 6).

##### 1 - Production de la protéine de fusion PF6

A partir du clone recombinant  $\lambda$ gt11-Eg6, une construction lysogénique a été réalisée afin de produire la protéine de fusion en quantité suffisante pour permettre une analyse par les sérums. Après sélection des colonies Y1089 lysogènes recombinantes, la culture est effectuée jusqu'à une densité optique de 0,5 à 600 nm. La production de la protéine de fusion est induite par addition d'IPTG au milieu et la culture est poursuivie à 37°C. Cette dernière phase s'est révélée très délicate pour les colonies lysogènes recombinante du clone 6. Une lyse complète se produisait 20 à 30 minutes après induction. En général, la présence d'une mutation ambre (Sam 100) chez le phage permet d'éviter la lyse en fin de cycle chez les bactéries sup F- comme celles de la souche Y1089. Néanmoins, le phénomène de lyse peut se produire en cas de mutation déficiente ou lors d'une forte accumulation de protéine étrangère dans la

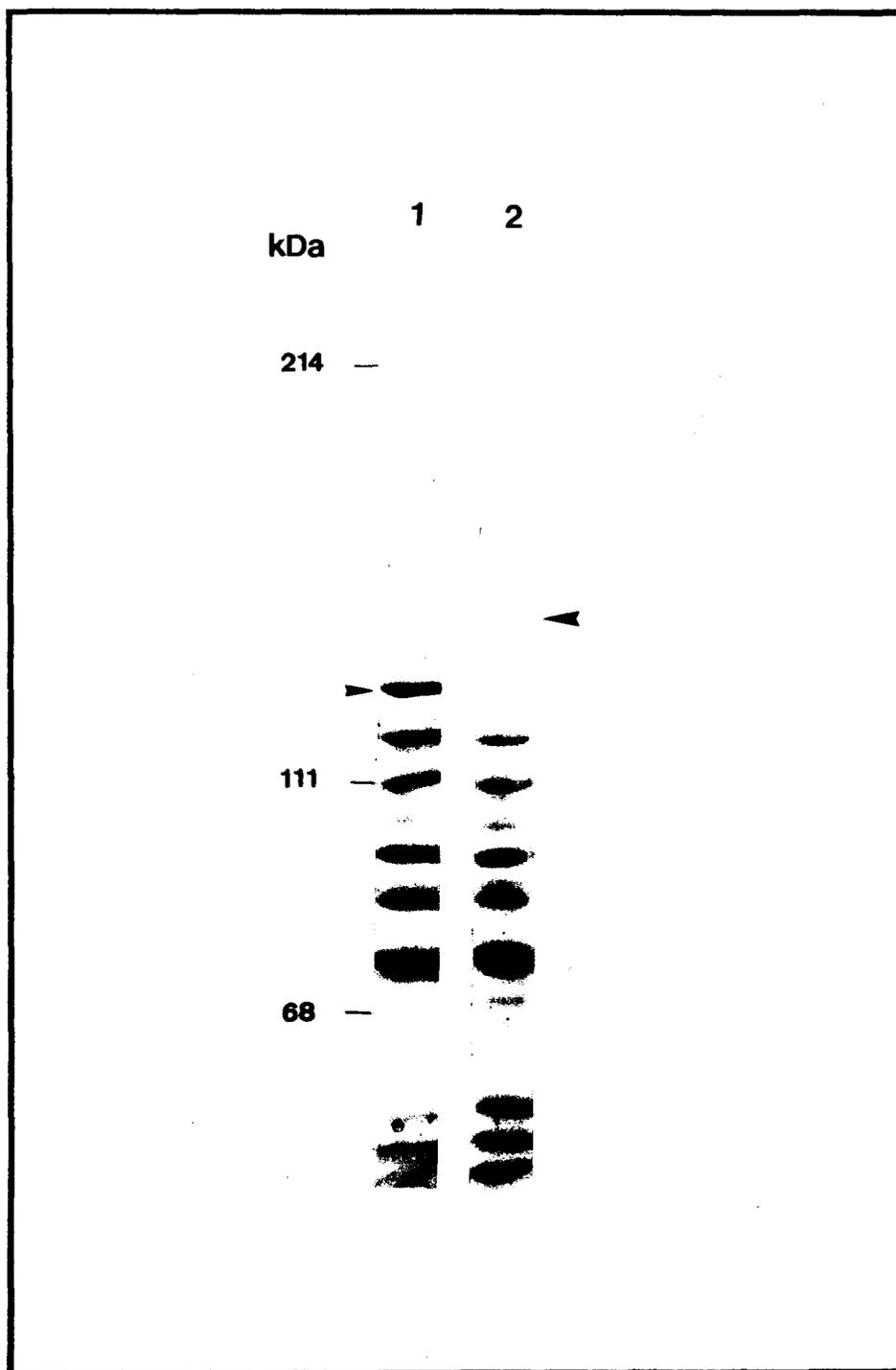


FIGURE 16 : Caractérisation de la protéine de fusion PF6. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS en conditions réductrices et coloration au bleu de Coomassie de la protéine recombinante PF6 (fléchée - bande n°2) et d'un extrait lysogénique d'une colonie exprimant la B-galactosidase (fléchée - bande n°1).

bactérie, la rendant ainsi plus fragile. Les cultures lysogéniques ont donc toutes été limitées à 20 minutes après induction afin d'éviter la lyse et les phénomènes de protéolyse sur la protéine de fusion.

Des extraits bruts ont été préparés dans ces conditions et analysés par électrophorèse en conditions réductrices en gel de polyacrylamide-SDS. La figure 16 montre les profils obtenus après coloration du gel au bleu de Coomassie. La bande 1 met en évidence la  $\beta$ -galactosidase au sein d'un extrait lysogénique de phages  $\lambda$ gt11 sans insert, préparé et analysé dans le même temps. La protéine de fusion FP6 (figure 16 - bande 2) apparaît à une masse moléculaire relative de 133 kDa. Ce poids correspond effectivement à l'association de la  $\beta$ -galactosidase avec un polypeptide de 152 acides aminés.

## 2 - Reconnaissance de PF 6 par les sérums humains

Une analyse de la reconnaissance de PF6 par des sérums de patients a été réalisée. Pour cela, un extrait lysogénique contenant la protéine de fusion est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS en conditions réductrices avant transfert sur feuille de nitrocellulose. Différents sérums de patients atteints d'hydatidose sont testés vis à vis de cette préparation. Les sérums sont préalablement analysés par immunoelectrophorèse et caractérisent tous l'arc 5. Sur les 12 sérums humains d'infestation par E.granulosus, 11 reconnaissent avec des intensités variables, la molécule de 133 kDa correspondant à PF6 (cf figure 17). Testés vis à vis de la même préparation lysogénique, des sérums de patients infestés par E.multilocularis reconnaissent aussi la protéine clonée mais de manière moins marquée (cf figure 17).

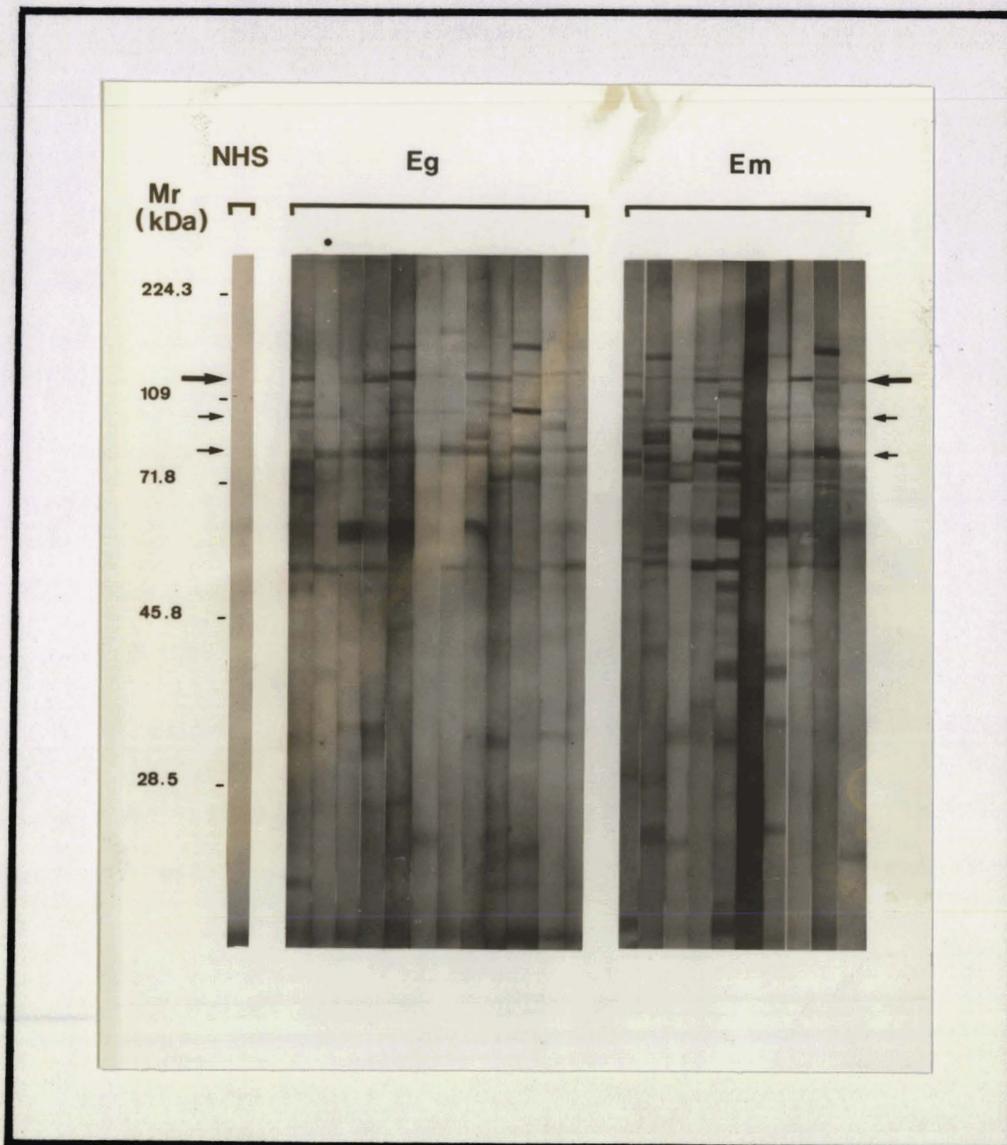


FIGURE 17 : Etude de la reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par des sérums de patients infestés par E.granulosus (Eg) ou par E.multilocularis (Em) après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (conditions réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

L'échinococcose alvéolaire a été confirmée chez tous ces patients. Analysés en IEP, ces sérums réagissent avec les antigènes d'E.granulosus en créant de 1 à plusieurs arcs de précipitation, dont, notamment, l'arc 5.

A titre de contrôle, des sérums humains atteints par d'autres parasitoses sont testés dans les mêmes conditions (cf figure 18). Les résultats montrent une très faible reconnaissance de la molécule clonée par 1 des 2 sérums anti-Fasciola hepatica (figure 18 - bandes 2 et 3) ainsi que par 2 sérums anti-Schistosoma mansoni (figure 18 - bandes 4 et 5). D'autre part, des sérums d'infestation par d'autres cestodes (Taenia saginata) réagissent variablement vis à vis de la protéine PF6. Sur les 4 sérums testés, deux la reconnaissent faiblement et un seul d'une manière plus intense (figure 18 - bandes 6 à 9).

Des incubations contrôles ont été réalisées dans les mêmes conditions afin de tester la réactivité de ces sérums vis à vis de la  $\beta$ -galactosidase et d'un extrait brut d'E.coli de souche Y1089. La  $\beta$ -galactosidase n'a pas été reconnue par les sérums, ni aucune molécule de même poids moléculaire que PF6 parmi les composants du lysat bactérien.

D'après ces résultats, les sérums de patients atteints d'hydatidose reconnaissent de manière significative la protéine de fusion mettant en évidence la présence sur cette molécule de déterminants antigéniques cibles du système immunitaire humain lors d'une infestation par E.granulosus. La présence sur la molécule clonée de déterminants antigéniques communs à d'autres parasites proches peut expliquer la reconnaissance par des sérums de patients atteints d'autres parasitoses. Néanmoins, l'intérêt diagnostique de la protéine recombinante n'en est pas

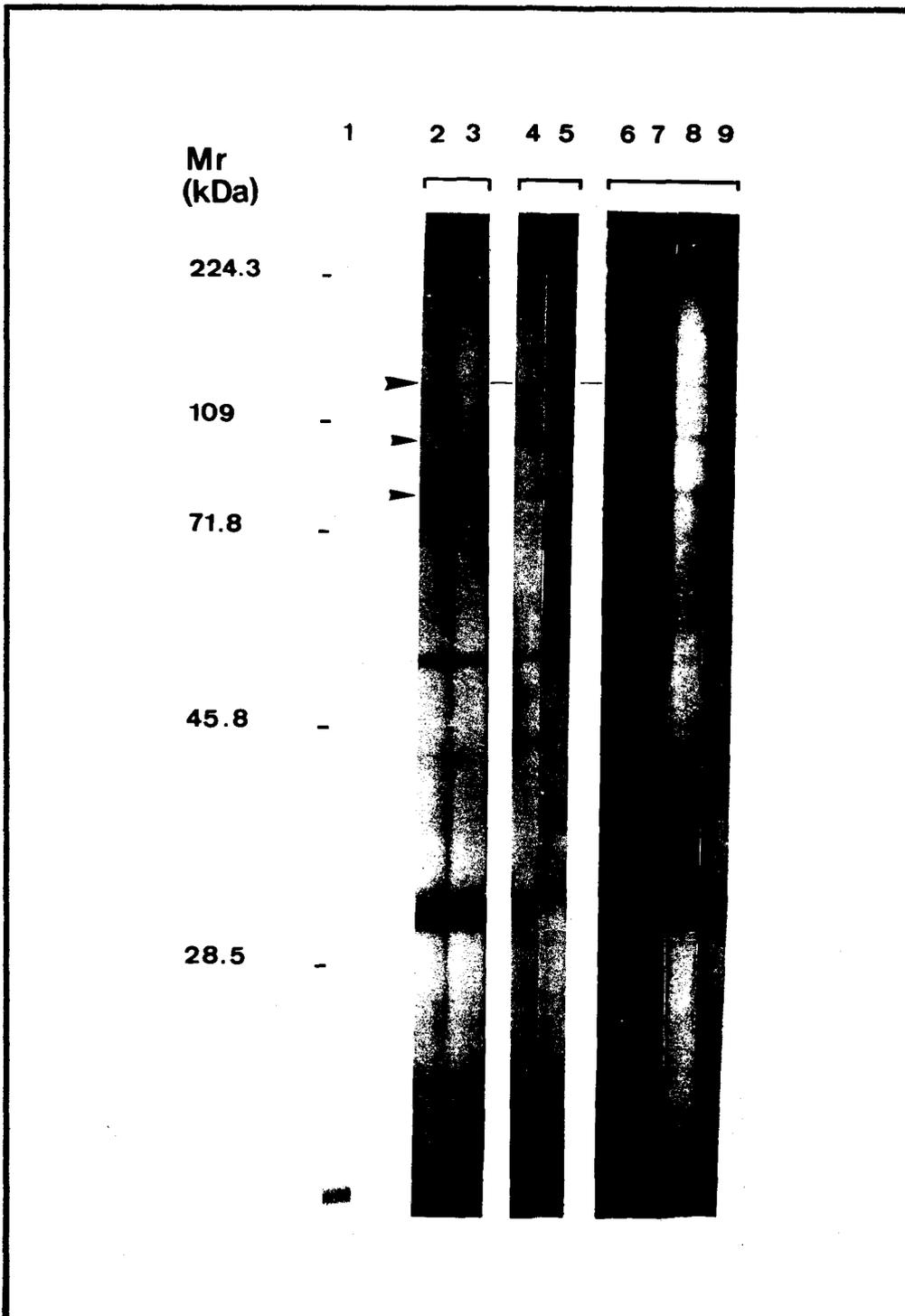


FIGURE 18 : Etude de la reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par différents sérums de patients atteints de distomatose, de bilharziose et de cysticerose. L'analyse est réalisée après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (conditions réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

- 1 : Sérum humain témoin.
- 2 et 3 : Sérums de patients infestés par Fasciola hepatica.
- 4 et 5 : Sérums de patients infestés par Schistosoma mansoni.
- 6, 7, 8, et 9 : Sérums de patients infestés par Taenia saginata.

diminué. La présence d'épitopes communs n'exclut nullement la possibilité de l'existence d'un déterminant antigénique spécifique d'Echinococcus, voire même d'Echinococcus granulosus.

