

LES ANTIGENES DE *FASCIOLA HEPATICA*

Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres Helminthes.

Par JEAN BIGUET, ANDRÉ CAPRON et PHILIPPE TRAN VAN KY

Nous avons pu montrer, au cours de recherches préliminaires (Biguet et coll., 1960 et 1962), que l'étude immunochimique d'extraits de divers Trématodes, Nématodes et Cestodes permettait l'analyse structurale comparée de leur mosaïque antigénique et constituait, de ce fait, l'étude préparatoire indispensable à la purification des antigènes vermineux ou à l'isolement de fractions spécifiques réalisable par les techniques biochimiques modernes (Biguet et coll., 1961 ; Tran Van Ky et coll., 1961).

Le présent travail relate les résultats obtenus par l'étude électrophorétique et immunoélectrophorétique des antigènes de *Fasciola hepatica*.

Matériel et méthodes.

A. Matériel.

Antigènes.

Les douves sont prélevées dès l'abattage dans les foies de bœuf ou de mouton, lavées à l'eau trois fois, congelées puis lyophilisées. Le broyat obtenu par trituration mécanique à basse température de ces douves constitue l'antigène brut.

Après un nouveau broyage mécanique réfrigéré, l'antigène brut est soumis à une extraction par une solution de chlorure de sodium 0,018 M. Le surnageant clair obtenu après une centrifugation réfrigérée pendant une heure à 12.000 tours par minute est dialysé et lyophilisé. Cet extrait est dit standard. Dans les mêmes conditions, mais par extraction aqueuse, fut préparé un second antigène *F. hepatica*.

Divers antigènes, utilisés au cours de ce travail pour préciser les communautés antigéniques existant entre les Helminthes, furent préparés comme l'antigène *F. hepatica* standard. Ils ont intéressé les espèces suivantes : *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dentriticum*, *Taenia saginata*, *Echinococcus granulosus* (liquide, membrane et sable hydatique), *Ascaris lumbricoides*, *Onchocerca volvulus*, *Trichinella spiralis*.

Antisérums.

Les antisérums *Fasciola hepatica* ainsi que ceux des divers helminthes précités furent obtenus par immunisation des lapins selon la méthode de Freund (1944) * par l'injection hebdomadaire de 20 mg. d'antigène brut. Une excellente immunisation régulièrement suivie par immunoélectrophorèse fut généralement observée à partir du quatrième mois.

Nous avons pu également disposer, pour la comparaison des anticorps humains et des anticorps expérimentaux, de sérums de quelques malades atteints de distomatose hépatique à *Fasciola hepatica*.

B. Méthode d'étude et de fractionnement de l'antigène.

1) Microélectrophorèse en gélose (tampon véronal borate de pH 8,6).

Une séparation satisfaisante est obtenue en cinq heures sous un potentiel de 20 volts aux extrémités des lames ($7,5 \times 2,5$ cm.). Après fixation chimique, les protéines sont révélées par le vert de lissamine, les glycoprotéines selon la technique à l'acide périodique-réactif de Schiff, les lipoprotéines par le noir Soudan.

2) Electrophorèse en gel d'amidon.

Nous nous inspirons de la technique de Smithies (1959) en utilisant un appareil d'électrophorèse horizontal et le système tampon discontinu décrit par Poulik (1957). Cette méthode permet de réaliser une bonne séparation en 16 heures sous un potentiel de 100 volts aux extrémités du gel. Les fractions protéïdiques sont révélées par l'amidoschwarz.

3) Double diffusion en gélose.

Elle a été pratiquée suivant la technique d'Ouchterlony (1948) ou suivant sa modification préconisée par Abelev et Zvetkov (1960). Les immunosérums homologues ou hétérologues, normaux ou saturés, furent employés dans cette réaction.

4) Immunoélectrophorèse en gélose (tampon véronal borate de pH 8,6).

Après séparation électrophorétique, la révélation des diagrammes en gélose est obtenue à l'aide des immunosérums de lapin. Cette méthode d'une grande spécificité permet le dénombrement des fractions antigéniques entrant dans la constitution de la mosaïque antigénique complexe. L'application des immunosérums anti *F. hepatica* contre les antigènes hétérologues nous a renseigné sur le nombre et la localisation des fractions communes à *F. hepatica* et aux helminthes intéressés. L'identification de ces fractions communes a été précisée d'une part en appliquant les immunosérums préparés avec les autres antigènes vermineux, contre les antigènes *F. hepatica*, d'autre part en opposant l'antisérum *F. hepatica* à l'antigène homologue après l'avoir judicieusement saturé par les antigènes hétérologues.

