

**ÉTUDE PAR LA RÉACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE  
DES ANTICORPS DIRIGÉS CONTRE LES ANTIGÈNES  
DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL DE *SCHISTOSOMA MANSONI*  
III — Étude de la réactivité d'un anticorps monoclonal**

M. APPRIOU\*, J. TRIBOULEY-DURET\*\*, J. TRIBOULEY\*

**RÉSUMÉ.** Un anticorps monoclonal de souris de classe IgM dirigé contre un épitope de l'épithélium intestinal du ver adulte est sélectionné et son aptitude à détecter les antigènes parasitaires présents dans l'organisme infesté est testé.

Un antigène parasitaire peut-être ainsi mis en évidence au niveau des urines de hamsters et de souris infestés où son taux est en rapport étroit avec la charge parasitaire.

La structure antigénique détectée est thermostable, soluble dans l'acide trichloracétique, n'est pas détruite par la protéinase K, mais elle est détruite par le métaperiodate. Spécifique du genre *Schistosoma*, elle est présente au niveau des différents stades évolutifs du parasite, en particulier au niveau de l'œuf où elle est particulièrement abondante.

**Study of fluorescent antibodies directed against the gut epithelium of *Schistosoma mansoni*.**

**III. Studies on the reactivity of a monoclonal antibody.**

**SUMMARY.** A monoclonal mouse antibody of IgM class was raised against an epitope of the gut epithelium of the adult worm and was applied to the detection of antigen in parasite infection.

The antigen was found in urine from mice and hamsters infected with *Schistosoma mansoni*; a good correlation between the concentration of antigen and worm burden was observed.

The antigen was thermostable, soluble in trichloroacetic acid; it was not hydrolysed by proteinase K but it was destroyed by metaperiodate.

The antigen was shown to be *Schistosoma* genus specific. It was found in different developmental stages of the parasite. High levels were detected in egg extracts.

Nous avons précédemment analysé la réponse immunitaire de l'organisme infesté vis-à-vis des antigènes de l'épithélium intestinal du ver adulte *Schistosoma mansoni* et nous avons pu nous rendre compte que la réaction d'immunofluorescence, en dépit de sa sensibilité et de sa spécificité, se trouve parfois prise en défaut : longue

\* Laboratoire d'Immunologie et Biologie Parasitaire de l'U.E.R. Médicale I de l'Université de Bordeaux II, 146, rue Léo-Saignat, F 33076 Bordeaux Cedex.

\*\* Laboratoire d'Immunologie de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Bordeaux II, 3, place de la Victoire, F 33076 Bordeaux Cedex.

Accepté le 26 décembre 1985.

persistance des anticorps après élimination du parasite, phénomène de tolérance immunologique observé au cours d'infestations massives et chez le jeune (24). C'est pourquoi on s'est attaché dans le présent travail à la mise en évidence directe dans l'organisme infesté des antigènes de l'épithélium intestinal du parasite. Des études antérieures ont en effet démontré l'excrétion de telles structures par le parasite ainsi que leur présence au niveau du sang circulant et éventuellement des urines des organismes infestés. Leur mise en évidence peut être tentée à l'aide d'immun-sérums polyclonaux mais ces réactifs sont de spécificité et de réactivité extrêmement variables ; afin de disposer d'un réactif de spécificité et de réactivité bien déterminées, on s'est proposé de préparer un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de l'épithélium intestinal du ver adulte et de tester sa spécificité ainsi que son aptitude à détecter les antigènes parasitaires.