Au cours de cette expérience, une dégradation protéolytique de la molécule recombinante s'est produite malgré l'utilisation d'inhibiteurs de protéases. Les produits de dégradation ont également été mis en évidence par les sérums testés comme en témoigne la reconnaissance de bandes de poids moléculaires inférieurs à la protéine de 133 kDa, plus particulièrement aux masses moléculaires relatives de 104 et 81 kDa. Ce phénomène couramment observé lors de clonage en vecteur lambda, pourrait être dû, dans ce cas particulier à un artéfact au cours de la phase de production de PF6, induisant une lyse rapide des bactéries et une dégradation enzymatique. Une préparation réalisée ultérieurement n'a pas rencontrée les mêmes problèmes lors de la culture des bactéries lysogènes recombinantes (provenant de la même souche). L'extrait brut obtenu n'a montré aucun phénomène de protéolyse de la protéine clonée (M.Chamekh, communication personnelle).

### 3 - Reconnaissance de PF6 par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12.

Considérant les résultats obtenus lors de l'analyse par immunoprécipitation des produits de traduction d'ARN d'E.granulosus à l'aide de l'anticorps monoclonal EG 02 154/12, la réactivité de la molécule clonée a été testée vis à vis de cet anticorps monoclonal spécifique de l'antigène 5 d'E.granulosus. L'expérience a été réalisée avec la même préparation lysogénique et dans les mêmes conditions que pour

les anticorps humains. La figure 19 (ligne 5) montre la reconnaissance de la molécule de 133 kDa par les anticorps EG 02 154/12. Comme précédemment, lors de l'analyse de la reconnaissance par les sérums humains, des molécules de 104 et 81 kDa, produits de dégradation majeurs de PF6, sont aussi révélées par l'anticorps monoclonal, complémentaire à celle de 133 kDa.

Une ascite myélomateuse SP20 a été utilisée comme témoin (figure 19 - bande 3). Les anticorps spécifiques de l'antigène 5 EG 02 154/12 étant de classe G1, des anticorps monoclonaux de même classe ont été analysés comme contrôle (figure 19 - bandes 1 et 2). Aucun de ces témoins ne reconnaît ni la molécule clonée de 133 kDa, ni les produits de dégradation aux poids moléculaires de 104 et 81 kDa.

La spécificité de l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 a été définie comme restreinte à un épitope spécifique d'E.granulosus. Il apparaît donc qu'en dehors des déterminants antigéniques communs à d'autres parasites, FP6 possède aussi l'épitope cible du monoclonal. D'après les résultats de M.Chamekh-1990, ce déterminant antigénique apparaissait spécifique de l'antigène 5 et semblait être lié, voire identique, à celui reconnu par les sérums humains spécifiques de l'arc 5. Il semble donc qu'une corrélation puisse être établie entre l'arc 5 et la protéine recombinante. Cependant, si les sérums humains anti-E.granulosus testés précédemment vis à vis de PF6 caractérisent tous l'arc 5 en IEP, nos résultats n'établissent pas clairement la liaison entre la réponse humaine spécifique de l'antigène 5 et la reconnaissance de la protéine clonée. Une sélection des anticorps humains spécifiques de PF6 a donc été réalisée afin de mettre en évidence la corrélation entre la présence d'anticorps spécifiques de l'arc 5 et la reconnaissance de la fraction antigénique clonée.

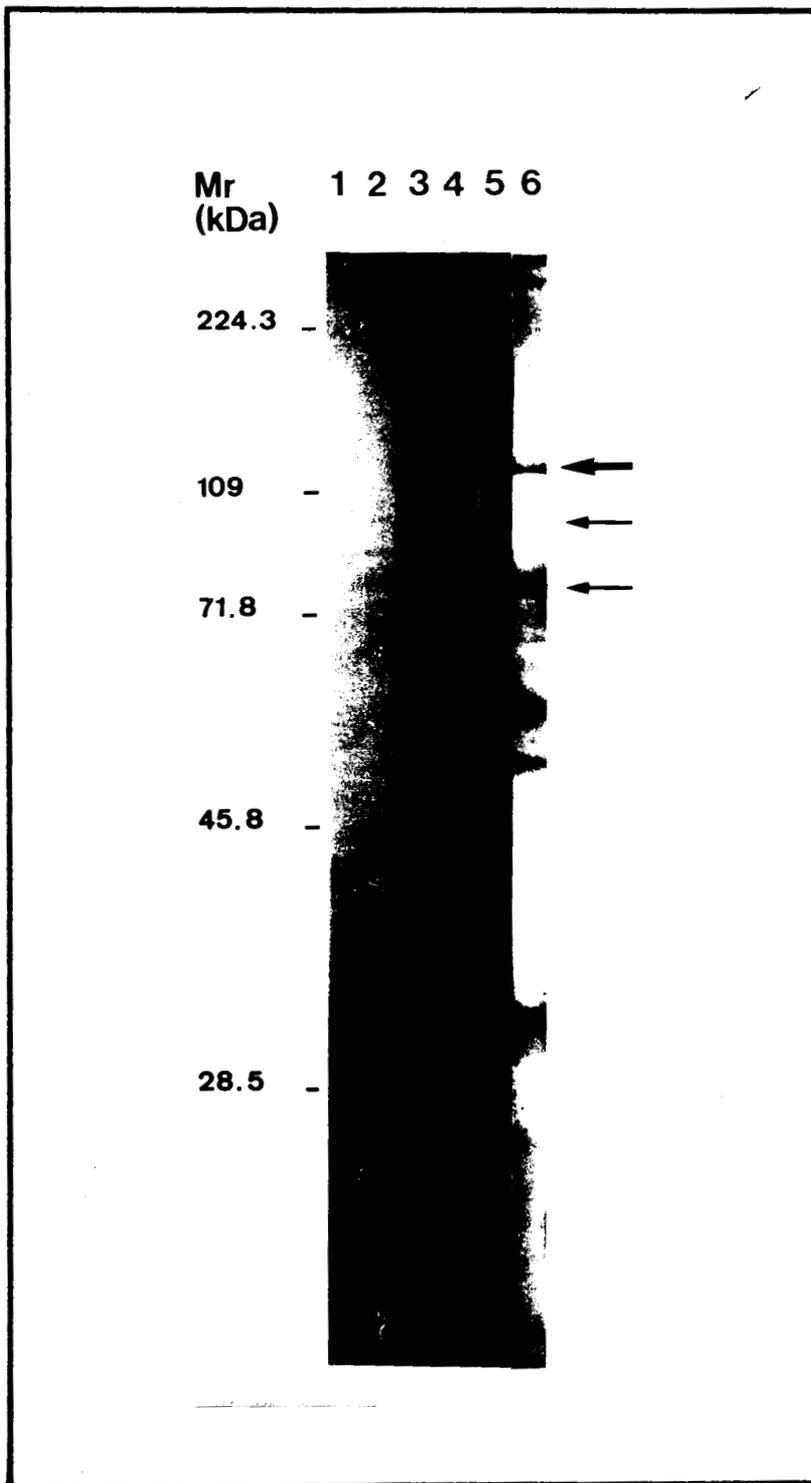


FIGURE 19 : Reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par l'anticorps monoclonal EG02 154/12. L'analyse est réalisée après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS en conditions réductrices et transfert sur feuille de nitrocellulose.

- 1 : Anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii* (sous-classe G1).
- 2 : Cellules myélomateuses SP20.
- 3 : Anticorps monoclonal anti-*Trypanosoma cruzi* (sous-classe G1).
- 4 : Anticorps monoclonal anti-*E. granulosus* EG02 154/12 (sous-classe G1).
- 5 : Anticorps humains sélectionnés sur le clone recombinant Eg6 exprimant la protéine de fusion PF6.

#### 4 - Sélection d'anticorps humains sur le clone 6.

Des sérums de patients infestés par E.granulosus, réagissant fortement contre la molécule clonée PF6, ont été choisis pour réaliser une sélection d'anticorps spécifiques au clone 6. Ces sérums sont caractérisés en immunoelectrophorèse et reconnaissent au moins 4 arcs, dont l'arc 5. Les clones  $\lambda$ gt11 recombinants pour le clone 6 sont cultivés sur boîte de Pétri jusqu'à confluence. La production de la protéine de fusion est induite par le dépôt d'un filtre de nitrocellulose imbibé d'IPTG. Les sérums sont directement incubés avec les filtres sur lesquels est adsorbée la protéine recombinante. Après lavages, les anticorps spécifiques de FP6 sont élués.

Afin de vérifier leur spécificité pour la molécule clonée, les anticorps sont testés vis à vis des préparations lysogéniques analysées précédemment par les sérums humains et le monoclonal. La protéine de 133kDa est mise en évidence par les anticorps sélectionnés sur le clone Eg6, tout comme des bandes de masse moléculaires inférieures (104 et 81 kDa), (cf figure 19, bande 6). La reconnaissance de ces deux dernières molécules, complémentaires à FP6 confirme l'existence d'un phénomène de dégradation protéolytique dans les extraits lysogéniques testés précédemment.

Ces anticorps humains spécifiques de PF6 sont ensuite incubés avec les antigènes totaux du liquide hydatique préalablement soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, en conditions réductrices, et transférés sur feuille de nitrocellulose. La révélation d'une bande au poids moléculaire de 37 kDa (cf figure 20B - bande 2) identifie l'antigène natif parmi les composants du liquide hydatique.

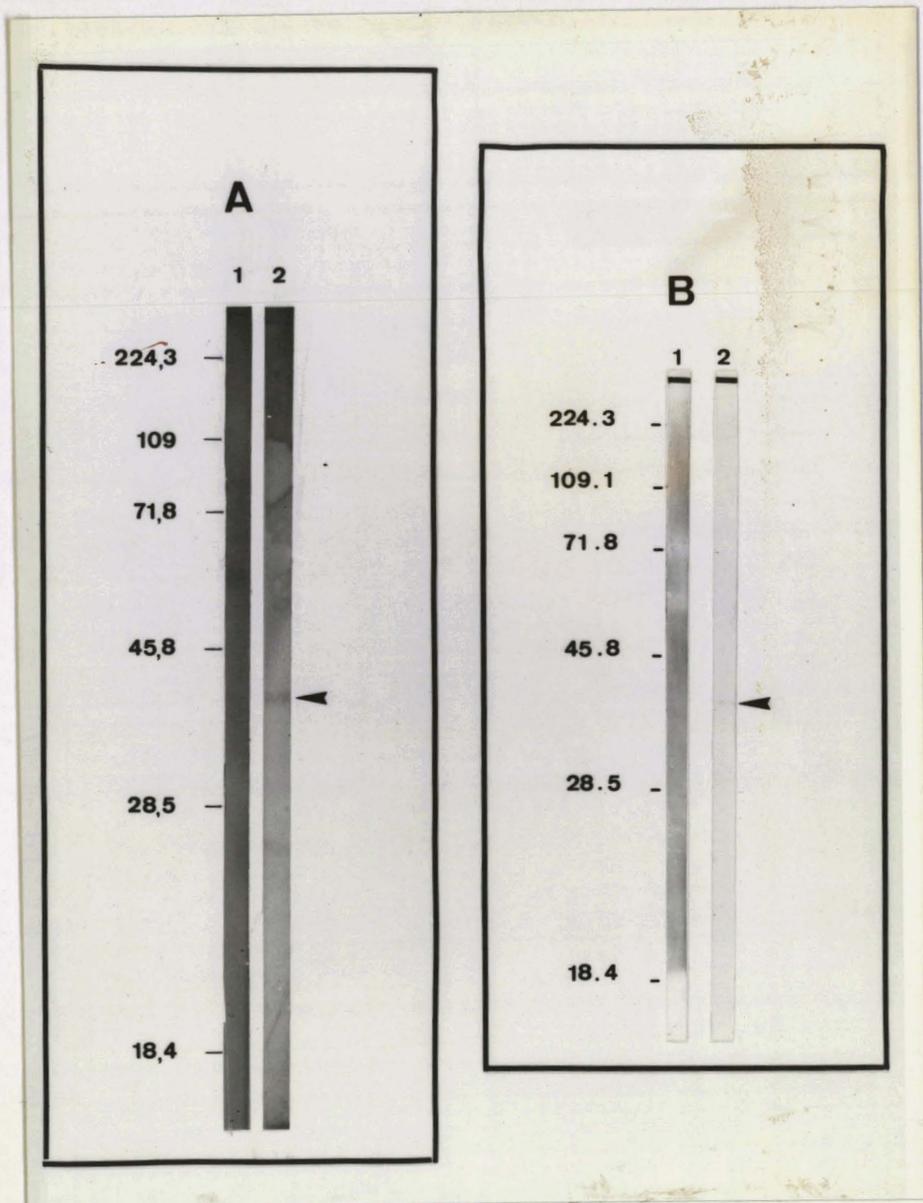


FIGURE 20 : Reconnaissance des antigènes hydatiques par un sérum de patient hydatique spécifique de l'antigène 5 (A) et par les anticorps humains sélectionnés sur le clone recombinant Eg6 (B). L'analyse est réalisée après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (conditions réductrices) et transfert sur feuille de nitrocellulose.

A Sérum de patient hydatique

1 : Sérum humain témoin.

2 : Sérum de patient hydatique spécifique de l'antigène 5 (IEP : 1 arc = arc 5).

B Anticorps humains sélectionnés

1 : Anticorps de patients hydatiques sélectionnés sur le phage  $\lambda$ gt11 sans insert.

2 : Anticorps de patients hydatiques sélectionnés sur le clone recombinant Eg6 exprimant la protéine de fusion PF6.

Testé dans les mêmes conditions de réaction, un sérum humain spécifique de l'arc 5 (IEP : un arc = arc 5) identifie au sein des mêmes antigènes une molécule de même masse moléculaire (figure 20A - bande 2).

Au cours de cette expérience, une sélection d'anticorps contrôle a été réalisée à partir des mêmes sérums humains sur un clone lambda gt11 sans insert. Aucune interaction n'a été enregistrée, ni contre la molécule clonée, ni contre les antigènes hydatiques (cf figure 20B - bande 1).

Lors de cette expérience, les sérums humains spécifiques de l'arc 5, testés vis à vis des constituants du liquide hydatique, mettent en évidence une des sous-unités de l'antigène 5 au poids moléculaire de 37 kDa. Le fait que les anticorps humains sélectionnés sur la molécule clonée reconnaissent au sein des antigènes hydatiques une molécule de même masse moléculaire, semble confirmer l'hypothèse de l'existence d'une relation entre l'antigène 5 et PF6. Il ne nous est cependant pas permis d'affirmer que la protéine recombinante représente la partie clonée d'une des sous-unités de l'antigène 5. Seule la comparaison des séquences protéiques de l'antigène 5 natif et du produit du gène complet correspondant à la partie clonée en Eg6, permettrait de confirmer cette identité. Néanmoins, si l'on rapproche ces résultats de ceux obtenus lors des tests d'immunoprécipitation des produits de traduction *in vitro* d'ARN d'E.granulosus, de fortes présomptions demeurent quant à la relation existant entre l'antigène 5 et le polypeptide cloné.

## CONCLUSION

L'ensemble des techniques d'immunodiagnostic de l'hydatidose vise à mettre en évidence l'existence, au sein des sérums de patients, d'anticorps dirigés contre les constituants parasitaires. Parmi les antigènes échinococciques, l'antigène 5 représente le composant majeur du liquide hydatique contre lequel la réponse immunitaire est principalement dirigée (Capron et al.-1967). Parmi ces techniques, l'immunoélectrophorèse reste le test le plus couramment pratiqué pour la détection des anticorps anti-antigène 5 et la présence de l'arc 5 constitue le critère le plus important pour le diagnostic de la maladie (Capron et al.-1970, Wattré et al.-1980).

L'analyse moléculaire de cet antigène a permis d'identifier celui-ci comme une lipoprotéine aux propriétés antigéniques intéressantes mais complexes. Ce composé généralement décrit comme une molécule de 60 kDa (Oriol et al.-1971, Bout et al.-1974), se dissocie, en conditions réductrices, en deux sous-unités de 37 et 22 kDa (Di Felice et al.-1986, Chamekh et al.-1989). Bien que généralement considéré comme spécifique d'E.granulosus, l'antigène 5 peut présenter des réactions croisées avec des espèces proches comme E.multilocularis (Yarzabal et al.-1977, Varela-Diaz et al.-1977b) ou avec d'autres helminthes (Varela-Diaz et al.-1977a, 1978, Yong & Heath-1979, Conder et al.-1980, Schantz et al.-1980, Shepherd & Mc Manus-1987). Il semblerait cependant que ce type de phénomène soit dû, en grande partie, à la présence d'épitopes phosphoryl choline (Shepherd & Mc Manus-1987).

La présence de structures moléculaires communes entre parasites, ainsi que de composants provenant de l'hôte au sein des antigènes hydatiques amène parfois une fausse positivité des tests d'immunodiagnostic. Les conséquences thérapeutiques d'un tel phénomène sont trop importantes pour que ce problème soit négligé. Une standardisation des préparations

antigéniques utilisées pour le sérodiagnostic de l'hydatidose s'impose donc. De nombreux travaux sont menés dans cette optique depuis plusieurs années. De nouvelles stratégies sont élaborées, profitant, à la fois, de l'acquis des études antérieures et des potentialités des nouvelles techniques.