* Adjuvant incomplet, sans mycobactéries.

5) Fractionnement de l'antigène par le sulfate d'ammonium.

Huit précipités (P 1 à P 8) sont obtenus par la méthode de relargage par le sulfate d'ammonium en combinant les gradients de concentration et les gradients de pH (Montreuil et coll., 1960). Le fractionnement est réalisé à 20° C. et chaque précipité obtenu est dialysé trois jours contre l'eau distillée à 4° C., puis lyophilisé.

6) Fractionnement de l'antigène par combinaison des techniques de Melcher (1943) et de Chaffée (1954) préconisée par Sadun * (1959).

Après délipidation à — 20° C. par l'éther anhydre, l'antigène est extrait par une solution tampon borate de sodium 0,1 M de pH 8,3, cette fraction alcaline totale (CM 3) étant elle-même séparée par ajustement à pH 4,8 en deux sous-fractions, acido-soluble (CM 4) et alcalino-soluble (CM 5).

Résultats.

Etude électrophorétique.

Elle n'a été réalisée que sur l'antigène standard *F. hepatica* **.

L'électrophorégramme en gélose individualise nettement sept fractions protéidiques. Le versant anodique est occupé par trois fractions dont deux sont

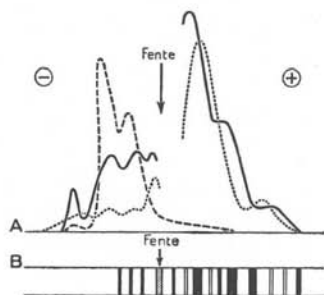


Figure 1. A. — Courbes densitométriques des protéinogramme (en trait plein), glycoprotéinogramme (en trait discontinu) et lipoprotéinogramme (en pointillé) en gélose de l'antigène standard de *F. hepatica*. B. — Schéma de l'électrophorèse en gel d'amidon de cet antigène révélée à l'amidoschwarz

majeures, le versant cathodique par quatre fractions dont une mineure et lente. Le glucoprotéinogramme est caractéristique ; il n'occupe que le versant cathodique du diagramme et se compose de deux fractions majeures parfaitement individualisées (fig. 1 A).

Le lipoprotéinogramme témoigne de la richesse non négligeable en lipides de l'antigène utilisé. Deux fractions dont une majeure se situent au versant anodique, les quatre autres fractions sont mineures et cathodiques (fig. 1 A).

* Par raison de commodité, nous parlerons dans la suite de ce travail du fractionnement suivant Sadun.

** Les dosages chimiques pratiqués sur une prise d'essai de 2 mg. de produit lyophilisé ont donné les résultats suivants : protéines : 16,5 % ; hexoses : 6,6 %.

L'électrophorèse en gel d'amidon de cet antigène standard révèle treize fractions dont les constituants majeurs occupent la partie moyenne du diagramme : trois fractions seulement s'individualisent dans la zone cathodique (fig. 1 B).

Analyse immunoélectrophorétique des antigènes standard et aqueux *F. hepatica*.

L'étude comparée des antigènes C1Na 0,018 M et aqueux ne met en évidence aucune différence notable dans leur constitution et leur mobilité. Seule