## Matériel et méthodes

### **1 - Obtention d'un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope de l'épithélium intestinal du ver adulte de *Schistosoma mansoni*.**

Des souris BALB/C infestées par 500 cercaires de *Schistosoma mansoni* sont traitées à la 8<sup>e</sup> semaine d'infestation par du Praziquantel à raison de 600 mg/kg par voie orale ; le même traitement est renouvelé trois jours plus tard. Les cellules spléniques recueillies au cinquième jour après le début du traitement sont fusionnées avec des cellules myélomateuses de la lignée P3 X63 Ag8.653 suivant la technique de Fazekas de Saint-Groth et de Scheidegger (16). Les hybridomes producteurs d'anticorps contre les structures de l'épithélium intestinal du ver adulte sont sélectionnés par une réaction d'immunofluorescence effectuée suivant les modalités précédemment décrites (29). Le clonage de 11 hybridomes sécrétant l'anticorps étudié nous a conduit à retenir un hybridome stable depuis 18 mois, sécrétant un anticorps de classe IgM, type lambda. L'anticorps monoclonal est obtenu soit à partir de surnageants de cultures cellulaires de l'hybridome, soit à partir de fluides ascitiques recueillis chez la souris BALB/C traitée par une injection intrapéritonéale de 0,5 ml de Pristane 8 à 10 jours avant l'injection des cellules.

### **2 - Antigènes étudiés**

#### ANTIGÈNES DU SCHISTOSOME

*Antigènes de vers adultes.* Le ver adulte utilisable pour la réaction d'immunofluorescence est constitué par des coupes à la paraffine de vers préalablement fixés au fixateur de Rossman suivant une méthode précédemment décrite (29). Les antigènes de vers adultes d'autres espèces de Schistosomes : *S. haematobium*, *S. bovis*, *S. intercalatum* sont testés par la même réaction. Plusieurs extraits de ver adulte de *Schistosoma mansoni* sont testés par ailleurs : extrait antigénique brut, extrait antigénique précipité au sulfate d'ammonium obtenu en mélangeant un volume d'antigène brut à un égal volume d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, (le sur-

nageant obtenu après centrifugation et dialysé contre NaCl 0,15 M étant utilisé comme antigène), extrait délipidé par l'alcool éther (21).

*Antigènes ovulaires de Schistosoma mansoni.* Une suspension d'œufs purifiée est préparée par centrifugation d'un broyat de foies de hamsters infestés contre une barrière de densité constituée par une solution de Percoll\* à 20 % suivant un protocole que nous avons précédemment décrit (4). Un antigène ovulaire figuré constitué par une suspension d'œufs en NaCl 0,15 M est utilisé pour la réalisation de la réaction de précipitation péri-ovulaire (20). Pour la réaction d'immunofluorescence des coupes à la paraffine de foies de hamsters infestés sont utilisées. Deux types d'extraits antigéniques ovulaires sont préparés : extrait brut, extrait ovulaire précipité par le sulfate d'ammonium suivant une méthode analogue à celle utilisée pour les vers adultes.

*Antigènes de miracidium de Schistosoma mansoni.* Des œufs de *Schistosoma mansoni* très soigneusement lavés sont mis en suspension dans 3 à 4 ml d'eau de source et mis à éclore sous lumière artificielle à 27° C. L'antigène figuré est constitué par une suspension de miracidiums vivants dans l'eau. Un antigène d'incubation est également obtenu en maintenant des miracidiums éclos pendant 3 heures dans l'eau à 27° C, la suspension est alors centrifugée et le surnageant recueilli.

*Antigènes de cercaires de Schistosoma mansoni.* Un antigène figuré utilisable pour la réaction d'immunofluorescence est constitué par des coupes d'hépatopancréas de Planorbes infestés fixés par le fixateur de Rossman et traités par les méthodes histologiques classiques. Un extrait antigénique de cercaires est obtenu en désintégrant 4 ml d'une suspension à 10 000 cercaires/ml par pressage à haute pression (13 t/cm<sup>2</sup>) et à basse température (— 70° C) à l'aide d'une Hughes Press.