Les recherches sur l'hydatidose ont bénéficié, comme tant d'autres domaines, de l'apport des travaux menés en immunologie. Des anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes du liquide hydatique ont été produits dans notre laboratoire. L'un d'entre eux, EG 02 154/12, a été sélectionné sur sa spécificité pour l'antigène 5 d'E.granulosus. Sa caractérisation par Chamekh et al.-1990 a permis de définir la nature protéique de l'épitope mis en jeu, épitope porté par l'antigène 5 et apparaissant identique ou tout au moins lié au(x) déterminant(s) antigénique(s) reconnu(s) par les sérums de patients infestés par E.granulosus. L'importance de l'immunogénicité de l'antigène 5 dans l'infection humaine suggérait donc une participation des structures moléculaires reconnues par l'anticorps monoclonal, à l'amélioration des processus de détection sérologique de l'hydatidose.

Dans ce contexte, les capacités technologiques de la biologie moléculaire s'avéraient particulièrement intéressantes pour exploiter les propriétés immunologiques de la fraction protéique de l'antigène 5. Nous avons donc entrepris le clonage et le séquençage de cet antigène et plus particulièrement de la portion protéique reconnue par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12. A partir de l'ARN extrait des protoscolex d'E.granulosus, une banque d'ADNc a été construite en vecteur d'expression lambda gt11. Le criblage a été réalisé à l'aide d'anticorps humains d'infection et 13 clones ont été sélectionnés. Dix de ces clones se sont avérés être les différents représentants du même ADNc. L'un de ceux-ci

(Eg6) a été plus particulièrement étudié, d'une part pour la grande représentativité de l'insert au sein de l'ADNc, et d'autre part pour ses propriétés antigéniques vis à vis des sérums d'infection. L'ADN inséré est constitué de 456 pb codant pour une chaîne polypeptidique de 152 acides aminés, essentiellement de structure conformationnelle  $\alpha$ -hélicoidale. La nature de l'antigène correspondant n'a pas pu être définie par la recherche d'homologies avec d'autres molécules déjà caractérisées présentées dans les banques de données actuelles, ni par comparaison avec les séquences des autres protéines clonées chez E.granulosus présentées dans des travaux récents (Lightowers et al.-1989, Shepherd et al.-1991). Une étude des caractéristiques antigéniques de la protéine de fusion synthétisée par le clone Eg6 (PF6) a été entreprise afin de définir le potentiel immunologique de la molécule recombinante. L'identification de PF6 par les sérums de patients atteints d'hydatidose confirmée constitue une des caractéristiques du clone Eg6. Mais c'est surtout dans la reconnaissance par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 que réside l'originalité de ce recombinant. La molécule clonée apparaît non seulement porter un ou des déterminants antigéniques cibles du système immunitaire humain lors d'une infestation par E.granulosus, mais aussi posséder un épitope spécifique d'E.granulosus. Sachant que cet épitope est présent sur l'antigène 5 et que les anticorps testés (sérums humains d'infection et anticorps monoclonaux) immunoprécipitent ce même antigène parmi les constituants du liquide hydatique (Chamekh et al.-1990), il semble donc qu'un lien puisse être établi entre l'antigène 5 et le polypeptide cloné. De plus, il ressort des expériences de sélection d'anticorps sur la protéine de fusion, que les immunoglobulines humaines spécifiques de PF6 reconnaissent en immunotransfert une des sous-unités de 37 kDa de l'antigène 5. La connaissance de la composition en amino-acides de la fraction protéique de

la sous-unité de 37 kDa de l'antigène 5 nous manque pour prouver, sans équivoque, l'identité de la molécule correspondant à la partie clonée. Il n'en reste pas moins que la protéine recombinante possède un ou plusieurs épitopes portés par l'antigène 5 natif, reconnus par les sérums de patients hydatiques et liés à la reconnaissance de l'antigène 5 par le monoclonal spécifique d'E.granulosus (Chamekh et al.-1990).

Il semble cependant que l'utilisation de PF6 sous une forme recombinante apparaisse limitée dans une application diagnostique. Bien que des travaux récents aient mentionné avec succès l'utilisation de protéines parasitaires clonées dans des tests de type E.L.I.S.A. pour le sérodiagnostic de l'échinococcose (Müller et al.-1989, Hemmings & McManus-1991), il apparaît difficile d'utiliser PF6 dans un système identique du fait de la présence de déterminants antigéniques communs à d'autres parasites proches, mise en évidence lors des tests de reconnaissance de la protéine de fusion par des sérums de patients atteints par diverses parasitoses. Dans ce contexte, il apparaît donc nécessaire de caractériser le ou les épitopes spécifiques d'E.granulosus présent sur la protéine de fusion. Ceci implique d'entreprendre l'analyse épitopique de PF6. Pour ce faire, et au vu des résultats précédents, l'utilisation de peptides de synthèse semble la technique la mieux adaptée. La taille relativement faible du polypeptide cloné constitue, pour ce type d'analyse, un avantage non négligeable. Cette stratégie peptidique apparaît, pour le cas considéré, particulièrement intéressante pour définir la structure moléculaire de l'épitope réagissant avec l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 et avec les sérums de patients hydatiques, d'autant que nous disposons d'un outil supplémentaire d'investigation qui pourrait constituer un atout important dans la caractérisation de cet épitope.

En effet, un second criblage réalisé sur une partie amplifiée de la banque initiale a permis d'identifier un nouveau clone recombinant (Eg14) à l'aide d'un mélange de sérums de patients hydatiques. La protéine de fusion correspondante (PF14) est apparue posséder les mêmes propriétés antigéniques que PF6 vis à vis de l'anticorps monoclonal EG 02 154/12. La détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN a mis en évidence un insert de 137 pb. Un cadre de lecture a été trouvé en phase avec le vecteur phagique, ouvert sur 111 pb. La séquence peptidique correspondante se compose de 37 acides aminés et est présentée page 98. Ce polypeptide de très petite taille (4,3 kDa) constitue un élément nouveau exploitable dans le cadre d'une recherche épitopique. L'intérêt réside dans la possibilité de pouvoir rechercher au sein des deux chaînes peptidiques (PF6 et PF14) une homologie moléculaire pouvant posséder des propriétés antigéniques. Une comparaison linéaire des deux polypeptides a permis de définir une partie partiellement commune aux deux séquences d'acides aminés (cf page 98). Cette portion de la protéine de fusion PF6 a été définie par analyse du profil d'hydrophilicité comme une zone potentiellement antigénique. Elle correspond aux sections E, D et F présentées sur la figure 15. A partir de cette analyse préliminaire, l'étude épitopique de PF6 se trouve facilitée. Mais, il ne faut cependant pas exclure la possibilité d'un phénomène conformationnel dans la reconnaissance antigénique. D'après les résultats de Chamekh et al.-1990, l'identification de l'antigène 5 par l'anticorps monoclonal semble être lié à la présence de ponts disulfure sur la molécule. D'autre part, la structure même des deux polypeptides clonés (majoritairement  $\alpha$ -hélicoidale dans les deux cas), nous incite à ne pas négliger cette éventualité. L'épitope peut se définir sur les deux molécules recombinantes de manière conformationnelle plutôt que linéaire. Une analyse informatique plus poussée pourrait faciliter la comparaison des

FIGURE 21 : Séquences protéiques déduites de l'ADN des clones Eg6 et Eg14 et comparaison linéaire. Les identités sont encadrées. L'\* indique une identité par groupe d'acides aminés (HKR), (LIVM), (AGST), (YFM), (DEGN), (P) et (C).

```

Eg6   E F V D I N I A S K V A D A F Q K N K E
Eg6   K I T T T D K L G T A L E Q V A S Q S E
Eg6   K A A P Q L S K M L T E A S D V H Q R M
Eg6   A T A R K N F N S E V N T T F I E D L K
Eg6   N F L N T T L S E A Q K A K T K L E E V
Eg14  E F I R K Y D K G N K G K I N L E E L
Eg6   R L D L D S D K T K L K N A K T A E Q K
Eg14  T A M L D S V H R K T S R A S M S R
Eg6   A K W E A E V R K D E S D F D R V H Q E
Eg6   S L T I F E K T C K E F

```

deux antigènes et limiter ainsi l'étude épitopique à la synthèse de quelques peptides, définis par ce procédé, comme potentiellement antigéniques. L'analyse peptidique de la protéine de fusion PF6 bénéficie d'un avantage considérable en la connaissance de la séquence peptidique de la protéine de fusion PF14. L'orientation du travail s'effectuera de manière à déterminer les caractéristiques antigéniques des différents peptides et d'en évaluer les possibles applications diagnostiques.

Mais il ne faut pas non plus écarter l'aspect fondamental. Bien que très étudié, la nature et le rôle biologique de l'antigène 5 chez Echinococcus n'ont toujours pas été définis. Une recherche du gène complet à l'aide de l'insert du clone Eg6 faciliterait la caractérisation biochimique et biologique de la molécule. La connaissance du rôle fonctionnel de l'antigène 5 chez la larve pourrait alors déboucher sur de nouvelles stratégies, tant dans le domaine thérapeutique que vaccinal. En effet, les propriétés immunogéniques de l'antigène 5 le définissent, parmi les antigènes hydatiques, comme la cible majeure du système immunitaire, dont les potentialités protectrices doivent être évaluées. Une étude pourrait être envisagée, par des tests d'immunisation, dans un premier temps, à l'aide de la protéine clonée. L'analyse du rôle biologique et immunologique de l'antigène par le biais d'une étude à l'aide de la molécule clonée pourrait s'avérer particulièrement intéressante, tant du point de vue strictement fondamental, que du domaine de la recherche appliquée.

La caractérisation de clones recombinants synthétisant des antigènes échinococciques constitue la base d'une nouvelle étude dont le développement ouvrira de nouvelles voies d'investigation. L'identification de l'épitope reconnu à la fois par des sérums humains d'infection et par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12, identifié sur la protéine de fusion

PF6, représente assurément un des éléments primordiaux du développement des techniques d'immunodiagnostic de l'hydatidose. Les conséquences et les applications de ce travail concernent tout à la fois les domaines diagnostiques et thérapeutiques. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que la participation de ce travail aux recherches menées sur l'hydatidose possède, en dehors du contexte médical lui-même très étendu, des implications vétérinaires dont l'impact économique s'avère considérable.

## **MATERIEL ET METHODES**

## I - MATERIEL BIOLOGIQUE

### A - PREPARATION DES ANTIGENES PARASITAIRES

Les kystes hydatiques sont prélevés en abattoir chez le mouton (poumon ou foie). Le liquide hydatique est ponctionné aseptiquement. Les fractions sont groupées puis centrifugées à 40000g pendant 1 heure. Le surnageant est repris puis dialysé contre 100 fois son volume d'eau distillée, pendant 48 heures. Après lyophilisation, il est utilisé comme source d'antigènes.

Les protoscolex sont préparés par décantation du liquide hydatique fraîchement ponctionné. Le culot de sédimentation est repris, lavé plusieurs fois avec du liquide physiologique. Les scolex sont à chaque fois récupérés après sédimentation. Ils sont ensuite directement congelés en azote liquide dans un volume minimal.

### B - SOURCES D'ANTICORPS

#### 1 - LES SERUMS HUMAINS

Les sérums humains proviennent majoritairement du service de diagnostic de l'Institut Pasteur de Lille. Ils ont été soumis aux tests classiques de détection de l'échinococcose, l'immunoélectrophorèse en double diffusion (IEP) et l'hémagglutination. Ils sont caractérisés vis à vis d'Echinococcus granulosus et d'E.multilocularis. La présence de l'arc 5 est déterminante pour le diagnostic.

Des sérums provenant du Niger ont été fournis par le Dr Audoin (Médecine militaire, Niamey - Niger).

Les sérums d'infection à Taenia saginata ont été donnés par l'infirmerie de l'hôpital militaire de Lille.

## 2 - ANTICORPS MONOCLONAL EG 02 154/12

La préparation des hybrides et des anticorps dirigés contre les antigènes hydatiques est réalisée selon un protocole décrit par Chamekh et al. - 1990. Les anticorps monoclonaux EG 02 154/12, spécifiques de l'antigène 5 ont été préparés et gracieusement fournis par M. Chamekh.

## II - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES PROTEINES

### A - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SODIUM DODECYL SULFATE (SDS-PAGE).

L'électrophorèse est réalisée selon les conditions décrites par Laemmli - 1970. Des gels de 1,5 mm d'épaisseur sont utilisés. Les molécules sont séparées en gel de 7,5% ou de 13% selon le type d'analyse (acrylamide 13%, bisacrylamide 0,35%, Tris-HCl 375mM pH8,8, SDS 0,1%), après une concentration en gel de 3% ou 5% (acrylamide 5%, bisacrylamide 0,13%, Tris-HCl 125mM pH6,8, SDS 0,1%). Les échantillons sont préparés en tampon Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, saccharose 10%, bleu de bromophénol 0,005%, avec ajout de 5% de 2-mercaptoéthanol quand l'analyse doit être réalisée en conditions réductrices. Les témoins de masse moléculaire (BRL) sont analysés dans les mêmes conditions. Le tampon d'électrode se constitue de Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1%, glycine 0,19 M, pendant environ 16 heures à 7 mA.

Les gels peuvent être colorés par une solution de méthanol-acide acétique (50%-10%) à laquelle on ajoute du bleu de Coomassie (0,085%). La coloration s'effectue à température ambiante, sous agitation, pendant une

durée d'environ 2 heures. Ils sont ensuite plongés dans une solution de décoloration (méthanol-acide acétique, 20%-8%) jusqu'à une visualisation nette des protéines colorées.

Pour obtenir une autoradiographie, les gels sont séchés sous vide (sécheur LKB) puis mis en contact avec un film autoradiographique Kodak X-Omat AR ou Bêta Max (Eastman Kodak Co, USA) avec ou sans écran renforçateur selon le type de rayonnement (Lightning Plus - Dupont de Nemours, France) et déposés à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## B - IMMUNOPRECIPITATION

L'immunoprécipitation est réalisée selon la technique décrite par Dissous et al.-1981. Les antigènes sont placés en tampon d'adsorption TNEN (Tris-HCl 10mM-pH7,4, NaCl 150mM, EDTA 2mM, Nonidet P40 0,1%) lorsqu'il s'agit de produits de traduction. Il faut compter 200 à 500000 cpm de produits de traduction marqués à la méthionine  $^{35}\text{S}$  par test. L'immunsérum est ajouté à chaque préparation (environ 20 $\mu\text{l}$ ) puis l'ensemble est incubé à  $4^{\circ}\text{C}$  durant 18 heures, sous agitation constante. Une quantité équivalente à 10mg (poids sec) de protéine A-sépharose (CL 4B, Pharmacia, Suède) est ajoutée à chaque échantillon, après équilibration dans le même tampon. Les tubes sont placés sous agitation durant 2 heures à température ambiante. Dix lavages sont ensuite effectués en tampon d'adsorption. Le dernier lavage est réalisé en tampon Tris-HCl 5mM-pH7,4, NaCl 150mM. Les complexes immuns sont élués par 40 $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 62,5mM-pH6,8, SDS 3%, saccharose 10%, à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 3 minutes puis déposés sur gel de polyacrylamide-SDS.

C - TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE SUR FEUILLE DE NITROCELLULOSE ("WESTERN BLOTTING") ET REVELATION A L'AIDE D'ANTICORPS MARQUES ("IMMUNOBLOTTING").

Les conditions expérimentales du transfert électrophorétique sont décrites par Towbin et al.-1979. Les protéines sont tout d'abord séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Celui-ci est mis en contact avec une feuille de nitrocellulose humidifiée en tampon de transfert (Tris-Base 20mM, glycine 150mM, méthanol 20%). L'ensemble est placé entre deux feuilles de papier Whatman n°3 et deux épaisseurs de scochtbrite également équilibrées en tampon. Le transfert est réalisé à 250mA durant 4 heures à 4°C. La détection des antigènes par des anticorps marqués par la peroxydase est effectuée selon la technique décrite par Tsang et al.-1983. La feuille de nitrocellulose est saturée en PBS-lait 3%. Elle est ensuite découpée puis incubée avec les immunosérums à tester en PBS-lait 1%, 2 heures à température ambiante ou 18 heures à 4°C, sous agitation. Les sérums humains sont dilués au 1/100 et une quantité équivalente à 10µg d'immunoglobulines purifiées est nécessaire par test pour l'anticorps monoclonal anti-antigène 5 EG 02 154/12. Deux lavages sont effectués en PBS-Tween 20 0,01%, puis deux autres en PBS, durant 10 minutes à la température de la pièce et sous agitation. Les seconds anticorps marqués à la peroxydase sont incubés avec la nitrocellulose : des anti-Ig humaines (G, A, M) pour les sérums de patients testés et des anti-IgG murines pour l'anticorps monoclonal (Diagnostics Pasteur, France). Trois lavages en PBS sont effectués. Les complexes immuns formés sont ensuite révélés par incubation avec une solution contenant le substrat : 4-chloro-1-naphtol 0,06% (P/V), méthanol (17%), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%,

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10mM, NaCl 150mM. La révélation est poursuivie jusqu'à complète apparition des bandes puis stoppée par immersion dans de l'eau.