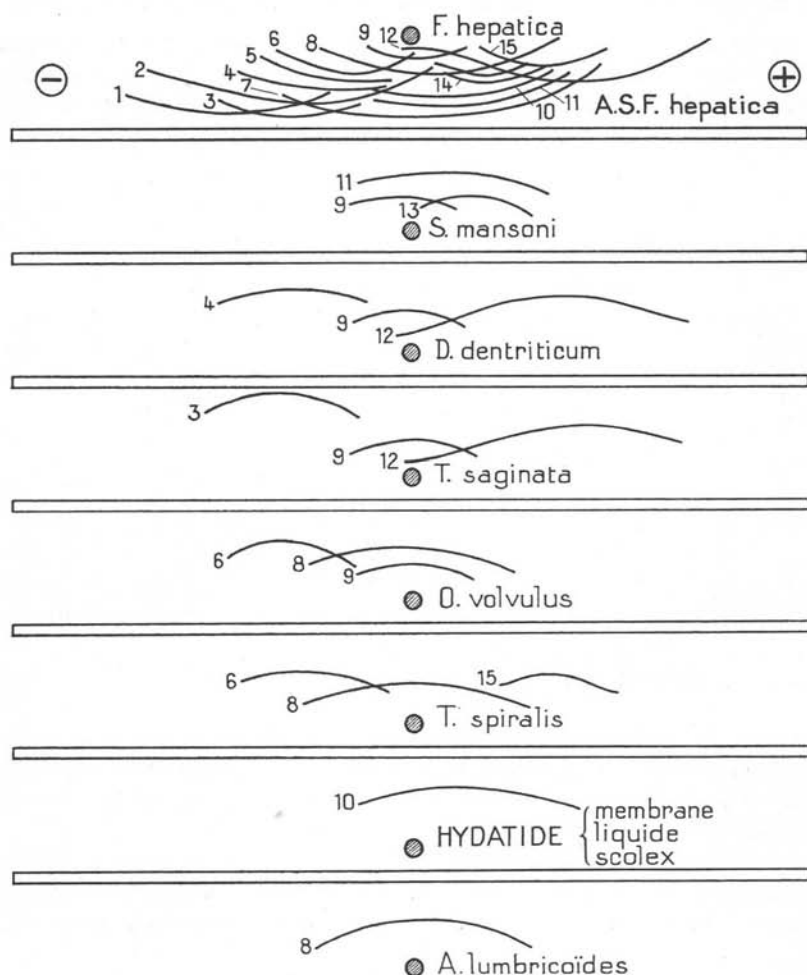


Planche I. — Analyse immunoélectrophorétique en gélose des antigènes de *F. hepatica* et de sept autres helminthes par un sérum de lapin anti *F. hepatica*

une notion de rendement supérieur et de qualité de l'image immunoélectrophorétique nous fait préférer l'extrait salé 0,018 M.

Dans les deux cas, quinze fractions antigéniques, dont treize majeures, sont individualisables et numérotées de 1 à 15 suivant leur position du versant cathodique au versant anodique (planche I, photo I).

Précisons que les fractions 8, 6 et 12 sont révélées nettement par le noir Soudan.

Réactions croisées et identification des fractions hétérologues.

L'analyse comparée des extraits standards de *F. hepatica* et des extraits standards des divers helminthes dont nous avons disposé a révélé entre eux une indéniable communauté antigénique. La planche I qui rassemble nos résultats autorise les commentaires suivants :

1° Les fractions communes entre *F. hepatica* et chaque espèce vermineuse sont peu nombreuses, mais elles sont diverses : sauf pour les antigènes hydatiques et *A. lumbricoides* qui n'en présente qu'une, on en compte généralement trois et ce chiffre est le maximum observé ; par contre, dix des quinze fractions identifiées chez *F. hepatica* interviennent dans les différentes communautés antigéniques.

Parmi les dix fractions, il en est deux qui jouent un rôle particulièrement important, la fraction 9 qui se retrouve chez *S. mansoni*, *D. dentriticum*, *T. saginata*, *O. volvulus*, et la fraction 8 présente dans les trois extraits de Nématodes *O. volvulus*, *A. lumbricoides*, *T. spiralis*.

2° La parenté antigénique objectivée par l'immunoélectrophorèse entre *F. hepatica* et les deux autres Trématodes (*D. dentriticum* et *S. mansoni*) n'est pas supérieure, contrairement à notre attente, à celle qu'on observe entre *F. hepatica* et les deux Cestodes ou les trois Nématodes étudiés.

3° Dans l'état actuel des comparaisons entreprises et sous réserve de recherches ultérieures intéressant d'autres helminthes, cinq fractions seulement sont spécifiques de *F. hepatica*, 1, 2 et 7 qui sont majeures et 5 et 14 qui sont mineures.

Valeur des fractionnements.

L'identification des fractions hétérologues de l'antigène standard terminée, nous avons discuté l'intérêt des modes de fractionnement que nous avons réalisés en ce qui concerne la spécificité antigénique :

1° Le fractionnement par le sulfate d'ammonium a donné huit précipités. La séparation obtenue n'est pas très satisfaisante. Seul le précipité P 4 est relativement enrichi en fractions spécifiques 1 et 2, mais reste souillé, partiellement au moins, par les fractions 11 (*S. mansoni*), 10 (antigènes hydatiques) et 12 (*T. saginata*, *D. dentriticum*).

