ÉTUDE PAR LA RÉACTION D'IMMUNOFLOUORESCENCE DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DE *SCHISTOSOMA MANSONI*

II. Chez le sujet bilharzien

M. F. SAUNERON, M. APPRIOU, Ch. RIPERT,
J. TRIBOULEY-DURET et J. TRIBOULEY*

RÉSUMÉ. Les anticorps dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal de *S. mansoni* sont étudiés chez 2 230 sujets de différentes classes d'âge, vivant en zone d'endémie bilharzienne, à l'aide d'une réaction d'immunofluorescence utilisant comme antigène des coupes de Ver adulte de *S. mansoni* préalablement fixé par le fixateur de Rossman.

Les anticorps de classe IgM mis en évidence sont d'apparition précoce : présents à des taux élevés dans les infestations récentes, ils sont néanmoins encore décelables dans les infestations chroniques quoique à des taux beaucoup plus faibles.

L'étude de plusieurs foyers d'infestation bilharzienne différant par l'importance de l'endémie met en évidence une relation inverse entre la prévalence des anticorps et l'importance de l'endémie bilharzienne. Un effet de tolérance spécifique pourrait expliquer cette constatation ainsi que la faible prévalence des anticorps chez le très jeune enfant.

Excellente chez le sujet bilharzien non traité, la spécificité de la réaction est médiocre chez le sujet traité en raison de la longue persistance des anticorps après traitement.

Study of fluorescent antibodies directed against the gut epithelium of *Schistosoma mansoni*. II. In Schistosome infected patients.

SUMMARY. Specific IgM antibodies to antigens present in the epithelial cells of the gut of adult *S. mansoni* were measured in 2 230 persons living in areas of different levels of endemicity. Significant differences were found in the prevalence of IgM antibodies in the infected patients of the compared bilharziasis foci : lower prevalences were found in high endemic foci, involving the possibility of a tolerance phenomenon.

Dans une précédente étude effectuée chez la Souris expérimentalement infestée par *Schistosoma mansoni* (7) nous avons montré l'intérêt de la mise en évidence

* Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Université de Bordeaux II, 146 rue Léo-Saignat, F 33076 Bordeaux Cedex.

Accepté le 6 mars 1984.

d'anticorps de classe IgM dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal du Ver adulte à l'aide d'une réaction d'immunofluorescence effectuée suivant la méthode de Nash (4). La réaction pratiquée sur des coupes de Ver adulte de *Schistosoma mansoni* préalablement fixé présente l'avantage de mettre en évidence des anticorps dirigés contre des structures définies, de nature essentiellement polysaccharidiques et localisées au niveau de l'épithélium intestinal du parasite, les autres structures antigéniques ayant été dénaturées par le fixateur, ce qui permet d'espérer une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité. Dans le présent travail on se propose d'étudier par la même méthode la réactivité de l'organisme humain vis-à-vis de ces antigènes en se fondant sur la réponse en anticorps de classe IgM.

Matériel et méthodes

La réaction pratiquée

C'est une réaction d'immunofluorescence indirecte utilisant comme antigène des coupes de Vers femelles de *S. mansoni* préalablement fixés par le fixateur de Rossman suivant la méthode de Nash (4, 7). La réaction est effectuée à l'aide d'un conjugué anti IgM* sur les échantillons à examiner dilués en progression géométrique à partir d'une dilution initiale au 1/10.

Les échantillons étudiés

Ils comportent des sérums obtenus à partir de prélèvements sanguins recueillis par ponction veineuse ainsi que des échantillons de sang sec recueillis sur papier en zone d'endémie.

Les sérums étudiés comprennent d'une part 51 sérums provenant de sujets atteints de bilharziose intestinale à *S. mansoni* parasitologiquement confirmée et d'autre part des prélèvements effectués chez 3 Européens s'étant infestés lors d'un séjour en zone d'endémie et pour lesquels la date de contamination probable a pu être précisée. Parallèlement sont examinés les sérums prélevés chez 500 sujets n'ayant jamais séjourné en zone d'endémie et apparemment indemnes de toute affection parasitaire ainsi que 25 sérums de sujets atteints de distomatose à *Fasciola hepatica*, 33 sérums prélevés chez des sujets atteints d'hydatidose et 10 sérums de sujets porteurs de *Strongyloides stercoralis*.

Les échantillons de sang sec prélevés sur papier ont été obtenus dans le cadre de 3 enquêtes épidémiologiques réalisées dans 3 foyers d'infestation bien distincts : un à *S. mansoni*, un à *S. haematobium* et un foyer d'infestation mixte. Le foyer d'infestation par *S. mansoni*** comprend 755 échantillons dont 55 correspondant à des sujets dont l'infestation a été parasitologiquement confirmée. Il s'agit donc

* Conjugué anti-IgM Nordic dilué au 1/80 en tampon PBS pH 7,2 additionné de Bleu d'Evans au 1/10 000.