#### D - SELECTION D'ANTICORPS SUR CLONE RECOMBINANT EXPRIMANT UNE PROTEINE DE FUSION.

Pour isoler les anticorps dirigés contre la protéine de fusion, une culture sur boîte du clone phagique recombinant est effectuée, à confluence des plages de lyse. La production de la protéine est induite par dépôt de filtres de nitrocellulose (Schleicher and Schuell) imbibés d'IPTG 10mM (IsoPropyl-β-D-ThioGalactopyranoside). L'expression est poursuivie à 37°C pendant 18 Heures (cf protocole détaillé : Préparation de la protéine de fusion). Les filtres sont retirés puis saturés en PBS-lait 3%. Ils sont ensuite incubés avec l'immunsérum à dilution voulue (environ 50μl par filtre) en PBS-Tween 20 0,01%, 18h à 4°C ou 2h à température ambiante. Après lavages (2 lavages PBS-Tween 20 0,01% - 2 lavages PBS), 3 à 4ml par filtre d'une solution de KSCN 3,5M sont ajoutés. L'ensemble est agité vivement pendant 10 secondes. Après adjonction de sérum albumine bovine (SAB) 0,1%, NaCl 20mM, Tris base 25mM-pH8,3, le liquide repris est dialysé contre du TBSx1 (TBS : NaCl 100mM, Tris base 50mM-pH8,3) pendant 48 heures à 4°C. Le dialysat est ensuite concentré 2x par aquacyde à 4°C.

### III - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

#### A - SOUCHES ET VECTEURS

##### 1 - Répertoires des souches bactériennes utilisées

Les colonies bactériennes utilisées pour le clonage sont différentes souches modifiées d'Escherichia coli. Leurs noms et caractéristiques sont répertoriés dans le tableau suivant. Les souches Y1089 et Y1090 (Young & Davies-1983b) ont été fournies par Amersham International (England). La souche TG1 a été gracieusement offerte par le laboratoire du Dr Stehelin (Institut Pasteur Lille).

##### 2 - Répertoire des vecteurs utilisés

Deux types de vecteurs ont été utilisés. Un vecteur d'expression, le phage lambda gt11 (Young & Davies-1983a) et un vecteur de clonage, le phage M13 (Messing - 1983, Messing et al.-1977). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau suivant. Ils ont été fournis par Amersham International (England).

#### B - EXTRACTION D'ARN

La méthode utilisée est une modification de celle décrite par Chirgwin et al.-1979. Les préparations de protoscolex d'E.granulosus stockées en azote liquide sont broyées manuellement avant d'être reprises dans une solution de thiocyanate de guanidium 4,2M, N-lauroyl sarcosine 2%, EDTA pH8-10mM, 2-mercapto-éthanol 5% et acétate de sodium pH4,5-20mM. Cette

FIGURE 22 : Répertoire des souches bactériennes et des vecteurs phagiques utilisés.

Souches bactériennes	Génotype	Réceptrices des vecteurs phagiques
Y1089 (r-) ATCC n°37196	<i>E.coli</i> $\Delta$ lac U169 proA+ $\Delta$ lon ara D139 strA hf1A150 (chr::Tn10) (pMc9)	lambda gt11 Lac5 (shindIII 2-3) srl $\lambda$ 3° cI857 srl $\lambda$ 4° nin5 srl $\lambda$ 5° Sam100
Y1090 (r-) ATCC n°37197	<i>E.coli</i> $\Delta$ lac U169 proA+ $\Delta$ lon ara D139 strA supF (trpC22:: Tn10) (pMC9).	lambda gt11
TG1	<i>E.coli</i> K12 lacpro supE thi hsd D5/F' tra D36 proA+B+ lacIq lacZ M15	M13 lacZ Amp+ pMB1+

préparation est homogénéisée par mixage à l'ultraturrax avant d'être soumise aux ultrasons et centrifugée à 10000rpm durant 20 minutes (Sorvall - rotor HB-4). Le surnageant est ensuite déposé sur un coussin de 2ml d'une solution de chlorure de césium (CsCl  $d=1,72$ , EDTA pH8-10mM, acétate de sodium pH5,5-50mM) en tube de polypropylène de 15ml. La centrifugation a lieu durant 20 heures à 20°C, à 28000rpm en rotor SW41 (ultracentrifugeuse Beckman). Le culot d'ARN est repris dans de l'eau puis précipité à l'éthanol absolu à -20°C.

#### C - TRADUCTION IN VITRO

La traduction in vitro s'effectue en extrait de germes de blé selon la méthode décrite par Marcu & Dudock-1974, en utilisant un système commercialisé par BRL (Bethesda Research Laboratories - Gaithersburg). Les réactions sont réalisées dans une solution d'extrait de germes de blé à 50% contenant 35 $\mu$ M d'acides aminés (sans méthionine). L'acétate de potassium et l'acétate de magnésium sont ajoutés jusqu'à des concentrations finales respectives de 158mM et 0,9mM. La méthionine marquée au soufre 35 est additionnée au milieu (1mCi/ml final) ainsi que l'ARN à traduire (130 - 160 ng/ $\mu$ l final, conditions optimales). L'ensemble est incubé 1 heure à 25°C. Des contrôles (échantillon sans ARN - échantillon avec ARN témoin du virus de la mosaïque du tabac) sont réalisés en même temps, dans les mêmes conditions.

#### D - SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE (ADNc)

Le protocole et les réactifs proviennent du kit "cDNA synthesis system" d'Amersham International. La technique initiale a été décrite par Gubler & Hoffman-1983.

SYNTHESE DU PREMIER BRIN : une quantité égale à 300 $\mu$ g d'ARN total de protoscolex d'E.granulosus a été utilisé pour l'expérience. A celui-ci, ont été ajoutés l'amorce oligo-dT, les nucléotides froids (10 nmoles), l'enzyme transcriptase reverse (20 U/ $\mu$ g d'ARN polyA+, ici évalué à environ 5 $\mu$ g soit 1 à 2% de l'ARN total), ainsi qu'un nucléotide marqué au phosphore 32 ( $\alpha$  -  $^{32}$ P dCTP - 20 $\mu$ Ci) afin de suivre la réaction. L'ensemble est placé dans les conditions de tampon optimales pour le fonctionnement de l'enzyme. Le mélange est placé 1h à 42°C.

SYNTHESE DU SECOND BRIN : Les enzymes ribonucléase H (0,8U/ $\mu$ g d'ARN poly A+) et ADN polymérase I (23 U/ $\mu$ g d'ARN polyA+) sont additionnées à la préparation précédente, dans de nouvelles conditions de tampon. Une valeur de 20 $\mu$ Ci d' $\alpha$  -  $^{32}$ PdCTP est à nouveau ajoutée à l'ensemble. Le nouveau mélange est incubé 1h à 12°C. Les enzymes sont inhibées par chauffage à 70°C pendant 10 minutes. L'ADN polymérase T4 est amenée à raison de 2 U/ $\mu$ g d'ARN polyA+ initial. Après une incubation de 10 minutes à 37°C, la réaction est stoppée par l'EDTA 25mM-pH8 final et le SDS (1% final). L'ADNc est purifié par extraction au phénol-chloroforme, puis précipité à l'éthanol absolu. Une part aliquote de la préparation est prélevée à la fin de chaque réaction de synthèse afin d'évaluer le taux d'incorporation grâce aux nucléotides marqués et d'en déduire le rendement et la quantité d'ADNc synthétisé.

#### E - CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNc EN VECTEUR D'EXPRESSION $\lambda$ GT11

La technique utilisée ici (Huynh et al.-1985) permet le clonage de l'ADNc dans le site EcoRI du vecteur phagique lambda gt11 ( $\lambda$ gt11). Elle nécessite pour cela, dans un premier temps, la protection des sites internes de l'ADNc. Par la suite, des polylinkers de synthèse, comportant le site de restriction choisi pour l'insertion sont collés aux extrémités

franches de l'ADNc à l'aide d'une ligase. L'EcoRI agit ensuite afin de libérer les extrémités cohésives des adaptateurs. L'excès de linkers est éliminé afin de ne pas gêner l'intégration de l'ADNc dans les bras du phage  $\lambda$ gt11, préalablement coupé par la même enzyme de restriction.

Le site d'insertion EcoRI du phage lambda gt11 est localisé à l'intérieur du gène lacZ, 53 pb avant le codon de terminaison. Cette situation permet à l'ADN étranger intégré dans ce site d'être exprimé sous forme d'une protéine de fusion avec la  $\beta$ -galactosidase, produit du gène lacZ. Le contrôle de l'expression est sous la direction du gène bactérien lacI. Le produit de ce gène constitue un répresseur du lacZ et peut être inhibé par simple ajout d'IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-galactopyranoside). L'expression de la protéine de fusion peut donc être induite à volonté. Cette localisation permet aussi de pouvoir différencier rapidement les individus recombinants ou parentaux. Utilisé chez une souche-hôte déficiente en expression de la  $\beta$ -galactosidase ( $\Delta$ lac U169), les phages de type parental possèdent un gène lacZ intact qui produira une protéine fonctionnellement normale. Celle-ci mise en présence de son substrat chromogénique X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside), le décomposera en un composé bleuté caractéristique. Par contre, les phages ayant incorporé un ADN étranger produisent une  $\beta$ -galactosidase non fonctionnelle incapable de dégrader le substrat. La plage de lyse apparaît alors incolore permettant ainsi la reconnaissance des recombinants.

Les enzymes de modification, les polylinkers, les souches bactériennes et les réactifs proviennent du kit "cDNA cloning system,  $\lambda$ gt11" d'Amersham International. L'enzyme de restriction EcoRI provient des laboratoires Appligene. Le vecteur  $\lambda$ gt11 ainsi que le système d'encapsulation du phage

sont fournis par Promega Biotec ("Proclone TM.GT system" et "Packagene in vitro packaging system"). Le protocole suivi est décrit par Amersham International (England).

#### 1 - Intégration dans le vecteur phagique.

##### Méthylation des sites EcoRI de l'ADNc :

L'ADNc double brin est repris dans l'eau puis mis dans des conditions de tampon optimales pour l'enzyme EcoRI méthylase. Celle-ci est ajoutée à la préparation à raison de 20 U/ $\mu$ g d'ADNc. Le tube est incubé au bain-marie durant 1 heure à 37°C. La réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 10 minutes.

##### Ajout des hexanucléotides :

Les hexanucléotides de synthèse utilisés sont déphosphorylés et intègrent le site de restriction EcoRI. Leur séquence est la suivante : 5'-GGAATTC-3'. La T4-ADN ligase permet leur attachement aux extrémités franches de l'ADNc. Après l'arrêt de la réaction de méthylation, les hexanucléotides sont ajoutés à la préparation précédente (1  $\mu$ g/ $\mu$ g d'ADNc synthétisé). Après avoir ajusté les conditions de tampon (cf Milieux et tampons - appendice ), l'enzyme est incorporée au milieu à raison de 5 U/ $\mu$ g d'ADNc. L'ensemble est maintenu à 15°C pendant toute la nuit. L'enzyme est inhibée par chauffage à 70°C pendant 10 minutes.

##### Digestion Eco RI :

La préparation précédente est soumise à une digestion par l'enzyme de restriction EcoRI. Les conditions de tampon sont optimisées (cf Milieux et tampons - appendice ). 100 U d'enzyme sont apportées au milieu, par  $\mu$ g

d'ADNc. L'incubation a lieu durant 5 heures, à 37°C. La réaction est stoppée par chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Les acides nucléiques sont ensuite précipités par de l'éthanol absolu, avec adjonction de sels d'ammonium acétate 5M (0.4 V), à -20°C pendant 2 heures.

#### Elimination de l'excès d'adaptateurs :

L'ADNc est repris dans 100 µl d'eau. Dans le même temps, la colonne (ACA 34 Ultrogel) est rincée et équilibrée en tampon STE (NaCl 10mM, Tris 20mM-pH7,4, EDTA 0,1mM). L'échantillon est passé sur la colonne. L'éluat est récupéré sous forme de fractions de 100 µl. Chacune d'entre elles est analysée au compteur de radioactivité (comptage par effet Cerenkov). La présence de l'ADNc est détectée par un pic de cpm, situé dans les premières fractions. Les deux fractions possédant les taux les plus élevés sont réunies puis l'ADNc est précipité par 2,5V d'éthanol absolu, 0,4V d'acétate d'ammonium 5M, à -20°C pendant au moins 2 heures. Afin de visualiser l'ADNc dans les fractions et de contrôler la taille des fragments, une partie aliquote de chacune d'elles (1 à 5µl) est prélevée puis analysée par électrophorèse en gel d'agarose 1,4% en tampon TBE. Après migration, le gel est mis en contact avec un film autoradiographique durant une nuit à -20°C.

#### Réaction de ligation avec le phage :

L'ADNc est repris dans un petit volume d'eau. Les bras du phage λgt11 coupés par EcoRI et déphosphorylés sont ajoutés à raison de 1 µg pour 500ng d'ADNc environ. Les conditions de tampon (cf Milieux et tampons - appendice) sont optimisées pour l'enzyme T4-ADN ligase dont 1 U est

incorporée au milieu. Le tube est placé à 4°C toute la nuit. La réaction est arrêtée par précipitation éthanolique en présence de sels d'acétate d'ammonium SM (0,4V), à -20°C pendant 2 à 3 heures.

#### Réaction d'encapsidation :

Le protocole suivi est celui donné par le fournisseur (Promega Biotec, USA). L'ADN du phage est repris dans un volume minimal, auquel on ajoute l'extrait de protéines d'encapsidation. L'ensemble est incubé à 22°C pendant 2 heures. Le milieu est ensuite dilué par l'ajout de 500 µl de solution SM (cf Milieux et tampons - appendice ).

#### 2 - Titre de la banque.

Les bactéries-hôtes Y1090 sont sensibilisées afin de faciliter le développement phagique. Une colonie bactérienne est mise en culture à 37°C en milieu LB (cf Milieux et tampons - appendice ) contenant 50 µg/ml d'ampicilline, jusqu'à une densité optique (D.O.) de 0,7 (600 nm). Après centrifugation douce, les cellules sont reprises dans une solution de magnésium à 0,01M puis incubées de nouveau à 37°C pendant une heure.

Pour titrer la banque, différentes dilutions de la préparation phagique sont réalisées en tampon SM. Les cellules Y 1090 rendues compétentes sont ajoutées à chacune des préparations. Une solution d'agarose molle est préparée en milieu LB contenant 0,8% d'agar, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> , 3µl/ml de X-gal 10%, 3µl d'IPTG 100mM, chauffée et maintenue à 55°C. Chaque dilution de phages est diluée dans 2,5 ml d'agarose molle puis déposée sur boîte de Pétri sur milieu LB gélosé (15 mg/ml, contenant 35-50 µg/ml d'ampicilline). Les cultures sont incubées à 37°C durant toute la nuit. Utilisant les caractéristiques du phage λgt11 (cf III - E - Construction d'une banque d'ADNc), le pourcentage d'individus recombinants

est évalué selon le nombre de plages blanches présentes. Le taux de recombinaison est calculé d'après le rapport : nombre de colonies bleues non recombinantes / nombre de colonies blanches recombinantes.

#### F - CRIBLAGE DE LA BANQUE ET SELECTION DES RECOMBINANTS.

Les bactéries Y1090 rendues compétentes sont utilisées pour le criblage de la banque à raison de 8 à 10000 phages par boîte de Pétri de 90 mm de diamètre. Les phages sont tout d'abord dilués en solution SM et mis en contact avec les bactéries durant 20 minutes, puis incorporés à 2,5 ml d'une solution d'agarose molle en milieu LB (0,8% d'agarose molle,  $MgCl_2$  100mM). La préparation est étalée sur milieu LB gélosé. Les boîtes de Pétri sont incubées 2 heures à 42°C. Un filtre de nitrocellulose (Schleicher & Schuell) imprégnés d'IPTG 10mM est déposé sur les cultures qui sont ensuite replacées en étuve à 37°C pour quelques heures. Après avoir repéré la position des filtres sur les boîtes, ceux-ci sont enlevés puis saturés par immersion dans un bain de PBS-lait 3%. Les sérums humains dilués au 1/100 en PBS-lait 1% sont incubés avec les filtres à 4°C durant toute une nuit. Un lavage est effectué en PBS-Tween 20 0,01%, suivi par 3 autres lavages en PBS. Les anticorps fixés sont détectés par un second anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués par la peroxydase (Pasteur Productions - 1/500), révélé à l'aide du réactif 4-chloro-1-naphtol (Biorad). Grâce aux marques faites sur le filtre et la boîte de Pétri correspondante, l'identification des clones est possible et permet un isolement et une purification des clones recombinants.