2° Le fractionnement préconisé par Sadun et coll. pour la purification des antigènes *Paragonimus westermani* (1959 a) et *S. japonicum* (1959 b) et par Kagan, Pellegrino et Memoria pour *S. mansoni* (1961), conduit d'abord à l'antigène délipidé * (CM 3), puis à deux fractions, l'une acido-soluble (CM 4), l'autre alcalino-soluble (CM 5) (planche II, photo I). L'antigène délipidé CM 3 ne présente plus, opposé aux immunosérums anti *F. hepatica*, que neuf arcs de précipitation : ont été éliminés les arcs 3, 6, 8, 13, 14 et 15 *, qui correspondent tous à des fractions non spécifiques, à l'exception de la fraction 14 qui est

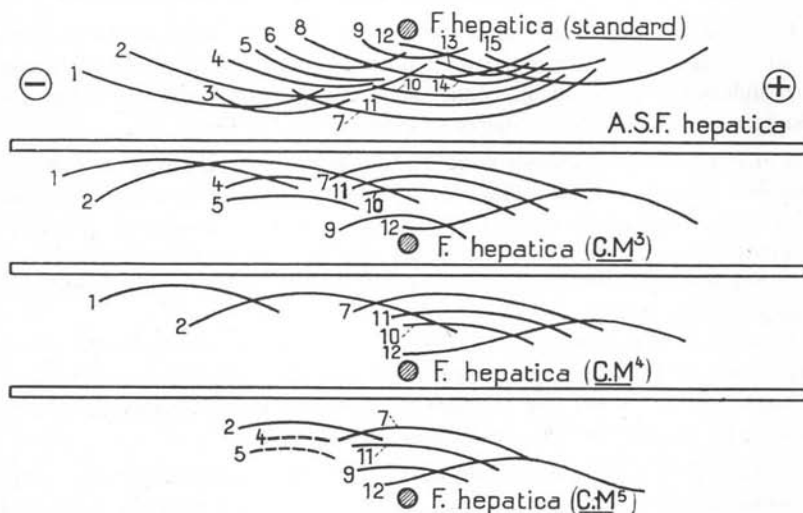


Planche II. — Etude immunoélectrophorétique en gélose de l'antigène *F. hepatica* après délipidation puis extraction par le tampon borate de sodium 0,1 M de pH 8,3. CM 3, fraction alcaline totale ; CM 4, fraction acido-soluble ; CM 5, fraction alcalino-soluble

d'ailleurs mineure dans les extraits non délipidés. La fraction CM 3 est donc déjà très purifiée par rapport à l'antigène standard. Il est vraisemblable que cette purification s'explique par une action dénaturante de l'éther qui n'extraît normalement que des graisses libres. L'action du tampon boraté de pH 8,3 ne peut être invoquée puisque la délipidation de l'extrait salé 0,018 M, que nous avons également réalisée à titre de contrôle, aboutissait exactement au même résultat. Des deux fractions CM 4 et CM 5, la première est la plus intéressante ; elle renferme totalement ou partiellement les fractions spécifiques 1, 2 et 7. Elle présente encore des réactions croisées avec *S. mansoni* (fraction 11), *T. saginata* et *D. dentriticum* (fraction 12) et les antigènes hydatiques (frac-

* Précisons que l'arc correspondant à la fraction 12 et qui se colore par le noir Soudan n'a pas disparu après la délipidation. Les lipides extraits par cette méthode (fraction CM 2) ne sont pas révélés par l'antisérum *F. hepatica*.

tion 10) ; toutefois, ces réactions croisées sont nettement atténuées et, de ce fait, la spécificité de la fraction CM 4 * nous apparaît plus étroite que celle de la fraction CM 5 d'une part et même de la fraction P 4 ; ajoutons encore que la valeur antigénique de CM 4 appréciée par la qualité de l'image immunoélectrophorétique qu'elle fournit s'avère nettement supérieure à celle des deux précédentes.