*Antigènes de schistosomules de Schistosoma mansoni.* Des schistosomules sont recueillies au niveau de poumons de souris infestées et la suspension obtenue est purifiée par centrifugation sur un gradient discontinu de Percoll suivant la technique de Lazdins (19). Les schistosomules sont utilisées sous forme d'antigène figuré (suspensions de schistosomules vivantes ou fixées par le formol à 20 %) ou d'extrait antigénique obtenu par broyage au broyeur de Potter.

#### ANTIGÈNES D'HELMINTHES, PROTOZOAIRES ET AUTRES MICROORGANISMES.

Des extraits bruts de diverses espèces d'helminthes sont testés : *Ascaris lumbricoides*, *Dipetalonema vitae*, *Trichinella spiralis*, *Fasciola hepatica*, *Taenia saginata* ainsi que du liquide de ponction de kystes d'*Echinococcus granulosus*. Différentes préparations de Protozoaires et autres microorganismes sont testées par ailleurs par la réaction d'immunofluorescence : *Entamoeba histolytica*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania infantum*, *Trypanosoma equiperdum*, *Rickettsia conori*, *Candida albicans*, *Brucella abortus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

\* Pharmacia Fine Chemicals, Upsaala, Sweeden.

URINES EN PROVENANCE D'ORGANISMES INFESTÉS PAR *Schistosoma mansoni*.

Des urines de hamsters et de souris infestés par différentes doses de cercaires sont prélevées à différentes dates de l'infestation.

## STANDARDISATION DES EXTRAITS ANTIGÉNIQUES ÉTUDIÉS.

Les protéines sont titrées suivant la technique de Sedmak et Grossberg (25), le dosage des glucides étant réalisé par la méthode au phénol-acide sulfurique (15).

## ESSAIS DE CARACTÉRISATION DE LA STRUCTURE ANTIGÉNIQUE RÉACTIVE AVEC L'ANTI-CORPS MONOCLONAL ÉTUDIÉ.

L'extrait ovulaire obtenu par précipitation par le sulfate d'ammonium ainsi que des urines de hamsters infestés sont soumis à l'action de différents agents physiques, chimiques et enzymatiques : action de la chaleur par incubation au BM à 100° C, action du S.D.S. par mélange à parties égales de S.D.S. à 2 % et de solution antigénique, action de l'acide trichloracétique et du métaperiodate suivant la technique de Carlier (9), action de la protéinase K. L'extrait ovulaire précipité par le sulfate d'ammonium est par ailleurs fractionné par filtration sur membranes Amicon de différentes porosités\*.

**3 - Tests sérologiques utilisés**

La réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis des préparations antigéniques constituées par des éléments figurés fixés est testée par la réaction d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un conjugué antichaîne  $\mu$  dilué au 1/40 en PBS et additionné de bleu d'Evans à la concentration du 1/10 000.

La réactivité de l'anticorps monoclonal est par ailleurs testée vis-à-vis d'éléments vivants du cycle évolutif : pour cela une vingtaine de miracidiums, de cercaires, de schistosomules ou 5 couples de vers adultes sont déposés dans des cupules de 2 ml et mis en contact avec du liquide ascitique contenant l'anticorps. Le mélange est mis à incuber pendant une durée de 3 heures à la température du laboratoire pour les miracidiums et les cercaires, à 37° C pour les schistosomules et les vers adultes. La réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis des œufs vivants est testée par la méthode de précipitation périovulaire (20).

Les différents extraits antigéniques étudiés et les urines de hamsters et de souris infestés sont testés à l'aide de plusieurs techniques sérologiques. La réaction de précipitation est effectuée suivant différentes modalités : immunodiffusion selon la technique d'Ouchterlony, immunoélectrophorèse selon la microméthode de Scheidegger à pH 8,2 réalisée sur Agarose HSIF\*\*. La réaction de fixation du complément est

\* Membranes testées : XM 300, XM 100 A, PM 50, PM 30, PM 10.