## G - CONSTRUCTION LYSOGENIQUE ET PREPARATION DE LA PROTEINE DE FUSION.

### 1 - Construction de colonies lysogènes recombinantes.

Les bactéries de la souche Y1089 sont cultivées en milieu LB en présence d'ampicilline (50 µg/ml) jusqu'à une densité optique de 0,7 (600nm). Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 1/3 de volume d'une solution de MgSO<sub>4</sub> 10 mM et incubées une heure à 37°C. Les cellules bactériennes ainsi préparées sont mises en contact avec les phages recombinants dans un rapport de 5/1 (phages/bactéries), en milieu LB, MgCl<sub>2</sub> 10 mM. L'ensemble est étalé sur milieu LB gélosé de manière à obtenir des colonies isolées. Celles-ci seront ensuite repiquées en double, sur deux boîtes différentes, l'une étant incubée à 42°C, l'autre à 32°C. Les clones se développant à 32°C mais pas à 42°C sont les colonies lysogènes recombinantes.

### 2 - Expression et préparation de la protéine recombinante.

Une colonie lysogène recombinante est mise en culture en milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline jusqu'à une D.O. de 0,5 à 600 nm. La température est alors brutalement élevée à 42-45°C et maintenue pendant 20 minutes. La culture est ensuite incubée à 37°C pendant 20 à 30 minutes, après addition d'IPTG jusqu'à une concentration finale de 10mM. Une centrifugation douce permettra de récupérer les cellules bactériennes, celle-ci sera effectuée entre 24-37°C afin de minimiser les chocs et de limiter la lyse. Le culot est repris dans 1/50 du volume initial en Tris 10mM pH8, NaCl 0,9%, Aprotinine 20U/ml puis rapidement congelé en azote liquide. Après traitement par les ultrasons, l'extrait est ajusté en tampon d'échantillon deux fois concentré avant analyse électrophorétique.

## H - PREPARATION DE L'ADN PHAGIQUE.

### 1 - Préparation de l'ADN phagique total.

Une culture liquide de la souche Y1090 est réalisée sur la nuit à 37°C en milieu LB, MgCl<sub>2</sub> 10mM. Après dilution au 1/1000, les phages sont inoculés à raison d'une plaque de lyse / 4-5ml de la solution bactérienne diluée. L'incubation est réalisée à 37°C, sous vive agitation constante et dans de bonnes conditions d'aération. Au bout de 6 à 7 heures, on ajoute quelques gouttes de chloroforme puis on soumet au vortex. Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 5000 rpm (Sorval). La DNase I est ajoutée au surnageant (5 µg/ml de culture) et l'ensemble est incubé 1 heure à 37°C. Un volume identique de PEG 20%, NaCl 2,5M est ajouté et les tubes sont maintenus à 0°C pendant au moins 30 minutes. Une centrifugation de 10 minutes à 5000 rpm (Sorvall - HB4) permet de récupérer les phages en culot, qui sont repris en tampon TE, SDS 0,1% (cf Milieux et tampons - appendice ). Le même volume de phénol-chloroforme (1/1) est ajouté. Le mélange est soumis au vortex pendant 5 minutes puis centrifugé à température ambiante pendant 10 minutes en microcentrifugeuse (10000rpm). Plusieurs extractions par le phénol-chloroforme sont réalisées. Au dernier surnageant récupéré sont ajoutés 2,5V d'éthanol pur et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M pH7. L'ADN sera précipité de cette manière deux fois puis repris en 50 µl de TE. Une incubation avec de la RNase A (1 µg/µl) sera réalisée en même temps que la digestion par EcoRI afin d'éliminer l'ARN bactérien restant.

## 2 - Préparations d'inserts.

Une digestion est effectuée par l'enzyme de restriction EcoRI (Boehringer, RFA) à raison de 10 U/ $\mu$ g d'ADN. La réaction est stoppée par addition d'EDTA pH7,5 jusqu'à une concentration finale de 10mM et ajusté en tampon d'échantillon (TBEx1, sucrose 4%, bleu de bromophénol 0,025%). L'électrophorèse est réalisée en tampon TBE (cf Milieux et tampons - appendice ), en gel d'agarose à faible point de fusion (agarose "low melting point", BRL, USA). L'ADN est visualisé grâce au bromure d'éthidium (BET) ajouté dans le gel (0,5  $\mu$ g/ml). Le fragment d'ADN correspondant à l'insert est extrait par découpe puis immergé en TE pH8. Le tube est placé à 60°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose. Une première extraction est réalisée au phénol chaud saturé en Tris 0,1M-pH8, une autre au phénol à 20°C saturé en Tris 0,1M pH8, puis une nouvelle au phénol-chloroforme (1/1). Le BET est éliminé par une extraction au N-butanol saturé en eau. L'ADN est précipité par de l'éthanol absolu, en présence de 1/10 V d'acétate de sodium 3M pH7. une partie aliquote est analysée par électrophorèse en gel d'agarose.

## I - REACTIONS D'HYBRIDATION

### 1 - Préparation de la sonde.

Une sonde est préparée à partir de l'ADN de l'insert extrait du clone recombinant M13, préalablement amplifié et purifié. Le marquage est réalisé à l'aide de  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP (111 TBq/mmol - Amersham International, USA). La technique utilisée est basée sur l'utilisation d'hexamères de synthèse comme initiateur de la réaction de marquage ("hexamer random priming"), Feinberg & Vogelstein - 1983. La réaction s'effectue à température ambiante pendant au moins trois heures, à partir d'une

quantité équivalente à au moins 25 ng d'ADN purifié et préalablement dénaturé par la chaleur (2 minutes à 100°C). Les nucléotides marqués sont ajoutés à raison de 1,85.10<sup>6</sup> Bq, ainsi que 2U d'enzyme, fragment Klenow de l'ADN polymérase. Une précipitation à l'éthanol est ensuite effectuée à -70°C pendant 20 minutes. Afin d'éliminer les nucléotides libres marqués, après précipitation éthanolique, le tube est réchauffé à 37°C puis centrifugé. Le surnageant contenant les nucléotides marqués est éliminé et le culot est lavé deux fois, par l'éthanol 70% et 90%. Après séchage, l'ADN est repris dans un petit volume de TE pH8 et est directement utilisé comme sonde.

## 2 - Préparation des échantillons.

Deux types de préparation d'ADN sont réalisées pour l'analyse par hybridation.

- "DNA dot blot" : les différents ADN à tester sont déposés sur la même feuille de nitrocellulose sous forme de goutte. L'ADN est préparé en TE pH8 puis dénaturé par chauffage (95°C - 5minutes). Une quantité équivalente à 1-2 µg est prélevée et mise en conditions de tampon 20x SSC. (Milieux et tampons - appendice ). Les différents échantillons sont déposés sur la feuille de nitrocellulose qui est ensuite placée entre deux morceaux de papier Whatman 3MM. L'ensemble est placé en étuve sous vide à 80°C pendant 2 heures. Le filtre est ensuite directement utilisable pour la réaction d'hybridation.

- "Colony blot" ( Mason & Williams- 1985) : les différents phages recombinants à tester sont cultivés sur la même boîte de Pétri en individualisant chacun des clones sous la forme d'une goutte d'agar molle (50 µl en milieu LB, MgSO<sub>4</sub> 10mM, 3µl/ml d'IPTG 100mM) sur laquelle se développent les différents représentants du même clone. Après culture à

42°C jusqu'à semi-confluence une empreinte est réalisée à l'aide d'un filtre de nitrocellulose. Celui-ci est placé sur une feuille de papier Whatman 3MM saturée par une solution de dénaturation (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M), puis transféré successivement en un bain de neutralisation (NaCl 1,5M, Tris 1M pH7,5) et sur une feuille de Whatman saturée en 4x SET (SET x20 : NaCl 3M, EDTA 20mM, Tris 0,4M pH7,8). Après séchage, la nitrocellulose est placée entre deux morceaux de Whatman 3MM puis déposés en étuve sous vide à 80°C pendant 2 heures. Comme précédemment, il est ensuite directement utilisé pour les tests d'hybridation.

### 3 - Réaction d'hybridation.

La sonde radiomarquée est reprise en tampon d'hybridation-N (5ml) (cf Milieux et tampons - appendice ), contenant 1 mg/ml d'ADN de sperme de hareng, à raison de 10 - 50 millions de cpm par essai. Après dénaturation à 100°C pendant 5 minutes, le tube est placé dans de la glace jusqu'à utilisation. L'hybridation est réalisée à 42°C sur la nuit. Les filtres sont rincés dans un grand volume d'une solution de 2x SSC, 0,1% SDS à température ambiante (SSC : cf milieux et tampons - appendice). Trois lavages de 20 minutes sont ensuite réalisés à la température de la pièce à l'aide du même tampon. Deux autres lavages sont effectués à 65°C, de 30 minutes chacun, grâce à une solution de 0,1xSSC, 0,1% SDS. Les filtres sont séchés puis mis en exposition, à -70°C, avec un film Kodak XAR-5 avec écran (Dupont de Nemours, France).

## J - SOUS-CLONAGE EN VECTEUR M13 ET SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE.

Le vecteur M13 (Messing et al.-1977) est un bactériophage à ADN circulaire et filamenteux de 7,2kb. Il infecte essentiellement les bactéries E.coli mâles (F'). Après entrée dans la bactérie, l'ADN simple brin est converti en une forme répllicative double brin qui donnera naissance à de nouvelles particules simple brin. Après encapsidation, celles-ci seront excrétées hors de la bactérie sans qu'il y ait phénomène de lyse. Un grand nombre de vecteurs de clonage existent (Messing-1983), issus du M13 sauvage, et possédant des sites de restriction regroupés en une séquence "polylinker" située à la fin du gène lac Z. La sélection des recombinants se fait de la même manière que pour le  $\lambda$ gt11 : l'insertion en un site de restriction du "polylinker" amène l'expression d'une  $\beta$ -galactosidase inactive, incapable de réagir avec son substrat. A l'inverse, les individus non recombinants posséderont un phénotype gal+ qui se traduira par une dégradation du X-gal et une coloration bleue. L'ADN à cloner est intégré en un site de restriction du polylinker de la forme répllicative double brin ; une orientation est possible selon le vecteur utilisé. La préparation de matrices simple brin est utilisée pour la réaction de Sanger et al.-1977 (terminaison des chaînes par des didéoxy-nucléotides) pour la détermination des séquences nucléotidiques.

### 1 - Sous-clonage dans le vecteur M13

Cette étape nécessite une préparation des cellules bactériennes TG1. Une préculture de la souche TG1 est réalisée sur la nuit, à 37°C, en milieu 2TY. Après dilution au 1/100 dans le même milieu, une nouvelle incubation est faite jusqu'à obtention d'une D.O. de 0,3. Le culot bactérien est resuspendu, après centrifugation (2500 rpm - Sorval), dans

20ml d'une solution de CaCl<sub>2</sub> 50mM et maintenu 20 minutes dans de la glace. Après centrifugation, les bactéries sont reprises dans 3ml de CaCl<sub>2</sub> 50mM puis conservées dans la glace au moins une heure et jusqu'à leur utilisation.

La forme double brin du vecteur M13 choisi (M13mp19) est soumise à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction correspondante (EcoRI). A 20ng de ce vecteur ainsi préparés sont ajoutés 100ng de l'insert purifié en tampon de ligation (cf Appendices - Milieux et tampons) et en présence d'ATP 1mM et de Dithiothreitol 5mM. Pour ces quantités, une valeur équivalente à 1U d'enzyme T4 ADN ligase est ajoutée au milieu. La réaction de ligation s'effectue à 15°C pendant une nuit (4 à 16 heures). La transformation des cellules bactériennes TG1 rendues compétentes (300µl) est ensuite réalisée à partir d'une fraction aliquote (5µl) de la solution de ligation. Le contact est maintenu durant 50 minutes au minimum, à 0°C. Un choc thermique de 2 minutes est effectué à 45°C. Le tube est replacé dans la glace. On y ajoute ensuite 200µl d'une culture fraîche de TG1 et 3ml d'une solution d'agar molle en milieu LB contenant 20µl d'IPTG 20mg/ml et 50 µl de X-gal 20mg/ml. La préparation est étalée sur boîte de Pétri en milieu LB gélosé et incubé toute la nuit à 37°C. Les plages non colorées représentent les bactéries recombinantes transformées qui sont sélectionnées. (M13 Cloning /Dideoxy Sequencing : Instruction Manual. Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md., 1980).

## 2 - Préparation de la forme monobrin.

Une dilution au 1/100 en milieu 2TY est faite à partir d'une culture bactériennes TG1 réalisée sur la nuit. Cinq ml de cette dilution sontensemencés par une plage blanche recombinante M13 à l'aide d'un cure-dent stérile. L'ensemble est incubé à 37°C sous agitation constante pendant

4,5 heures. Plusieurs centrifugations sont effectuées afin d'éliminer complètement toutes les cellules bactériennes. Le surnageant est réparti en tubes épendorf, en fractions de 1ml auxquelles on ajoute 100µl d'une solution de PolyEthylène Glycol (PEG) 20%, NaCl 2,5M. Les tubes sont laissés à température de la pièce pendant 15 minutes, en mélangeant vivement de temps en temps. Après une centrifugation de 10 minutes à 10000rpm (Sigma), le culot de phages est repris dans 10µl de tampon TE. Le tube est rincé et les différentes fractions de chaque clone sont réunies. Une première extraction est réalisée de la manière suivante : 1/2V de phénol saturé en TE est ajouté au surnageant et l'ensemble est soumis au vortex puis laissé à température ambiante durant 5 minutes. Un demi volume de chloroforme saturé en eau est alors ajouté et la préparation est soumise au même traitement que précédemment avant d'être centrifugées. Plusieurs extractions sont ensuite effectuées au phénol-chloroforme (1/1), jusqu'à disparition complète de protéines dénaturées à l'interphase. Une dernière extraction au chloroforme saturé en eau est effectuée avant la précipitation éthanolique en présence d'acétate de sodium 3M pH7 (1/10V). Après centrifugation, le culot est lavé deux fois par l'éthanol 70% puis par l'éthanol absolu. L'ADN simple brin est séché et repris dans 10µl de TE. Une estimation de la quantité d'acides nucléiques extraite est effectuée par mesure de la densité optique à 260nm.

### 3 - Réactions de séquence.

Les différents tampons et réactifs utilisés lors des réactions de séquençage sont présentés en appendice afin de ne pas gêner le détail du protocole.

Réaction d'hybridation : une quantité équivalente à 2 $\mu$ g d'ADN simple brin est incorporée à 8 $\mu$ l de tampon S-5x, quantité suffisante pour 24 $\mu$ l d'eau bidistillée. Pour chacun des clones, 4 réactions sont effectuées :

Réaction A : 3 $\mu$ l de la préparation d'ADN + 2 $\mu$ l d'amorce JOE.

Réaction C : 3 $\mu$ l de la préparation d'ADN + 2 $\mu$ l d'amorce FAM.

Réaction G : 9 $\mu$ l de la préparation d'ADN + 6 $\mu$ l d'amorce TAMRA.

Réaction T : 9 $\mu$ l de la préparation d'ADN + 6 $\mu$ l d'amorce ROX.

La réaction se fait à l'abri de la lumière. Les tubes sont incubés 5 minutes à 55°C, puis laissés à température ambiante durant 30 minutes.

Réaction d'élongation : à chaque préparation précédente, on ajoute les mélanges de déoxynucléotides/didéoxynucléotides et la solution enzymatique contenant la séquenase (solution Y). Le principe de la réaction s'inspire du protocole décrit par Sanger et al.-1977.

Réaction A : 1,5 $\mu$ l dNTP/ddATP + 1 $\mu$ l de solution Y.

Réaction C : 1,5 $\mu$ l dNTP/ddCTP + 1 $\mu$ l de solution Y.

Réaction G : 4,5 $\mu$ l dNTP/ddGTP + 3 $\mu$ l de solution Y.

Réaction T : 4,5 $\mu$ l dNTP/ddTTP + 3 $\mu$ l de solution Y.