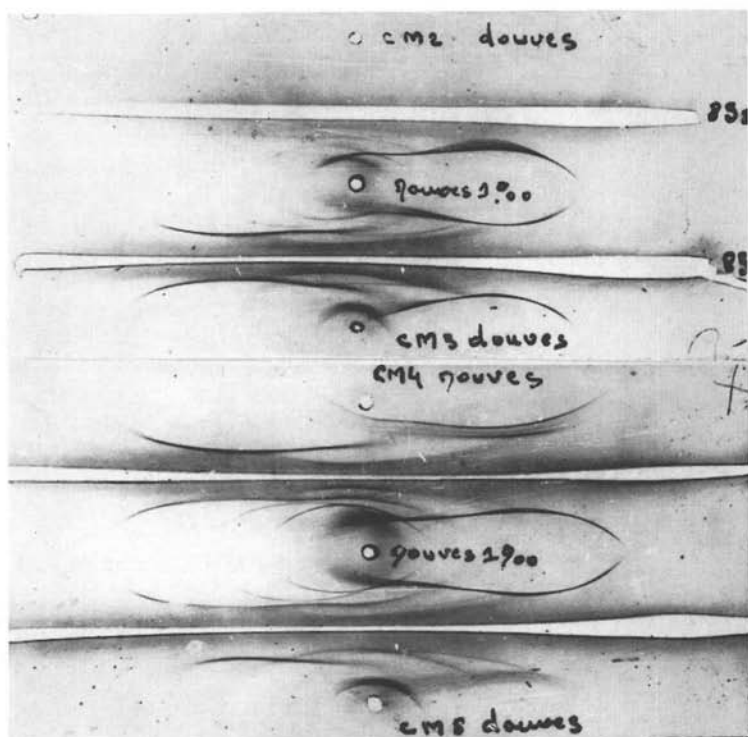


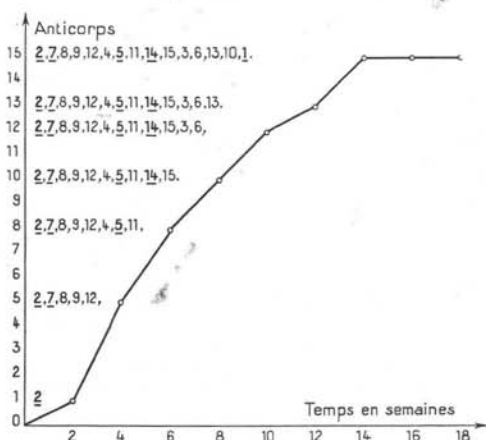
PHOTO I. — Immunoélectrophorèse en gélose des antigènes de *Fasciola hepatica* (standards et fractionnés suivant la technique de Sadun). révélés par un immunosérum anti *F. hepatica*. - CM 2 = fraction « lipidique ». - 1 % = extrait salé 0,018 M = antigène standard. - CM 3 = fraction antigène standard délipidée. - CM 4 = fraction acidosoluble. - CM 5 = fraction alcalinosoluble

* Il faut noter qu'un immuno-électrophorégramme, pratiquement identique à celui de CM 4, est donné par l'application des immunisérums contre un antigène d'incubation constitué par le produit de régurgitation cæcal et de métabolisme des douves placées à 37° pendant trois heures dans une solution salée à 9‰. Ce dernier antigène est toutefois plus réactif encore que CM 4 ; son étude est en cours d'achèvement.

Ordre d'apparition des anticorps expérimentaux.

Nous avons, par des prises de sang répétées de quinze en quinze jours, suivi l'apparition des anticorps expérimentaux (graphique I). On constate une brusque ascension du nombre des anticorps entre la fin de la seconde semaine et celle de la quatrième (d'un à cinq), puis une ascension modérée et proportionnelle au temps jusqu'à la fin de la quatorzième semaine, où le nombre maximum est atteint. L'arc 15 est mis en évidence à partir de la fin de la huitième semaine ; après la quinzième semaine, il n'apparaît plus que de façon inconstante.

On remarquera encore que la fraction 10, commune à l'antigène *F. hepatica* et aux trois antigènes hydatides (membrane, liquide, scolex), apparaît très tardivement.



Graphique I. — Ordre d'apparition des anticorps expérimentaux en fonction du temps d'immunisation. Les fractions « spécifiques » de *F. hepatica* sont soulignées

En ce qui concerne plus particulièrement les fractions spécifiques, il est surtout notable que la fraction majeure 2 soit la première à être révélée et ce dès la fin de la seconde semaine de l'immunisation, tandis que la fraction 1, également majeure, n'est mise en évidence qu'au dernier stade d'immunisation, à la fin de la quatorzième semaine ; enfin, la dernière fraction majeure 7 est objectivée à la fin du premier mois de l'immunisation. En dépit de la formation très rapide de l'anticorps correspondant à la fraction 2, il ne semblerait pas, par conséquent, que la production d'anticorps par l'organisme du lapin soit tellement orientée par les fractions antigéniques spécifiques, puisque, à la fin de la quatrième semaine, sont objectivés deux anticorps spécifiques sur cinq et trois anticorps non spécifiques sur dix.