\*\* Agarose Litex type HSIF (Mr = 0).

effectuée suivant une microméthode de la technique de Kolmer. La réaction d'hémagglutination passive est réalisée en utilisant comme agent de couplage l'acide tannique suivant la technique de Boyden (6) ; elle est effectuée suivant plusieurs modalités : technique directe utilisant des hématies de mouton sensibilisées par un extrait ovulaire précipité par le sulfate d'ammonium et mises en présence de différentes dilutions du surnageant de culture de l'hybridome ou de fluide ascitique, technique d'inhibition de la réaction précédente par mise en présence d'hématies sensibilisées, d'anticorps monoclonal dilué et du milieu dans lequel est recherché l'antigène. Une technique d'hémagglutination reverse est également mise en œuvre par sensibilisation d'hématies de mouton à l'aide de l'anticorps monoclonal par la technique de Boyden. Un test Elisa est effectué suivant la méthode Sandwich : la solution d'anticorps monoclonal (liquide ascitique dilué en tampon carbonate bicarbonate pH 9,6 de façon à obtenir une concentration de 6 µg d'IgM par ml) est absorbée sur des plaques en polystyrène à fond plat par simple contact de 2 heures à l'étuve à 37° C. Les cupules lavées sont mises dans un deuxième temps en contact avec le liquide biologique contenant l'antigène ; la fixation de l'antigène est révélée dans un dernier temps à l'aide du même anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase à l'aide de glutaraldéhyde suivant la méthode d'Avrameas (3) ; la révélation de l'anticorps monoclonal marqué qui s'est fixé est effectuée en utilisant l'orthophénylènediamine comme substrat chromogène. La détermination de la concentration en glucides spécifiques présents dans l'extrait ovulaire est par ailleurs effectuée. Pour cela, un extrait ovulaire précipité par le sulfate d'ammonium et titrant 0,135 mg/ml en glucides est mis en présence de l'anticorps monoclonal à la zone d'équivalence, soit 1 ml d'extrait antigénique ajouté à 1 ml de fluide ascitique dilué au 1/5. Le mélange est maintenu en contact 1 heure à 37° C puis 48 heures à 4° C. Après centrifugation et vérification de l'absence d'activité antigénique résiduelle dans le surnageant par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination, le précipité recueilli lavé trois fois, est solubilisé dans 1 ml de SDS à 2 % et les glucides sont dosés par la technique au phénol-acide sulfurique.

## Résultats

### 1 - Étude de la réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis des différents stades évolutifs des Schistosomes

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination montre que la structure antigénique réagissant avec l'anticorps monoclonal est présente à tous les stades de développement du parasite, mais elle s'y trouve en des proportions variables, les extraits ovulaires bruts ou précipités par le sulfate d'ammonium sont particulièrement riches en antigène (*tableau I*).

La réaction d'immunofluorescence effectuée sur des coupes de ver adulte met en évidence l'antigène au niveau de l'épithélium intestinal des différentes espèces de Schistosomes que nous avons testées : *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma bovis*. Sur les coupes de foie de hamsters

parasités, la réaction d'immunofluorescence met en évidence la même structure antigénique : localisée à la surface du miracidium elle est également observée dans l'espace libre séparant miracidium et coque de l'œuf et diffuse parfois au niveau du granulome. Mis en présence des différents stades évolutifs du parasite à l'état vivant, l'anticorps monoclonal ne donne lieu à aucun phénomène visible à l'exception des miracidiums à la périphérie desquels apparaissent des formations filamenteuses dont le parasite se débarrasse par des contractions vigoureuses ; aucune action immobilisante n'est observée. Les œufs vivants non éclos mis en présence de l'anticorps monoclonal ne donnent pas lieu au phénomène de précipitation périovulaire.

TABLEAU I. — Teneur en antigène réagissant avec l'anticorps monoclonal de différents extraits parasitaires préparés à partir des différents stades évolutifs de *Schistosoma mansoni*.