** Foyer d'infestation à *S. mansoni* : situé dans la zone des Caraïbes Guadeloupe.

d'un foyer où l'endémie est faible. Le foyer d'infestation par *S. haematobium** comporte 762 prélèvements dont 117 correspondent à des sujets pour lesquels l'infestation a été parasitologiquement confirmée. Il s'agit d'un foyer où l'endémie est d'intensité moyenne. Le foyer d'infestation mixte** comporte l'examen de 662 échantillons prélevés chez des sujets pour lesquels les examens parasitologiques ont confirmé l'infestation par la seule espèce *S. mansoni* pour 102 d'entre eux, par la seule espèce *S. haematobium* pour 148 d'entre eux et par les deux espèces pour 114 d'entre eux. Il s'agit donc d'un foyer de forte endémie bilharzienne.

Résultats

Sérums de sujets atteints de bilharziose à *Schistosoma mansoni*

Parmi les 51 sérums prélevés chez des sujets atteints de bilharziose à *S. mansoni* dont l'infestation a été parasitologiquement confirmée 44 donnent lieu à une réaction positive, soit un pourcentage de positivité de 86 %. Les titres en anticorps observés sont compris entre le 1/10 et le 1/2560.

La recherche des anticorps chez 3 sujets européens dont la date de contamination survenue lors d'un séjour de courte durée en zone d'endémie a pu être déterminée de façon suffisamment précise, permet de situer dans ces cas privilégiés le délai d'apparition des anticorps à moins de 6 semaines après l'infestation. Ces 3 sujets ont été traités par l'Oxamniquine ; à la suite du traitement une élévation du titre en anticorps est observée qui passe pour l'un d'entre eux du 1/1280 au 1/20480, un mois après la fin du traitement. L'un des malades a pu être suivi pendant une longue période après traitement : 1 an après, les anticorps sont toujours présents au titre élevé du 1/5120.

Échantillons de sang sec prélevés en zone d'endémie bilharzienne

Parmi les 55 sujets parasitologiquement confirmés du foyer de bilharziose à *S. mansoni*, 47 ont des anticorps soit un pourcentage de positivité voisin de 85 %. Dans le foyer à *S. haematobium* le pourcentage de positivité s'élève à 68 % mais il n'est que de 48 % dans le foyer d'infestation mixte. La comparaison des titres sérologiques moyens*** des 3 zones d'endémie étudiées met en évidence une évolution parallèle à celle des pourcentages. De plus, la comparaison des deux paramètres précédents avec les pourcentages de sujets excréant des œufs dans les 3 foyers, montrent que ces 2 paramètres diminuent quand le pourcentage de sujets excréant des œufs augmente (tableau I).

* Foyer d'infestation à *S. haematobium* : situé en Haute-Volta.

** Foyer d'infestation mixte : situé dans les monts du Mandara (Nord-Cameroun).

*** Titre sérologique moyen. Les sérums négatifs sont affectés de la valeur 0, les sérums positifs au 1/10 de la valeur 1 et les dilutions suivantes du 1/20, 1/40, 1/80 ... des valeurs correspondantes 2, 3, 4, ... La moyenne arithmétique de ces valeurs exprime le titre sérologique moyen.

TABLEAU I. — Pourcentages de positivité de la réaction d'immunofluorescence et titre sérologique moyen chez des sujets parasitologiquement confirmés dépistés dans 3 foyers bilharziens différents.

	Foyer à <i>S. mansoni</i>	Foyer à <i>S. haema- tobium</i>	Foyer mixte <i>S. mansoni</i> <i>S. haema- tobium</i>
Pourcentage de sujets éliminant des œufs	7,2 % (55/755)	15,3 % (117/762)	54 % (364/662)
Pourcentage de positivité de la réaction d'I.F. chez des sujets parasitologiquement confirmés	85,4 % (47/55)	68 % (80/117)	47 % (174/364)
Titre sérologique moyen des sujets parasitologiquement confirmés	3,09 ± 0,29	1,92 ± 0,17	1,19 ± 0,09

La détermination dans chaque tranche d'âge des pourcentages de positivité par rapport à la totalité des échantillons prélevés, qu'ils correspondent ou non à des sujets bilharziens parasitologiquement confirmés, permet par ailleurs d'étudier la cinétique de la réponse anticorps dans chaque foyer d'endémie. Les résultats rapportés sur la *figure 1* confirment la précocité d'apparition des anticorps, bien que des variations soient néanmoins observées en fonction des foyers étudiés : les pourcentages de positivité les plus élevés se situent entre 5 et 15 ans dans le foyer mixte et le foyer à *S. haematobium*, il est un peu plus tardif pour le foyer à *S. mansoni*. Dans les tranches d'âge plus avancées les pourcentages de positivité diminuent pour ensuite se stabiliser à des valeurs à peu près identiques pour les 3 zones étudiées. Le titre sérologique moyen présente une évolution analogue (*figure 2*)*.