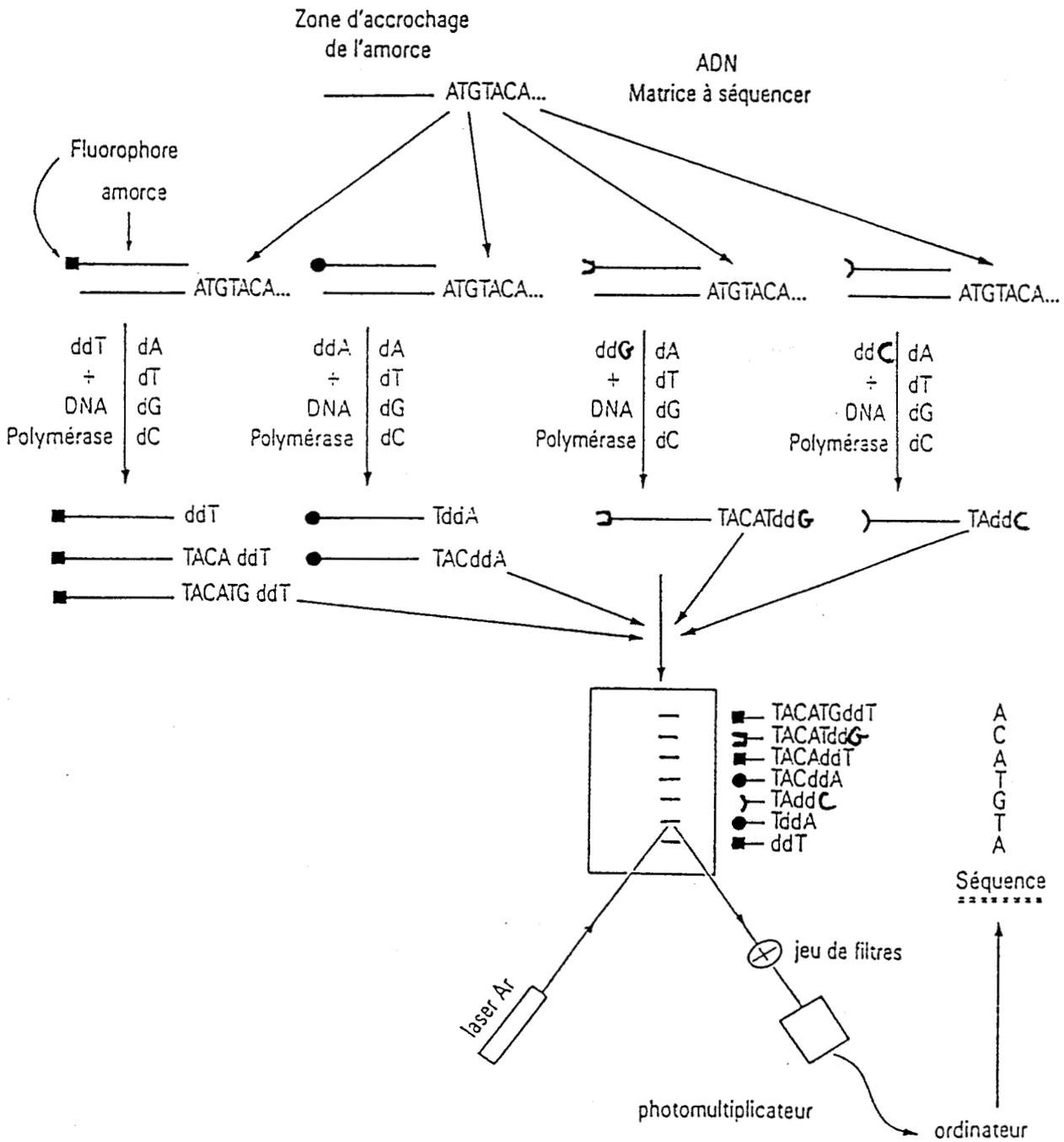
Les tubes sont incubés 7 minutes à 37°C puis la réaction est inhibée par 10 minutes à 65°C. Pour chacun des clones, les 4 tubes (A - C - G - T) sont mélangés. Après précipitation éthanolique, les culots sont lavés à l'éthanol 75% puis 95%, séchés et conservés à l'abri de la lumière. Les échantillons sont ensuite repris dans 5 $\mu$ l de formamide déionisée et 1 $\mu$ l d'EDTA 50mM et dénaturés par la chaleur (90°C - 2 minutes). Ils sont ensuite refroidis dans de la glace puis rapidement déposés sur le gel de séquence.

#### 4 - Électrophorèse et analyse.

L'électrophèse est réalisée en gel de polyacrylamide - urée constitué de la manière suivante : 9ml d'acrylamide 40% (Acrylamide/bisacrylamide : 19/1), 30g d'urée, 6ml de TBEx10, complétés à 67,25g par de l'eau bidistillée. La solution est filtrée avant d'ajouter 300 $\mu$ l de persulfate 10% et 30 $\mu$ l de TEMED. Une pré-migration du gel est faite durant 30 minutes. Après dépôt des échantillons, l'électrophorèse est effectuée à 29W (1400V - 22mA), à une température de 50°C.

L'analyse est permise par l'utilisation du séquenceur 370A (Applied Biosystem, USA). La technique utilisée a été décrite par Smith et al.-1986. Les amorces fluorescentes sont stimulées par le laser, permettant ainsi de repérer les différents fragments d'ADN séparés selon leur taille lors de la migration électrophorétique. L'émission d'un signal par les amorces est captée et enregistrée par l'ordinateur associé au laser. La superposition des résultats obtenus pour les 4 fluorophores d'un même clone permet de reconstituer la séquence nucléotidique de l'ADN analysé.

FIGURE 23 : Séquençage nucléotidique basé sur l'utilisation de didéoxynucléotides (Sanger et al.-1977) et d'amorces fluorophores (Smith et al.-1986). Schéma tiré de Biofutur - octobre 1986.



**APPENDICES**

## MILIEUX ET TAMPONS

### Milieux de culture

#### Milieu LB (Luria-Bertani)

bacto-tryptone 10g  
extrait de levure 10g  
NaCl 10g  
ajusté à pH 7,4 avec NaOH 1N - qsp 1l

#### Milieu 2TY

bacto-tryptone 16g  
extrait de levure 10g  
NaCl 5g  
qsp 1l

### Tampons

#### PBS "Phosphate Buffer Saline"

Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> 10mM  
NaH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 10mM  
NaCl 0,15M

#### SET x20

NaCl 3M  
EDTA 20mM  
Tris 0,4M pH7,8

#### SSC x20

NaCl 3M  
Citrates de sodium 0,3M  
Ajusté à pH7 avec HCl1M

#### TBE

Tris base 89mM  
Acide borique 89mM  
EDTA 2mM

#### TE

Tris 10mM pH8  
EDTA 1mM

#### Tampon d'hybridation-N (pour environ 800ml)

Sulfate de dextran : 80g  
H<sub>2</sub>O : 300ml  
Formamide désionisée : 320ml  
SSC x20 : 160ml  
Tris 2M pH 7,4 : 8ml  
Solution Denhardt : 8ml  
ADN de sperme de hareng (2mg/ml) : 8ml

Formamide désionisée : A 50ml de formamide ajouter 5g de billes de résine (Bio-Rad AG 501-XB). Agiter doucement à 4°C et filtrer sur papier Whatman 1.

Solution Denhardt x100 : polyvinylpyrrolidone (PVP) 10g  
sérum albumine bovine 10g  
ficoll 400 10g  
qsp 500ml

Tampon SM :

NaCl : 5,8g  
MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O : 2g  
Tris.Cl 1M pH7,5 : 50ml  
gélatine 2% : 5ml  
quantités pour 1l de solution. Autoclaver.

TNEN

Tris-HCl 10mM pH7,4  
NaCl 150mM  
EDTA 2mM  
Nonidet P40 0,1%

Tampon de réaction des enzymes

Tampon de la Reverse transcriptase x5

Tris-HCl 0,25M pH8,1  
Dithiothreitol DTT 10mM  
MgCl<sub>2</sub> 25mM  
KCl 0,2M

Tampon de Polymérase x10

Tris 70mM pH7,4  
NaCl 500mM  
MgCl<sub>2</sub> 70mM

Tampon de ligation x10 (pour T4 ADN ligase)

Tris 0,5M pH7,4  
MgCl<sub>2</sub> 0,1m  
DTT 0,2M  
ATP 10mM  
SAB 50µg/ml

Tampon "High Salt" (EcoRI)

Tris 90mM pH7,5  
NaCl 50mM  
MgCl<sub>2</sub> 10mM  
SAB 100µg/ml

## Milieux et tampons pour les réactions de séquence

### Tampon de réaction 5x

Tris-HCl 50mM pH7,5

MgCl<sub>2</sub> 50mM

NaCl 500mM

### Amorces

La poudre lyophilisée est dissoute en TE pour obtenir une concentration finale de 0,4pmol/ $\mu$ l. Elles sont conservées à l'abri de la lumière.

Fluorophore de la réaction A (JOE) : fluorescéine

Fluorophore de la réaction C (FAM) : 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1-diazole (NDB)

Fluorophore de la réaction G (TAMRA) : tétramethylrhodamine

Fluorophore de la réaction T (ROX) : rouge Texas

### Solutions de déoxynucléotides

Le déoxy-7-déazaguanosine triphosphate (d-c7GTP) est substitué au dGTP afin de diminuer l'effet de compression des bandes.

dATP, dCTP, dTTP : 2mM

d-c7GTP : 3mM

solutions de didéoxynucléotides ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP : 50mM

solutions de mélange déoxynucléotides et didéoxynucléotides : mélange

dNTP/ddX : V/V.

Solution Y (tampon de séquenase) : 12,5U/clone

DTT 0,1M : 4,5 $\mu$ l

Tris 10mM pH 8 : 3,5 $\mu$ l

## BIBLIOGRAPHIE

- 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 : 587-592.
- AGOSIN M., Von Brandt T., Rivera G.F. & McMahon P. (1957). Studies on the metabolism of Echinococcus granulosus. I. Chemical composition and respiratory reactions. *Exp. Parasitol.* 6 : 37-51.
- AMBROISE-THOMAS P. (1976). Immunofluorescence in the diagnosis, therapeutic follow-up and sero-epidemiological studies of some parasitic diseases. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70 : 107-112.
- ARRU 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) points of view". Parasitological symposium, Lyons, 24-26 october 1983. Ed. Euzeby J., Gevrey J., Luxembourg, France : Commission of European Communities, p 215-233.
- BEKHTI A., Schaaps J.P., Capron M., Dessaint J.P., Santoro F. & Capron A. (1977). Treatment of hepatic hydatid disease with mebendazole preliminary results in four cases. *Br. med. J.* 2 : 1047-1051.
- BEN-ISMAIL R., Carme B. & Gentilini M. (1978). Activité anti-P1 anormale au cours de la distomatose hépatique (Fasciolose). *Nouvelle Presse Médicale* 7 : 4300.
- BEN-ISMAIL R., Carme B. & Gentilini M. (1979). Mise an évidence de substance P1 ou P1-like dans Fasciola hepatica et F.gigantica. *Pathol. Biol.* 27 : 487-489.
- BEN-ISMAIL 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.* 29 (2) : 239-245.
- BENITO A.A. (1984). Hydatidosis of sheep. II. Levels of glucose, lipids and proteins in the hydatid liquid. *Arch. Zootec.* 33 : 163-169.
- BENITO A.A., Gomez M.F. & Gaitan U.A. (1983). Hydatidosis of sheep. I. The pH, and the levels of sodium and potassium in the hydatid liquid. *Arch. Zootec.* 32 : 279-284.
- BIGUET J., Capron A., Tran Van Ky P. & d'Haussy R. (1962). Etude immuno-électrophorétique comparée des antigènes de divers helminthes. *C.R. Acad. Sciences* 254 : 3500.
- BIGUET J., Rose G., Capron A. & Tran Van Ky P. (1965). Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immunoélectrophorèse. *Rev. Immunol. (Paris)* 29 : 5-16.
- BOMBARDIERI S., Giordano F., Ingaro F., Ioppolo S., Siracusano A. & Vicari G. (1974). An evaluation of an agar gel diffusion test with crude and purified antigens in the diagnosis of hydatid disease. *Bull. W.H.O.c* 51 : 525-530.

- BOUCHARA J.P., Robert R., Senet J.M. & Leynia de la Jarrige P. (1985). Mise en évidence de communautés antigéniques hôte-parasite dans l'hydatidose. Bull. Soc. Path. Ex. 78 : 707-711.
- BOUREE P., Cazin A., Gascon A., Kouchnie G. & Molinard R. (1977). Echinococcoses multiples. Essais thérapeutiques avec le fluoromébendazole. Bull. Soc. Path. Ex. 4 : 365-369.
- BOUT D., Carlier Y. & Capron A. (1979). Immunodiagnosis of hydatidosis using monospecific immune serum anti-antigen 5. Biomedicine 31 : 214-215.
- BOUT D., Dugimont J.C., Farag H. & Capron A. (1975). Le diagnostic immunoenzymologique des affections parasitaires; II. Immunoenzymologie quantitative (E.L.I.S.A.) Lille Med. 20 : 561-566.
- BOUT D., Fruit J. & Capron A. (1974). Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatique. Ann. Immunol. 125 : 775-788.
- BOUT D., Santoro F., Carlier Y., Bina J.C. & Capron A. (1977b). Circulating immune complexes in schistosomiasis. Immunology 33 : 17.
- BOZICEVICH J. (1951). A rapid flocculation test for the diagnosis of trichinosis. Public Health reports (Washington) 66 : 806-814.
- BRETAGNE S., Liance M., Bresson-Hadni S. & Houin R. (1988). Isolement d'une sonde ADN pouvant distinguer Echinococcus multilocularis d'E.granulosus et des autres cestodes. Bull. Soc. Franc. Parasitol. 6 : 83-87.
- CAMERON G.L. & Staveley J.M. (1957). Blood group P substance in hydatid cyst fluids. Nature 179 : 147-148.
- CAPRON A., Biguet J., Vernes A. & Afchain D. (1968). Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Pathol. Biol. 16 (3-4) : 121-138.
- CAPRON A., Bout D. & Dugimont J.C. (1975). 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., Vernes A. & Biguet J. (1967). Le diagnostic immunoélectrophorétique de l'hydatidose. Journées Lyonnaises d'Hydatidologie. (Ed. SIMEP), Lyon, pp 27-40.
- CAPRON A., Vernes A., Dessaint J.D. & Capron M. (1976). Contribution à l'étude de l'hypersensibilité dans l'échinococcose hydatique. Rev. Franc. Allergol. 16 (1) : 10-15.
- CAPRON A., Yarzabal L., Vernes A. & Fruit J. (1970). Le diagnostic immunologique de l'échinococcose humaine. (Bilan personnel à propos de 400 observations). Pathol. Biol. 18 : 357-365.
- CASONI T. (1911). La diagnosi biologica de l'echinococcosi umana mediante l'intradermoreazione. Fol. clin. Chem. microbiol. 4 : 5-16.

- CHAMEKH M., Facon B., Dissous C. & 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 : 129-137.
- CHIRGWIN J.M., Przybyla A.E., Mc Donald R.J. & Rutter W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18 (24) : 5294-5299.
- CHORDI A. & Kagan I. (1965). Identification and characterization of antigenic components of sheep hydatid fluid by immunoelectrophoresis. *J. Parasitol.* 51 (1) : 63-71.
- COLTORTI E.A. & Varela-Diaz V.M. (1972). IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid. *J. Parasitol.* 58 (4) : 753-756.
- COLTORTI E.A. & Varela-Diaz V.M. (1974). Echinococcus granulosus : penetration of macromolecules and their localization on the parasite membrane of cysts. *Exp. Parasitol.* 35 : 225-231.
- COLTORTI E.A. & Varela-Diaz V.M. (1975). Modification of the immunoelectrophoresis test for the immunodiagnosis of hydatidosis. *J. Parasitol.* 61(1) : 155-157.
- COLTORTI E.A. & Varela-Diaz V.M. (1976). Survival of hydatid cysts after puncturing. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 51 : 647-650.
- COLTORTI E.A. & Varela-Diaz V.M. (1978). Detection of antibodies against Echinococcus granulosus arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72 (3) : 226-229.
- CONDER G.A., Andersen F.L. & 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) : 577-584.
- 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. Exot.* 60 : 555.
- CRAIG P.S., Hocking R.E., Mitchell G.P. & Rickard M.D. (1981). Murine hybridoma derived antibodies in the processing antigens for the immunodiagnosis of hydatid ( Echinococcus granulosus ) infection in sheep. *Parasitology.* 83 : 303-317.
- CRAIG P.S. (1986). Detection of specific circulating antigen, immune complexes and antibodies in human hydatidosis from Turkana (Kenya) and Great Britain, by enzyme immunoassay. *Parasite Immunol.* 8 : 171-188.
- CRAIG P.S. & Nelson G.S. (1984). The detection of circulating antigen in human hydatid disease. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (3) : 219-227.