	Teneur en sucres (mg/ml)	Taux de positivité	Index* de teneur en antigène
Schistosomule (extrait brut)	0,06	1/16	266,6
Cercaire (extrait brut)	0,06	1/32	533
Miracidium (extrait brut)	0,07	1/8	114
Œuf :			
Antigènes précipités par (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,125	1/1024	8 533
Extrait brut	0,4	1/4096	10 240
Adulte (AWA)	0,135	1/128	984

\* Cet index est calculé en faisant le rapport : inverse de la dilution limite de positivité sur la teneur en sucre de l'extrait étudié.

## 2 - Réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis d'autres parasites et microorganismes

Les extraits de différentes espèces de parasites, Protozoaires et Helminthes, testés par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination n'ont donné lieu à aucune réaction positive. Il en est de même des différents microorganismes sous forme d'antigènes figurés testés par la réaction d'immunofluorescence. L'anticorps monoclonal ne se révèle donc réactif que pour le genre *Schistosoma*.

## 3 - Réactivité de l'anticorps monoclonal vis-à-vis d'urines de hamsters et de souris expérimentalement infestés

*Urines de hamsters.* La réactivité de l'anticorps est d'abord testée vis-à-vis d'un pool d'urines recueillies au 42<sup>e</sup> jour de l'infestation par 1 500 à 2 000 cercaires de *Schisto-*

*soma mansoni*. La réaction de précipitation en milieu gélosé effectuée, soit avec le surnageant de culture, soit avec l'ascite, suivant la technique d'Ouchterlony donne lieu à une ligne de précipitation unique de forte intensité apparaissant en moins de 24 heures ; le phénomène est observé même avec des urines diluées jusqu'à la dilution du 1/16. L'étude comparative de l'anticorps monoclonal vis-à-vis du pool d'urines et vis-à-vis d'un extrait ovulaire de *Schistosoma mansoni* précipité par le sulfate d'ammonium montre une ligne de précipitation continue témoignant de l'identité des immun-complexes formés. La réaction d'immunoélectrophorèse met en évidence un arc de précipitation de faible mobilité anodique. La réaction de fixation du complément effectuée avec de l'ascite diluée au 1/4 donne encore lieu à une réaction positive avec des urines diluées au 1/256. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination passive mise en œuvre à l'aide de globules rouges de mouton sensibilisés par un extrait ovulaire de *Schistosoma mansoni* précipité par le sulfate d'ammonium permet de détecter l'antigène dans les urines diluées jusqu'à la dilution du 1/3200. La réaction d'hémagglutination passive reverse effectuée avec des globules rouges de mouton sensibilisés par l'ascite diluée au 1/10 permet de détecter l'antigène dans les urines diluées jusqu'à la dilution du 1/256. Avec la technique Sandwich du test Elisa, l'antigène peut être détecté dans les urines diluées jusqu'au 1/10000. Par contre, l'antigène ne peut être détecté par ces techniques dans les urines de hamsters infestés par 1 500 à 2 000 cercaires recueillies à la 1<sup>re</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> semaines d'infestation.

*Urines de souris*. La recherche de l'antigène au niveau des urines de souris infestées par des doses variables de cercaires montre que les taux d'antigène détectés par le test Elisa et la réaction d'inhibition de l'hémagglutination passive sont en rapport étroit avec la charge parasitaire (*tableau II*).

TABLEAU II. — Relation entre la charge parasitaire et le taux d'antigène urinaire détecté chez la souris à la 6<sup>e</sup> semaine d'infestation. (L'antigène urinaire est recherché à l'aide de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination passive sur un pool des urines de chaque lot.)