Toutefois, les fractions dites spécifiques ne le sont que dans les limites des comparaisons actuellement entreprises, et des travaux ultérieurs menés avec de nouveaux helminthes nous conduiront certainement à en restreindre le nombre, ce qui limite la portée de la remarque précédente.

Comparaison des anticorps expérimentaux et des anticorps présents dans le sérum des patients atteints de distomatose à *F. hepatica*.

Si on révèle maintenant l'antigène distomien standard par les sérums de malades *, on observe deux à six arcs de précipitation, parmi lesquels trois majeurs correspondent, selon toute vraisemblance (planche III A), aux fractions 1, 2, 7. La technique d'Ouchterlony démontre l'identité immunologique de trois de ces anticorps avec les anticorps expérimentaux (planche III B).

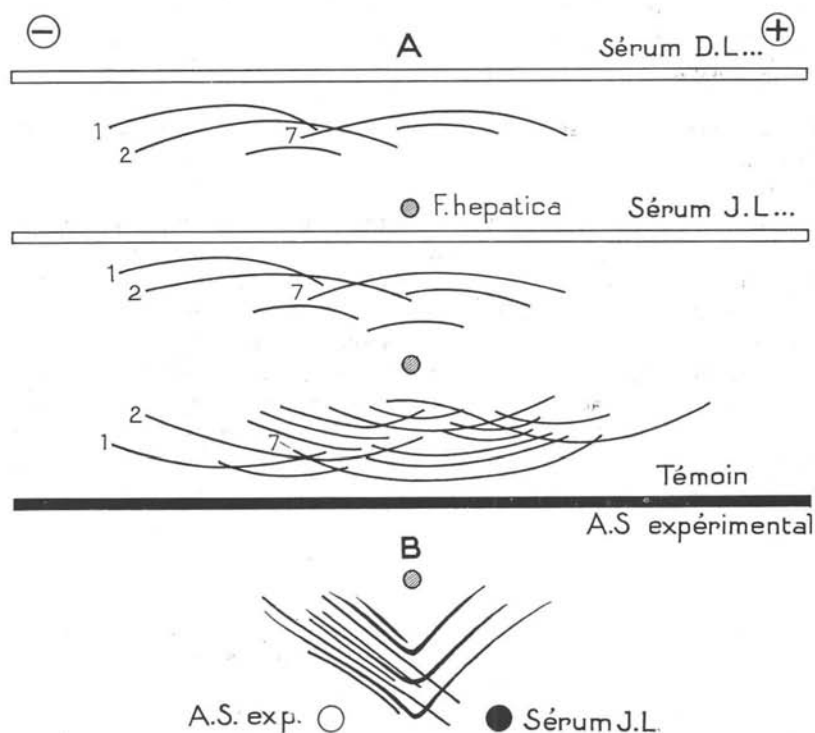


Planche III. A. — Etude immunoélectrophorétique en gélose des antigènes standard de *F. hepatica* révélés par les sérums des malades atteints de distomatose hépatique à *F. hepatica*. B. — Etude de l'identité des anticorps expérimentaux et des anticorps présents dans le sérum de ces malades par la technique d'Ouchterlony

L'intérêt pratique de nos constatations pour le diagnostic immunoélectrophorétique éventuel de la distomatose se trouve accru par le fait que, parmi les deux arcs qu'objectivent les sérums humains les moins immunisés, figure

* Nous donnerons des renseignements complémentaires concernant les résultats fournis par l'analyse des sérums de sujets atteints de distomatose dans une proche publication.

déjà celui qui correspond à la fraction spécifique 2 qui semble, de ce fait, douée d'un pouvoir antigénique remarquable, aussi bien au cours de l'immunisation naturelle de l'homme que de l'immunisation expérimentale du lapin.

RÉSUMÉ

L'analyse électrophorétique de l'extrait antigénique salé (0,018 M) de *F. hepatica* révèle sept fractions protéidiques, deux fractions glucidoprotéidiques et six fractions lipoprotéidiques, lorsqu'elle est effectuée en gélose, tandis que treize fractions protéidiques sont mises en évidence en gel d'amidon. Quinze fractions antigéniques sont objectivées par l'immunoélectrophorèse réalisée avec des sérums de lapin hyperimmunisés (technique de Freund). Dans les limites de notre expérimentation qui a intéressé sept espèces vermineuses, cinq fractions seulement sont spécifiques.