- D'AMELIO R., Pontesilli O., Dayal R., De Rosa F., Barnet M., Teggi A., Brighthouse G. & Lambert P.H. (1985). Characterization of parasite antigens from human hydatid cyst fluid by SDS-PAGE and IEF. *Med. Microbiol. Immunol.* 174 : 43-50.
- D'AMELIO R., Pontesilli O., Palmisano L., Pezzella M., Vullo V., De Rosa F., Sorice F. & Aiuti F. (1983). Detection and partial characterization of circulating immune complexes in hydatid disease. *J. Clin. Microbiol.* 18 : 1021-1026.
- DAVIES C., Rickard M.D., Bout D. & 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 : 143-152.
- DESSAINT J.P., Bout D., Wattré P. & Capron A. (1975). Quantitative determination of specific IgE antibodies to Echinococcus granulosus and IgE levels in sera from patients with hydatid disease. *Immunology.* 29 : 813-823.
- DI FELICE G., Pini C., Afferni C. & 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.
- DIGENIS G.A., Thorson R.E. & Konyalian A. (1970). Cholesterol biosynthesis and lipid biochemistry in the scolex of Echinococcus granulosus. *J. Pharm. Sci.* 59 : 676-679.
- DISSOUS C., Dissous C. & Capron A. (1981). Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3 : 215-225.
- DOTTORINI S. & Tassi C. (1977). Echinococcus granulosus characterization of the main antigenic component (arc 5) of hydatid fluid. *Exp. Parasitol.* 43 : 307-314.
- ECKERT J. (1986). Prospects for treatment of the metacestode stage of Echinococcus. In : *The biology of Echinococcus and hydatid disease*, Ed. Thompson R.C.A., London U.K., George Allens & Urwin, p250-284.
- ECKERT J., Gemmel M.A. & Soulsby E.J.L. (1981). Guidelines for surveillance, prevention and control of echinococcosis / hydatidosis. *FAO / UNEP / W.H.O.*, Geneva : 147-167.
- EDWARDS G.T. (1982). Host IgG in equine hydatid cyst fluid. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76 (4) : 485-487.
- ENGVALL E. & Perlman P. (1972). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A. III) Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109 : 129-135.

- FARAG H., Bout D. & Capron A. (1975). Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (E.L.I.S.A.) *Biomedicine* 23 : 276-278.
- FEINBERG A.P. & Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132 : 6-13.
- FISCHMAN A. (1960). Flocculation tests in hydatid disease. *J. Clin. Path.* 13 : 497-503.
- FRAYHA G.j. & Haddad R. (1980). Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of Echinococcus granulosus (cestode). *Int. J. Parasitol.* 10 : 359-364.
- GARABEDIAN G.A., Matossian R.M. & Djanian A.Y. (1957). An indirect hemagglutination test for hydatid disease. *J. Immunol.* 78 : 269-272.
- GEMMEL M.A. & 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., George Allen & Unwin, p189-216.
- GHEDENI G. (1906). Ricerche sul siero di sangue di individuo affect da ciste de echinococco e sul liquido in essa contenuto Gazz. Osp. Clin. 27 : 1616.
- GORE R.W., Sadun E.H. & Hoff R. (1970). Echinococcus granulosus and E. multilocularis : soluble antigen fluorescent antibody test. *Exp. Parasit.* 28 : 272-279.
- GOTTSTEIN B. (1984) An immunoassay for the detection of circulating antigens in human echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33 (6) : 1185-1191.
- GOTTSTEIN B., Eckert J. & Fey H. (1983). Serological differentiation between Echinococcus granulosus and Echinococcus multilocularis. *Infections in man. Z. Parasitenkd.* 69 : 347-356.
- GOTTSTEIN B., Eckert J., Michael S.A. & Thompson R.C.A. (1987). Echinococcus granulosus antigens : immunoelectrophoretic and western blot analysis of hydatid cyst fluids. *Parasitol. Res.* 73 : 186-189.
- GUBLER U. & Hoffman B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25 : 263-269.
- HEATH D.D., Christie M.J. & Chevis R.A.F. (1975). The lethal effect of mebendazole on secondary Echinococcus granulosus, cysticerci of Taenia pisiformis and tetrathyridia of Mesocestoides corti. *Parasitology* 70 : 273.
- HEATH D.D. & 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) : 11-15.

- HEMMINGS I. & 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 : 171-182.
- HEMMINGS I. & Mc Manus D.P. (1991). The diagnostic value and molecular characterisation of an Echinococcus multilocularis antigen gene clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44 : 53-62.
- HOPP T.P. & Woods K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (6) : 3824-3828.
- HULDT G., Gunnar S., Johansson S.G.O. & Lantto S.L. (1973). Echinococcosis in Northern Scandinavia. *Arch. Environ. Health.* 26 : 36-40.
- HUSTEAD S.T. & Williams J.F. (1977). Permeability on taeniid metacestodes : I. Uptake of proteins by larval stages of Taenia taeniaformis, T. crassiceps and Echinococcus granulosus. *J. Parasitol.* 63 : 314-321.
- HUYNH T.V., Young R.A. & Davis R.W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in gt10 and gt11. In : "DNA cloning techniques : a practical approach." Ed. Glover D., IRL Press, Oxford.
- IACONA A., Pini C. & Vicari G. (1980). Enzyme - Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.) in the serodiagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1) : 95-102.
- KAGAN I.G. (1963). Seminar on immunity to parasitic helminths. VI. Hydatid disease. *Exp. Parasitol.* 13 : 57-71.
- KAGAN I.G. (1968). A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. *Bull. W.H.O.* 39 : 25-37.
- KAGAN I.G. & Agosin M. (1968). Echinococcus antigens *Bull. W.H.O.* 39 : 13-24.
- KAGAN I.G. & Norman L. (1963a). Analysis of helminth antigens ( Echinococcus granulosus and Schistosoma mansoni ) by agar gel methods. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 118 : 130.
- KAGAN I.G. & Norman L. (1963b). The isolation and characterization of two antigens in hydatid fluid of Echinococcus granulosus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 12 : 346-357.
- KAGAN I.G., Osimani J.J., Varela J.C. & Allain D.S. (1966). Evaluation of intradermal and serologic tests for the diagnosis of hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 15 : 172-179.
- KAMMERER W.S. & Schantz P.M. (1984). Long term follow-up of human hydatid disease (Echinococcus granulosus) treated with a high-dose mebendazole regime. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33 (1) : 132-137.
- KILEJIAN A., Schinazi L.A. & Schwabe C.W. (1961). Host-parasite relationships in echinococcosis. V. Histochemical observations on E. granulosus. *J. Parasitol.* 47 : 181-182.

- KILEJIAN A. & Schwabe C.W. (1971). Studies on the polysaccharides of Echinococcus granulosus cyst, with observations on a possible mechanism for laminated membrane formation. *Comp. Biochem. Physiol.* 40 (B) : 25-36.
- KORACH S. & Benex J. (1966). A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. I. Isolation physical and chemical data. *Exp. Parasit.* 19 : 193-198.
- KOZAKIEWICZ B. (1980). Study of the effect of selected sex hormones on the developpement of hydatid in experimentally infected pigs. *Medycyna Weterynary jna.* 36 (12) : 726-727.
- KRVAVICA S., Martincic T. & 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 : 314-321.
- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- LASS N., Laver Z. & Lengy J. (1973). The immunodiagnosis of hydatid disease : post-operative evaluation of the skin test and four serological tests. *Ann. Allergy.* 31 : 430-436.
- LEMAIRE G. & Ribère R. (1935). Sur la composition chimique du liquide hydatique. *C.R. Soc. Biol.* 118 : 1578-1579.
- LIGHTOWLER S., Haralambous A. & Rickard M. (1989). Amino acid sequence homology between cyclophilin and a cDNA-cloned antigen of Echinococcus granulosus. *Mol. Biochem. Parasitol.* 36 : 287-290.
- LIGHTOWLER S., Rickard M.D., Honey R.D., Obendorf D.L. & Mitchell G.C. (1984). Serological diagnosis of Echinococcus granulosus infection in sheep using cyst fluid antigen processed by antibody affinity chromatography. *Austr. Vet. J.* 61 (4) : 101-108.
- MAIZELS R.M., Burke J. & Denham D.A. (1987) Phosphorylcholine bearing antigens in filarial nematode parasites : analysis of somatic extracts, in-vitro secretions and infection sera from Brugia malayi and B.pahangi. *Parasite Immunol.* 9 : 49-66.
- MANIATIS T., Fritsch E.F. & Sambrook J. (1982). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 545 p..
- MARCU K. & DUDOCK B. (1974). *Nucl. Acid. Res.* 1 : 1385.
- MASON P.J. & Williams J.G. (1985). Hybridisation in the analysis of recombinant DNA. In : "A practical Approach", Ed. Hames B.D. & Higgins S.I., IRL Press, p. 113-137.
- MATOSSIAN R.M. (1981). A simplified radioimmunoassay technique for hydatid disease and human trichinosis. *J. Helminth.* 55 : 49-57.
- MATOSSIAN R.M. & Araj G.F. (1975). Serologic evidence of post-operative persistence hydatid cysts in man. *J. Hyg.* 75 : 333-342.

- MATOSSIAN R.M., Alami S.Y., Salti I. & Araj G.F. (1976). Serum immunoglobulin levels in human hydatidosis. *Int. J. Parasitol.* 6 : 367-371.
- MATOSSIAN R.M., Mc Laren M., Draper C.C., Bradstreet c.M., Dighero M.W., Kane G.J., Mc Kinlay L.M.& 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 : 287-291.
- MATOSSIAN R.M., Kane G.J., Chantler S.M., Batty I. & Sarhadian H. (1972). The specific immunoglobulin in hydatid disease. *Immunology.* 22 : 423-430.
- MATOSSIAN R.M., Rickard M.D. & Smyth J.D. (1977). *Bull. W.H.O.* 55 : 499-507.
- McMANUS D.P. (1981). A biochemical study of adult and cystic stages of Echinococcus granulosus of human and animal origin from Kenya. *J. Helminth.* 55 : 21-27.
- McMANUS D.P., Knight M. & Simpson A.J.G. (1985). Isolation and characterisation of nucleic acids from the hydatid organisms, Echinococcus spp. (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 16 : 251-266.
- McMANUS D.P. & Macpherson C.N.L. (1984). Strain characterization in the hydatid organism, Echinococcus granulosus : current status and new perspectives. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 : 193-198.
- McMANUS D.P. & Simpson A.J.G. (1985). Identification of the Echinococcus (hydatid disease) organisms using cloned DNA markers. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17 : 171-178.
- McMANUS D.P. & Smyth J.D. (1978). Differences in the chemical composition and carbohydrate metabolism of Echinococcus granulosus (horse and sheep strains) and E.multilocularis. *Parasitology* 77 : 103-109.
- McMANUS D.P. & Smyth J.D. (1979). Isoelectric focusing of some enzymes from Echinococcus granulosus and E.multilocularis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73 : 259-265.
- McMANUS D.P. & Smyth J.D. (1982). Intermediary carbohydrate metabolism in protoscoleces of E.granulosus (horse and sheep strains) and E.multilocularis. *Parasitology* 84 : 351-366.
- MERIOUA A., Bout D. & Capron A. (1982). Evaluation of E.L.I.S.A. and R.A.S.T. using purified antigens for diagnosis of hydatidosis. *Path. Biol.* 32 (1) : 15-22.
- MESSING J. (1983). In : "Methods in enzymology 101 (part C) : recombinant DNA", Ed. Wu R., Grossman L. & Maldave K., Academic Press, New York, p.20-78.

- MESSING J., Gronenborn B., Müller-Hill B. & Hofschneider P.H. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle : Insertion of a HindIII of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 : 3642-3646.
- MORIARTY K.M. (1968). Antibodies hydatid disease. An immunological study af antibodies responsible for haemagglutinating and complement fixing activity in human hydatid disease. J. Lab. Clin. Med. 72 : 721-730.
- MORGAN W.T.J. & Watkins W.M. (1964). Blood group P1 substances : I. Chemical properties. Proc. 9th. Congr. Int. Soc. Blood Transfus. (Mexico 62) : 225-229.
- MULLER N., Gottstein B., Vogel M., Flury K. & 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 : 151-160.
- MUSIANI P., Piantelli M., Arru E. & Pozzuoli R. (1974). A solid phase radioimmunoassay for the diagnosis of human hydatidosis. J. Immunol. 112 (5) : 1674-1679.
- MUSIANI P., Piantelli M., Lauriola L., Arru E. & Pozzuoli R. (1978). Echinococcus granulosus : specific quantification of the two most immunoreactive antigens in hydatid fluids. J. Clin. Path. 31 : 475-478.
- NORMAN L., Kagan I.G. & Chordi A. (1964). Further studies on the analysis of sheep hydatid fluid by agar gel methods. Am. J. Trop. Med. Hyg. 13 : 816-821.
- NORMAN L., Sadun E.H. & Allain D.S. (1959). A bentonite flocculation test for the diagnosis of hydatid disease in man and animals. Am. J. Trop. Med. Hyg. 78 : 269-272.
- ORIOLO C. & Oriol R. (1975). Physicochemical characteristics of a lipoprotein antigen of Echinococcus granulosus. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 (1) : 96-100.
- ORIOLO R., Williams J.F., Perez-Esandi M.V. & Oriol C. (1971). Purification of lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 575-579.
- PENNOIT- DE COOMAN E. & Derycke P.H. (1970). Experimental secondary echinococcosis of Echinococcus granulosus. I. Development in different strains of mice. Z. Parasitenk. 34 : 362-370.
- PEZZELLA M., Galli C., Delia S., Vullo V., Zennaro F., Lillini E. & Sorice F. (1984a). Fractionation and characterization of hydatid fluid antigens with identification of an antigen similar to human serum albumin. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 78 : 821-826.
- PEZZELLA M., Galli C., Delia S., Vullo V., Zennaro F. & Sorice F. (1984b). Echinococcus granulosus antigens : comparative analysis of human, bovine and ovine hydatid fluids. Ann. Trop. Med. Parasitol. 78 (5) : 549-551.

- PIANTELLI M., Pozzuoli R., Arru E. & Musiani P. (1977). Echinococcus granulosus : identification of subunits of the major antigens. J. Immunol. 119 (4) : 1382-1386.
- PINI C., Pastore R. & Valesini G. (1983). Circulating immune complexes in sera of patients infected with Echinococcus granulosus. Clin. exp. Immunol. 51 : 572-578.
- POZZUOLI R., Musiani P., Arru E., Piantelli M. & Mazzarella R. (1972). E. granulosus : isolation and characterization of sheep fluid antigens. Exp. Parasitol. 32 : 45-55.
- POZZUOLI R., Piantelli M., Perucci C., Arru E. & Musiani P. (1975). Isolation of the most immunoreactive antigens of Echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid. J. Immunol. 115 : 1459-1463.
- PURRIEL P. & Tomalino D. (1960). Nueva interpretacion de la patologica general de la hidatidosis (La clinica en relacion con la biologia del parasito). "Medecina en al Uruguay", Warner-Chilcott, Montevideo, 57.
- RICHARD-LENOBLE D., Smith M.D., Loisy M. & 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.
- RICKARD M.D., Davies C., Bout D. & Smyth J.D. (1977). 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 : 359-364.
- RICKARD M.D. & Lightowlers 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. 217-249.
- RILEY E.M., Dixon J.B., Kelly D.F. & Cox D.A. (1985). The immune response to Echinococcus granulosus : sequential histological observations of lymphoreticular and connective tissues during early infection. J. Comp. Path. 95 : 93-104.
- RISHI A.K. & McManus D.P. (1987). Genomic cloning of human Echinococcus granulosus DNA : isolation of recombinant plasmids and their use as genetic markers in strain characterization. Parasitology 94 : 369-383.
- RUSSI S., Siracusano A. & Vicari G. (1974). Isolation and characterization of a blood P1 active carbohydrate antigen of Echinococcus granulosus cyst membrane. J. Immunol. 112 (3) : 1061-1069.
- SAIMOT A.G., Meulemans A., Hay J.M., Mohler J., Manuel C. & Coulaud J.P. (1981). Etude pharmacocinétique du flubendazole au cours de l'hydatidose humaine à Echinococcus granulosus. Résultats préliminaires. Nouvelle Presse Médicale 10 (38) : 3112-3124.

- SAINTE-LAUDY J., Nozais J.P. & Chandenier J. (1984). Cinétique des anticorps spécifiques dont les IgE par E.L.I.S.A., hématoagglutination et électrosynérèse dans l'hydatidose. Bull. Soc. Franc. Parasitol. 2 : 75-79.
- SANCHEZ A.F. & 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 : 347-366.
- SANGER F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214 : 1205-1211.
- SANGER F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (12) : 5463-5467.
- SANTIAGO M.A.M., Moreira E.C. & Moreira W.S. (1980). Mebendazole treatment of hydatid in sheep. Revista de Centro de Ciencias Rurais 10 (4) : 351-356.
- SCHANTZ P.M. (1973). Immunodiagnostic tests with Echinococcus antigens in sheep with homologous and heterologous larval cestodes infections. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 15 : 179-194.
- SCHANTZ P.M. (1984). In : "Tropical and geographical medicine", Ed. Warren K.S. & Mahmoud A.A.F., McGraw Hill, New York, p. 487-497.
- SCHANTZ P.M. & Gottstein B. (1986). Echinococcosis (hydatidosis). In : "Immunoserology of parasitic diseases.", Ed. Walls K.F., M. Decker, New York.
- SCHANTZ P.M., Shanks D. & Wilson M. (1980). Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29 (4) : 609-612.
- SCHANTZ P.M., Van Den Bossche H. & Eckert J. (1982). Chemotherapy for larval echinococcosis in animals and humans : report of a workshop. Z. Parasitenk. 67 (1) : 5-26.
- SCHWABE C.W., Schinazi L.A. & Kilejian A. (1959). Host-parasite relationship in echinococcosis. II. Age resistance to secondary echinococcosis in the white mouse. Am. J. Trop. Med. Hyg. 8 : 29-36.
- SHEPHERD J.C., Aitken A. & McManus D.P. (1991). A protein secreted in vivo by Echinococcus granulosus inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. Mol. Biochem. Parasitol. 44 : 81-90.
- SHEPHERD J.C. & McManus D.P. (1987). Specific and cross-reactive antigens of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid. Mol. Biochem. Parasitol. 28 : 143-154.
- SMITH L.M., Sanders J.Z., Kaiser J., Hughes P., Doon C., Connell C.R., Heiner C., Kent S.B.H. & Hood L.E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. Nature 321 : 674-679.