	Nombre de cercaires infestantes	Nombre moyen de vers adultes à l'autopsie	Taux d'inhibition de l'hémagglutination passive
Lot 1	10	2,4	1/2
Lot 2	40	9,8	1/16
Lot 3	175	43,0	1/256
Lot 4	700	129,5	1/1024

#### 4 - Essai de caractérisation de la structure antigénique détectée

L'extrait ovulaire ainsi que les urines de hamsters infestés sont traités par différents agents physiques, chimiques et enzymatiques. Les résultats rapportés sur le

TABLEAU III. — Réactivité des solutions antigéniques (urines de hamsters prélevées à la 6<sup>e</sup> semaine après l'infestation et extrait antigénique ovulaire semi-purifié par le sulfate d'ammonium) après différents traitements physicochimiques et enzymatiques.

	Urines de hamsters infestés (6 <sup>e</sup> semaine d'infestation)	Extrait antigénique ovulaire semi-purifié
Solutions antigéniques natives	1/2048*	1/1024
Action de la température		
— Bain-marie 100° C		
5 minutes	1/2048	1/1024
30 minutes	1/2048	1/1024
60 minutes	1/2048	1/1024
— Congélations et décongélations successives	1/2048	1/1024
Dialyse	1/2048	1/1024
Lyophilisation	1/2048	1/1024
Action du SDS**	1/1024	1/512
Action du SDS + 2ME***	1/1024	1/512
Action du pH		
— pH acide	1/2048	1/1024
— pH basique	1/2048	1/1024
Actipn du TCA**** 10 %	1/1024	1/512
Action de l'urée 8 M	1/2048	1/1024
Action du métaperiodate de sodium		
— oxydation ménagée	1/2	1/4
— oxydation drastique	négatif	négatif
Action de la protéinase K		
— 1/10 <sup>e</sup> en poids de protéines des antigènes		
1 heure d'incubation	1/1024	1/512
2 heures d'incubation	1/1024	1/512
4 heures d'incubation	1/1024	1/512
24 heures d'incubation	1/1024	1/512
— 1/50 <sup>e</sup> en poids de protéines des antigènes		
1 heure d'incubation	1/1024	1/512
2 heures d'incubation	1/1024	1/512
4 heures d'incubation	1/1024	1/512
24 heures d'incubation	1/1024	1/512

\* Les taux d'activité sont donnés par la dernière dilution de l'antigène inhibant l'hémagglutination passive.

\*\* Dodécyl sulfate de sodium ; \*\*\* 2 mercaptoéthanol ; \*\*\*\* acide trichloracétique.



*tableau III* montrent que seule l'oxydation par le métaperiodate de sodium affecte la réactivité de l'antigène. Après oxydation drastique, la réactivité de l'antigène a totalement disparu ; même une oxydation ménagée de l'antigène par le métaperiodate entraîne une chute considérable de sa réactivité. Par contre, l'action de la protéinase K n'altère nullement la réactivité de l'antigène. Tous ces résultats sont en faveur de la nature glucidique de la structure étudiée.

Par ailleurs, la filtration sur une série de membranes de porosités déterminées montre une grande hétérogénéité de poids moléculaire comprise entre 30 000 et 300 000 daltons ; une activité antigénique notable est même retenue par des membranes dont le seuil d'arrêt est de 300 000 daltons. Les résultats obtenus sont identiques pour l'extrait ovulaire et les urines de hamsters infestés.

### **5 - Détermination de la teneur en glucides spécifiques**

L'extrait ovulaire semi-purifié par précipitation par le sulfate d'ammonium a une teneur en glucides de 0,135 mg/ml dont une partie seulement correspond à des glucides spécifiques de l'anticorps monoclonal étudié. Afin d'évaluer sa teneur en glucides spécifiques, 1 ml d'extrait ovulaire est mélangé avec l'anticorps monoclonal dans les proportions correspondant à la zone d'équivalence, suivant la technique précédemment décrite. La teneur en glucides du précipité obtenu redissout dans 1 ml de S.D.S. à 2 % est évaluée à 0,020 mg par la technique au phénol-acide sulfurique. La teneur en glucides spécifiques de l'extrait ovulaire étudié est donc voisine de 0,020 mg/ml, la réaction d'inhibition de l'hémagglutination appliquée à différentes dilutions de cette solution antigénique donne encore lieu à un résultat positif pour la dilution du 1/1000 ; le seuil de détection de l'antigène spécifique par cette réaction peut donc être évalué à 20 ng/ml.