De plus, la détermination, dans chaque tranche d'âge, des pourcentages de positivité calculés par rapport au nombre de sujets éliminant des œufs permet de constater que dans ces conditions le maximum d'enfants élaborant des anticorps se situe comme précédemment entre 5 et 15 ans ; néanmoins, on remarque que parmi les enfants très jeunes, de moins de 5 ans, éliminant des œufs, peu d'entre eux élaborent des anticorps (*figure 3*).

Sérums de sujets indemnes de bilharziose

Cinq cents sérums de sujets ne s'étant jamais rendus en zone d'endémie et apparemment indemnes de toute affection parasitaire se sont tous révélés négatifs. D'autre part les sérums de malades atteints de distomatose à *Fasciola hepatica*, de strongyloïdose que nous avons examinés se sont tous révélés négatifs. En outre les résultats obtenus au cours des trois enquêtes épidémiologiques décrites dans ce travail n'ont permis d'établir aucune corrélation entre la présence d'anticorps et la découverte de divers parasites dans les selles : *Tenia*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris*, *Necator*.

* La comparaison des pourcentages par le test du χ^2 et des moyennes par le test t de Student montre que les différences observées sont statistiquement significatives ($P < 0,01$).

FIG. 1. — Pourcentages de sujets présentant des anticorps de classe IgM en fonction de l'âge dans 3 foyers d'endémie bilharzienne.

FIG. 2. — Évolution du titre en anticorps de classe IgM en fonction de l'âge (population globale).

FIG. 3. — Étude des pourcentages de positivité en fonction de l'âge chez les sujets parasitologiquement confirmés.

Discussion

Sensibilité de la réaction

La recherche des IgM dirigées contre les structures antigéniques de l'épithélium intestinal de *S. mansoni* est positive pour environ 85 % des sérums et des échantillons de sang sec prélevés chez des sujets atteints de bilharziose intestinale à *S. mansoni* parasitologiquement confirmée. Cette valeur est tout à fait comparable aux résultats récemment rapportés dans une étude multicentrique de l'O.M.S. où est soulignée la bonne réactivité, vis-à-vis de l'antigène homologue, des sérums de sujets atteints de bilharziose à *S. mansoni* (3). Mais il est noté dans la même étude que la réactivité vis-à-vis de l'antigène *S. mansoni*, de sérums de sujets infestés par *S. japonicum*, est nettement plus faible et ne dépasse pas 54 %. Nous pouvons rapporter un phénomène analogue avec les sérums de sujets infestés par *S. haematobium* qui, examinés dans les mêmes conditions, ne donnent lieu qu'à 68 % de réactions positives. La diminution du taux de positivité observée chez les sujets infestés par *S. haematobium* peut donc être rapportée à l'utilisation d'un antigène hétérologue, mais l'hypothèse d'une réactivité différente de l'organisme doit être également envisagée. En effet Niel *et al.*, utilisant des coupes à la congélation, signalent que le marquage digestif détectable avec les sérums de sujets atteints d'infestation récente disparaît pour les infestations anciennes à *S. haematobium* alors qu'il persiste fréquemment chez les sujets atteints d'infestation à *S. mansoni* (6). C'est pourquoi nous avons été conduits à préciser la cinétique de la réponse anticorps dans les trois foyers considérés. Les résultats que nous avons obtenus, confirmant ceux rapportés par différents auteurs (5, 9), montrent que les anticorps apparaissent de façon précoce et qu'ils persistent

longtemps puisqu'ils sont encore présents chez 20 à 30 % des adultes au-delà de 50 ans, mais à des taux beaucoup plus faibles. Bien qu'un certain décalage puisse être noté pour le foyer à *S. mansoni*, cette évolution est sensiblement la même dans les trois foyers et ne sauraient donc rendre compte des différences observées entre les taux de positivité, les pyramides des trois populations de sujets examinés étant par ailleurs assez semblables.