- SMYTH J.D. (1984). Speciation in Echinococcus granulosus : biological and biochemical criteria. In : "Agriculture. Some important parasitic infections in bovines considered from economic and social (zoonosis) points of view.", Parasitological symposium Lyons, 24-26 october 1983, Ed. Euzéby J. & Gevrey J., Luxembourg, France, Commission of the European Communities, p. 103-107.
- SMYTH J.D. & Davies Z. (1974). Occurrence of physiological strains of Echinococcus granulosus demonstrated by in vitro culture of protoscoleces from sheep and horse hydatid cysts. *Int. J. Parasitol.* 4 : 443-445.
- SORICE F., Delia S., Vullo V., Aceti A. & Ferone U. (1979). Valore e limiti del RAST (Radio-Allergo-Sorbent Test) nella diagnosi biologica della idatidosi. *Ann. Sclavo.* 21 : 800.
- SPEISER F. (1980). Application of the ELISA for the diagnosis of filariasis and echinococcosis. *Tropenmed. Parasitol.* 31 : 459-466.
- 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 : 183-184.
- SZYFRES B. & Kagan I.G. (1963). A modified slide latex screening test for hydatid disease. *J. Parasit.* 49 : 69-72.
- THOMAS H. & Gonnert R. (1978). The efficacy of praziquantel against experimental cysticercosis and hydatidosis. *Z. Parasitenk.* 55 (2) : 165-179.
- 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. Thompson R.C.A., London, UK, G. Allen & Unwin, p. 5-43.
- THOMPSON R.C.A. & Kuramatilake L.M. (1982). Intraspecific variation in Echinococcus granulosus : the australian situation and perspectives for the future. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76 (1) : 13-16.
- THOMPSON R.C.A., Kuramatilake L.M. & Eckert J. (1984). Observations on Echinococcus granulosus of cattle origin in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 14 : 283-291.
- TINAR R. (1979). Efficacy of some new antihelminthics against hydatid cysts in experimentally infected lambs. *Ankara Universitesi, Veteriner Fakultesi Dergisi* 26 (1/2) : 145-168.
- TODOROV T., Dakov I., Kosturkova M., Tenev S. & Dimitrov A. (1979a). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. 1. A comparative study of immunodiagnostic tests. *Bull. W.H.O.* 57 (5) : 735-740.
- TODOROV T., Raicev I., Tenev S., Kosturkova M., Dakov I. & Dimitrov A. (1979b). Immunoreactivity in pulmonary echinococcosis. 2. Evaluation of antibody response. *Bull. W.H.O.* 57 (5) : 741-750.

- TODOROV T. & Stojanov G. (1979). Circulating antibodies in human echinococcosis before and after surgical treatment. Bull. W.H.O. 57 (5) : 751-758.
- TODOROV T., Stojanov G., Rohov L., Rasev R. & Alova N. (1976). Antibody persistence after surgical treatment of echinococcosis. Bull. W.H.O. 53 : 407-415.
- TOWBIN H., Staehelin T. & 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.
- TSANG V.C.W., Perelta J.M. & Simons A.R. (1983). Enzyme-linked immunoelectrotransfert blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods in Enzymology. Vol. 92. Ed. JJ. Langone, H. Van Vunakis, Academic Press, N.York & London, p 377-391.
- VARELA-DIAZ V.M. & Coltorti E.A. (1972). Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatid cysts. J. Parasitol. 58 : 1015-1016.
- VARELA-DIAZ V.M. & Coltorti E.A. (1973). The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. J. Parasitol. 59 (3) : 484-488.
- 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) : 554-557.
- VARELA-DIAZ V.M., Coltorti E.A., Prezioso U., Lopez-Lemes M.H., Guisantes G.A. & Yarzabal L.A. (1975b). Evaluation of three immunodiagnostic tests for human hydatid disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 : 312-319.
- VARELA-DIAZ V.M., Coltorti E.A., Ricardes M.I. & Guisantes G.A. (1974). The immunoelectrophoretic characterization of sheep hydatid fluid antigens. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23 : 1092-1096.
- VARELA-DIAZ V.M., Coltorti E.A., Ricardes M.I., Prezioso U., Schantz P.M. & Garcia R. (1976). Evaluation of immunodiagnostic techniques for the detection of human hydatid cyst carriers in field studies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 25 : 617-622.
- VARELA-DIAZ V.M., Coltorti E.A., Rickard M.D. & Torres J.M. (1977a). Comparative antigenic characterization of Echinococcus granulosus and Taenia hydatigena cyst fluids by immunoelectrophoresis. Res. Vet. Sci. 23 : 213-216.
- VARELA-DIAZ V.M., Eckert J., Rausch R.L., Coltorti E.A. & Hess U. (1977b). Detection of the Echinococcus granulosus diagnostic arc 5 in sera from patients with surgically-confirmed Echinococcus multilocularis infection. Z. Parasitenk. 53 : 183-187.
- VARELA-DIAZ V.M., Lopez-Lemes M.H., Prezioso U., Coltorti E.A. & Yarzabal L.A. (1975a). Am. J. Trop. Med. Hyg. 24 : 304-311.

- VERMLOET D., Dumon H., Quilici M. & Charpin I. (1976). Les immunoglobulines E spécifiques dans l'hydatidose. Rev. Allergol. 16 : 73-77.
- VOGEL M., Gottstein B., Müller N. & Seebeck T. (1988). Production of a recombinant antigen of Echinococcus multilocularis with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. Mol. Biochem. Parasitol. 31 : 117-126.
- WATTRE P., Capron M., Bekhti A. & Capron A. (1980). Diagnostic immunologique de l'hydatidose. 139 observations. Nouvelle Presse Médicale 9 (5) : 305-309.
- WEINBERG M. & Parvu (1908). Diagnostic de l'échinococcose par la recherche des anticorps spécifiques. C.R. Soc. Biol. (Paris). 65 : 562-564.
- WILLIAMS J.F. & Perez-Esandi M.V. (1971). Reaginic antibodies in dogs infected with Echinococcus granulosus. Immunology 20 : 451-455.
- WILLIAMS J.F., Perez-Esandi M.V. & Oriol R. (1971). Evaluation of purified lipoprotein antigens of Echinococcus granulosus in the immunodiagnosis of human infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20 : 569-574.
- YARZABAL L.A., Bout D., Naquira F. & Capron A. (1977a). Further observations on the specificity of antigen 5 of Echinococcus granulosus. J. Parasitol. 63 (3) : 495-499.
- YARZABAL L., Dupas H., Bout D. & 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) : 391-396.
- YARZABAL L., Dupas H., Bout D., Naquira F. & 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) : 115-120.
- YARZABAL L.A., Leiton J. & Lopez-Lemes M.H. (1974). The diagnosis of human pulmonary hydatidosis by immunoelectrophoresis test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 23 : 662-669.
- YONG W.K. & Heath D.D. (1979). "Arc 5" antibodies in sera of sheep infected with Echinococcus granulosus, Taenia hydatigena and T.ovis. Parasite Immunol. 1 : 27-38.
- YONG W.K., Heath D.D. & 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) : 231-234.
- YOUNG R.A. & Davis R.W. (1983a). Efficient isolation of genes by using antibody probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 1194-1198.
- YOUNG R.A. & Davis R.W. (1983b). Yeast RNA polymerase II genes : isolation with antibody probes. Science 222 : 778-782.

ZUBLER R.M., Lange G., Lambert P.H. & Miescher P.A. (1976). Detection of immune complexes in unheated sera by a modified  $^{125}\text{I}$ -C1q binding test. *J. Immunol.* 116 : 232-237.

## TABLE DES MATIERES

### GENERALITES

I - HYDATIDOSE OU ECHINOCOCCOSE A <u>ECHINOCOCCUS GRANULOSUS</u>	14
A - CYCLE BIOLOGIQUE ET MORPHOLOGIE	14
B - TAXINOMIE	20
C - EPIDEMIOLOGIE	21
D - INCIDENCE ECONOMIQUE	22
E - PROPHYLAXIE	23
F - MANIFESTATIONS CLINIQUES ET PATHOGENICITE	23
1 - Hydatidose hépatique	24
2 - Hydatidose pulmonaire	25
3 - Autres localisations	25
G - TRAITEMENTS	26
1 - Traitement chirurgical	26
2 - Traitement chimique	26
II - LES ANTIGENES ECHINOCOCCIQUES	27
A - COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES EXTRAITS PARASITAIRES	27
B - ANALYSE DES ANTIGENES DU LIQUIDE HYDATIQUE	29
1 - Caractérisation	29
2 - Variations antigéniques	29
C - L'ANTIGENE 5 ET L'ANTIGENE B	32
1 - L'antigène 5	32
2 - L'antigène B	34

III - REPONSE ANTICORPS ET DIAGNOSTIC	36
A - LA REPONSE ANTICORPS DANS L'HYDATIDOSE	37
1 - Production d'anticorps	37
2 - Dynamique de la réponse anticorps	39
2-1 Variations lors d'un traitement chirurgical	39
2-2 Variations lors d'un traitement chimique	40
3 - Phénomène de séronégativité	41
4 - Passage d'immunoglobulines dans le kyste hydatique	43
B - LE DIAGNOSTIC DE L'HYDATIDOSE	44
1 - Réaction d'immunofluorescence indirecte (ou Indirect Fluorescent Antibody Test - IFAT)	45
2 - Fixation du complément	45
3 - Réactions d'agglutination	47
3-1 Réaction d'agglutination ou de floculation	47
3-2 Hémagglutination	47
4 - Réaction de précipitation en gel	48
4-1 Ouchterlony	48
4-2 Immunoélectrophorèse	48
4-3 Double diffusion en gel d'agarose	49
5 - Réactions immunoenzymatiques	50
6 - Tests radioimmunologiques	51
7 - Recherche des IgE	51
7-1 Intradermo-réaction de Casoni	52
7-2 Recherche des IgE totales et spécifiques	52
IV - DIAGNOSTIC : NECESSITE DE L'OBTENTION D'UN ANTIGENE STANDARDISE SPECIFIQUE DE L'HYDATIDOSE	53

## RESULTATS - DISCUSSION

I - EXTRACTION D'ARN - TRADUCTION <u>IN VITRO</u>	57
1 - Traduction <u>in vitro</u> d'ARN extrait de protoscolex d' <u>E.granulosus</u>	57
2 - Immunoprécipitation des produits de traduction <u>in vitro</u>	60
2-1 Immunoprécipitation par les sérums humains d'infection	60
2-2 Immunoprécipitation par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12 spécifique de l'antigène ne 5	62
II - CLONAGE MOLECULAIRE DES ANTIGENES D' <u>E.GRANULOSUS</u>	64
1 - Construction de la banque d'ADNc	64
2 - Sélection des clones	66
3 - Analyse des clones obtenus	68
III - ETUDE DU CLONE Eg6 D' <u>E.GRANULOSUS</u>	71
1 - Spécificité parasitaire	71
2 - Séquençage nucléotidique du clone Eg6	71
3 - Séquence de la protéine clonée par l'insert Eg6	76
IV - ANALYSE DE LA PROTEINE DE FUSION DU CLONE Eg6 (PF6)	80
1 - Production de la protéine de fusion PF6	80
2 - Reconnaissance de PF6 par les sérums humains	82
3 - Reconnaissance de PF6 par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12	86
4 - Sélection d'anticorps humains sur le clone 6	89
CONCLUSION	92

## MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	101
A - PREPARATION DES ANTIGENES PARASITAIRES	101
B - SOURCES D'ANTICORPS	101
1 - Les sérums humains	101
2 - L'anticorps monoclonal EG 02 154/12	102
II - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES PROTEINES	102
A - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS (SDS-PAGE)	102
B - IMMUNOPRECIPITATION	103
C - TRANSFERT IMMUNOELECTROPHORETIQUE SUR FEUILLE DE NITROCELLULOSE ("Western Blotting") ET REVELATION A L'AIDE D'ANTICORPS ("Immunoblotting")	104
D - SELECTION D'ANTICORPS	105
III - TECHNIQUES SE RAPPORTANT A L'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES	106
A - SOUCHES ET VECTEURS	106
1 - Répertoire des souches bactériennes utilisées	106
2 - Répertoire des vecteurs utilisés	106
B - EXTRACTION D'ARN	106
C - TRADUCTION <u>IN VITRO</u>	108
D - SYNTHÈSE D'ADN COMPLEMENTAIRE (ADNc)	108
E - CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D'ADNc EN VECTEUR D'EXPRESSION LAMBDA GT11	109
1 - Intégration dans le vecteur phagique	111
2 - Titre de la banque	113
F - CRIBLAGE DE LA BANQUE ET SELECTION DES RECOMBINANTS	114

G - CONSTRUCTION LYSOGENIQUE	115
1 - Construction de colonies lysogènes recombinantes	115
2 - Expression et préparation de la protéine recombinante	115
H - PREPARATION DE L'ADN PHAGIQUE	116
1 - PREPARATION DE L'ADN phagique total	116
2 - Préparation d'inserts	117
I - REACTION D'HYBRIDATION	117
1 - Préparation de la sonde	117
2 - Préparation des échantillons	118
3 - Réaction d'hybridation	119
J - SOUS-CLONAGE EN VECTEUR M13 ET SEQUENCAGE NUCLEOTIDIQUE	120
1 - Sous-clonage dans le vecteur M13	120
2 - Préparation de la forme monobrin	121
3 - Réactions de séquence	122
4 - Electrophorèse et analyse	124
APPENDICES : Milieux et tampons	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130
TABLE DES MATIERES	146
TABLE DES ILLUSTRATIONS	151

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : Distribution globale de l'hydatidose humaine et animale.	15
FIGURE 2 : Cycle biologique du parasite <u>Echinococcus granulosus</u> .	16
FIGURE 3 : Morphologie du parasite.	18
FIGURE 4 : Le kyste hydatique.	19
FIGURE 5 : Traduction <u>in vitro</u> d'ARN d' <u>E.granulosus</u> en extrait de germes de blé - Détermination des conditions optimales : K+/Mg <sup>2+</sup> .	59
FIGURE 6 : Immunoprécipitation des produits de traduction <u>in vitro</u> d'ARN d' <u>E.granulosus</u> par différents sérums de patients hydatiques.	61
FIGURE 7 : Immunoprécipitation des produits de traduction <u>in vitro</u> d'ARN d' <u>E.granulosus</u> par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12.	63
FIGURE 8 : Sélection des clones recombinants.	67
FIGURE 9 : Test d'hybridation entre les clones recombinants Eg et l'ADN de l'insert du clone Eg6.	69
FIGURE 10 : Spécificité parasitaire du clone recombinant Eg6.	72

FIGURE 11 : Sous-clonage du clone Eg6 en vecteur M13 avant séquençage nucléotidique.	73
FIGURE 12 : Séquence nucléotidique et séquence peptidique correspondante du clone Eg6.	75
FIGURE 13 : Analyse de la séquence protéique déduite du clone Eg6.	77
FIGURE 14 : Analyse de la structure secondaire de la protéine déduite de la séquence nucléotidique du clone Eg6.	78
FIGURE 15 : Prédiction des déterminants antigéniques présents sur la protéine déduite de la séquence nucléotidique du clone Eg6.	79
FIGURE 16 : Caractérisation de la protéine de fusion PF6.	81
FIGURE 17 : Etude de la reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par des sérums de patients infestés par <u>E.granulosus</u> (Eg) ou par <u>E.multilocularis</u> (Em).	83
FIGURE 18 : Etude de la reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par différents sérums de patients atteints de distomatose, de bilharziose et de cysticercose.	85
FIGURE 19 : Reconnaissance de la protéine de fusion PF6 par l'anticorps monoclonal EG 02 154/12.	88

- FIGURE 20 : Reconnaissance des antigènes hydatiques par un sérum de patient hydatique spécifique de l'antigène 5 et par les anticorps humains sélectionnés sur le clone recombinant Eg6. 90
- FIGURE 21 : Séquences protéiques déduites de l'ADN des clones Eg6 et Eg14 et comparaison linéaire. 98
- FIGURE 22 : Répertoire des souches bactériennes et des vecteurs utilisés. 107
- FIGURE 23 : Séquençage nucléotidique basé sur l'utilisation de didéoxy-nucléotides et d'amorces fluorophores. 125