Pour réaliser une première purification de l'antigène *F. hepatica*, avant d'entreprendre son fractionnement chromatographique, furent effectués divers fractionnements, relargage par le sulfate d'ammonium et fractionnement après délipidation suivant Sadun. Les résultats les meilleurs furent obtenus avec la fraction acido-soluble de Sadun, qui reste cependant encore souillée de trois fractions aspécifiques. Parmi les fractions spécifiques, la fraction 2 paraît douée d'un pouvoir antigénique remarquable : l'anticorps qui lui correspond est le premier à apparaître au cours de l'immunisation expérimentale du lapin que nous avons analysé en fonction du temps ; il est, d'autre part, l'un des deux premiers qui se manifestent au cours de la distomatose hépatique humaine, dont l'éventuel diagnostic précoce par la technique immunoélectrophorétique mérite de ce fait d'être envisagé et étudié.

BIBLIOGRAPHIE

- ABELEV (G. I.) et ZVETKOV (U. S.), 1960. — Extraction d'un antigène spécifique d'hépatome transplantable de souris par la méthode d'immunofiltration. *Voprosy Onkologii*, 6, 57 (en russe).
- BIGUET (J.), CAPRON (A.), TRAN VAN KY (P.) et D'HAUSSY (R.), 1962. — Etude immuno-électrophorétique comparée des antigènes de divers helminthes. *C.R. Acad. Sc.*, 254, 3600.
- BIGUET (J.), HAVEZ (R.), TRAN VAN KY (P.) et DEGAEY (R.), 1961. — Etude électrophorétique, chromatographique et immunologique des antigènes de *Candida albicans*. *Ann. Inst. Past.*, 100, 13.
- BIGUET (J.), ROSE (F.) et HAVEZ (R.), 1960. — Les possibilités d'application de l'immuno-électrophorèse à l'étude des fractions antigéniques des helminthes. *C.R. Acad. Sc.*, 251, 982.
- CHAFFEE (E. F.), BAUMAN (P. M.) et SHAPILO (J. J.), 1954. — Diagnosis of Schistosomiasis by complement fixation. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 3, 905.
- FREUND (J.) et BONANTO (M. V.), 1944. — Effect of paraffin oil, lanolin like substance and killed tubercle bacille on immunization with diphtheria toxoid and *Bacterium typhosum*. *J. Immuno.*, 48, 325.

- KAGAN (I. G.), PELLEGRINO (J.) et MEMORIA (J. M. P.), 1961. — Studies on the standardization of the intradermal test for the diagnosis of bilharziasis. *Amer. Jl. Trop. Med. Hyg.*, 10, 200.
- MELCHER (L. R.), 1943. — An antigenic analysis of *Trichinella spiralis*. *Jl. Infect. Dis.*, 73, 31.
- MONTREUIL (J.), CHOSSON (A.), HAVEZ (R.) et MULLET (S.), 1960. — Isolement de β 2 A-globulines du lait de femme. *C.R. Soc. Biol.*, 154, 732.
- OUCHTERLONY (O.), 1948. — Antigen-antibody reactions in gels. *Ark. Kemi.*, 26, 1.
- POULIK (M. D.), 1957. — Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, 180, 1477.
- SADUN (E. H.), BUCK (A. A.) et WALTON (B. C.), 1959. — The diagnosis of *Paragonimiasis westermani* using purified antigens in intradermal and complement fixation tests. *Military Med.*, 124, 187.
- SADUN (E. H.), LIN (S. S.) et WALTON (B. C.), 1959. — Studies on the host parasite relationships to *Schistosoma japonicum*. III. The use of purified antigens in the diagnosis of infections in human and experimental animals. *Military Med.*, 24, 428.
- SMITHIES (O.), 1959. — An improved procedure for starch gel electrophoresis. Further variations in the serum proteins of normal individuals. *Bioch. J.*, 75, 585.
- TRAN VAN KY (P.), BIGUET (J.) et ANDRIEU (S.), 1961. — Isolement chromatographique d'une fraction antigénique spécifique de *Candida albicans*. *C.R. Acad. Sciences*, 253, 2.288.

(Travail du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté mixte de Médecine
et de Pharmacie de Lille)