Il faut souligner d'autre part que pour les trois foyers que nous avons étudiés il semble exister une relation inverse entre la prévalence des anticorps et l'importance de l'endémie bilharzienne. Une constatation du même ordre est rapportée par Nash comparant différents groupes de sujets infestés par *S. mansoni* : il note une relation inverse entre le taux d'excrétion des œufs et le taux des anticorps IgM dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal du parasite (5). Il faut rappeler à ce propos que ces antigènes sont des structures relarguées dans la circulation sanguine où elles sont retrouvées sous forme d'antigènes circulants, soit libres, soit combinés à des anticorps sous forme d'immunocomplexes (1). Dans le cas d'infestations massives, on peut ainsi envisager un excès d'antigènes circulants neutralisant les anticorps correspondants qui ne sont plus décelables. Ce pourrait être une explication des faibles prévalences des anticorps que nous avons rapportées dans le foyer mixte, zone de forte endémie bilharzienne où l'infestation est parasitologiquement confirmée chez plus de la moitié des sujets examinés. On peut aussi invoquer un état de tolérance spécifique expliquant la baisse de réactivité de l'organisme à la suite d'une stimulation antigénique intense ou de longue durée telle qu'on peut l'observer au cours d'une infestation chronique (5). Les antigènes de l'épithélium intestinal du schistosome sont en effet principalement des structures polysaccharidiques et il est bien connu que pour les antigènes polysaccharidiques les doses tolérogènes sont à peine supérieures aux doses immunogènes. Les phénomènes de tolérance sont connus au cours des bilharzioses et c'est par un tel mécanisme qu'est généralement expliquée la décroissance des réactions d'hypersensibilité cellulaire responsables du granulome bilharzien (10). Enfin il a été récemment démontré par Carlier *et al.* que les antigènes circulants sont susceptibles de franchir la barrière placentaire (1), ce mécanisme peut être invoqué pour expliquer une tolérance néonatale responsable de la faible réactivité des très jeunes enfants. Un tel phénomène a été décrit chez l'animal expérimentalement infesté pour les antigènes ovulaires responsables du granulome bilharzien (2).

Spécificité

L'examen d'un grand nombre de sérums normaux et de sérums ou échantillons de sang sec prélevés chez des sujets indemnes de bilharziose, atteints de parasitoses diverses, met en évidence l'excellente spécificité de la réaction chez le sujet non traité, confirmant les premières observations de Nash (4).

Ayant pu suivre l'évolution des anticorps chez un petit nombre de sujets traités, nous n'avons pu assister ni à la négativation ni même à une baisse significative de leur taux. Chez le sujet traité la spécificité de la réaction est médiocre ainsi qu'il est souligné dans une étude multicentrique conduite par l'O.M.S. (3). On admet géné-

ralement que les tests sérologiques utilisant des extraits ovulaires sont les plus aptes à apprécier l'efficacité de la thérapeutique instituée. C'est ainsi que chez la Souris traitée par le Praziquantel les réactions sérologiques effectuées à l'aide d'antigènes ovulaires se négativent en moins d'un an (8).

BIBLIOGRAPHIE

1. CARLIER Y., NZEYIMANA H., BOUT D., CAPRON A. : Evaluation of circulating antigens by a sandwich radioimmunoassay, and of antibodies and immune complexes, in *Schistosoma mansoni* infected African parturients and their newborn children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1980, 29, 74-81.
2. LEWERT R. M., MANDLOWITZ S. : Schistosomiasis : prenatal induction of tolerance to antigens. *Nature*, 1969, 224, 1029-1030.
3. MOTT K. E., DIXON H. : Collaborative study on antigens for immunodiagnosis of schistosomiasis. *Bull. Org. Mond. Santé*, 1982, 60, 729-753.
4. NASH T. E. : Antibody response to a polysaccharide antigen within the gut of *Schistosoma mansoni*. I Sensitivity and specificity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 938-943.
5. NASH T. E., OTTESEN E. A., CHEEVER A. W. : Antibody response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. II Modulation of antibody response. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1978, 27, 944-950.
6. NIEL G., RICHARD-LENOBLE D., GENTILINI M. : Deux aspects particuliers du marquage fluorescent sur coupes à la congélation de *Schistosoma mansoni* au cours des Trichinoses et des Bilharzioses. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1976, 69, 151-156.
7. TRIBOULEY J., TRIBOULEY-DURET J., APPRIOU M., SAUNERON M. F. : Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni*. I Chez la Souris expérimentalement infestée. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1983, 58, 31-41.
8. TRIBOULEY J., TRIBOULEY-DURET J., LACASSIE I., APPRIOU M., SAUNERON M. F. : Mise en évidence des anticorps dirigés contre les antigènes ovulaires au cours de la bilharziose à *Schistosoma mansoni*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 1983, 76, 514-525.
9. VAN HELDEN H. P. T., TERPSTRA W. J., OKOT-KOTBER B. M., EYAKUZE V. M. : Are there stage-characteristic immunofluorescence patterns in schistosomiasis ? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1975, 69, 309-311.
10. WARREN K. S. : Immunology. In : Schistosomiasis - Epidemiology, Treatment and control. (P. Jordan and G. Webbe, eds). *William Heineman Medical Books*, London, 1982.