## **Discussion**

A la lumière des résultats précédents, deux problèmes doivent être envisagés : nature de l'antigène détecté et aptitude de l'anticorps monoclonal à détecter cet antigène.

*Nature de l'antigène détecté.* L'anticorps monoclonal étudié est une IgM de type lambda dirigée contre des structures détruites par le métaperiodate. Bien que la destruction par le métaperiodate ne soit pas absolument spécifique des glucides (10), la résistance de l'antigène à la protéinase K et sa solubilité dans l'acide trichloracétique amènent néanmoins à considérer sa nature polysaccharidique comme très vraisemblable. Les antigènes de nature polysaccharidique portent le même épitope répété un grand nombre de fois sur la molécule, ce qui facilite la formation d'un réseau avec l'anticorps et permet de comprendre que des anticorps monoclonaux puissent éventuellement donner lieu au phénomène d'immunoprécipitation.

Les schistosomes apparaissent d'une très grande complexité du point de vue antigénique. Plusieurs de leurs antigènes, ayant pour origine l'épithélium intestinal du ver adulte, sont retrouvés dans le sang et les urines des organismes infestés. Certains d'entre eux sont bien caractérisés tels la protéinase ayant une forte affinité pour l'hémoglobine et la malatedéhydrogénase ; d'autres antigènes, de nature polysaccharidique, l'un de mobilité électrophorétique anodique (Circulating anodic antigen, CAA), l'autre de mobilité cathodique (Circulating cathodic antigen, CCA) ainsi qu'un antigène M ont été décrits (5, 7, 8, 9, 13). L'antigène détecté par l'anticorps monoclonal que nous avons préparé s'apparente à ces derniers antigènes par sa nature polysaccharidique et sa présence au niveau de l'épithélium intestinal du ver adulte. Il en diffère cependant par sa présence en grande quantité dans les extraits ovulaires ; il faut signaler que d'autres antigènes de nature polysaccharidique présents au niveau de l'épithélium intestinal du ver adulte ont été signalés mais ils ne sont pas encore caractérisés de façon précise (23).

*Aptitude de l'anticorps monoclonal à détecter l'antigène spécifique dans les urines des organismes infestés.*

*Sensibilité de la méthode.* La technique des hybridomes a permis d'obtenir divers anticorps monoclonaux dirigés contre des structures des schistosomes impliquées dans les processus d'immunité mais ce n'est que plus récemment que des anticorps monoclonaux ont été mis en œuvre pour la sélection d'antigènes circulants au cours de la bilharziose. C'est ainsi que Deelder est parvenu à détecter jusqu'à 5 ng/ml de CAA par la méthode Elisa (12), Abdel-Hafez détecte jusqu'à 10 ng d'antigène bilharzien (1). L'anticorps monoclonal étudié dans ce travail nous a permis de détecter jusqu'à 20 ng/ml d'antigène par la réaction d'inhibition de l'hémagglutination passive. Bien qu'il ait été parfois signalé une meilleure sensibilité des anticorps polyclonaux pour la détection de certains antigènes parasitaires (2), les résultats précédents montrent que la mise en œuvre d'anticorps monoclonaux permet la détection des antigènes avec une bonne sensibilité.

L'antigène de schistosome que nous avons détecté dans les urines de souris infestées est mis en évidence à des taux qui sont en corrélation avec la charge parasitaire. Cette relation a été également observée par différents auteurs pour divers antigènes parasitaires de nature polysaccharidique (13, 17, 23). C'est là un intérêt majeur de la recherche des antigènes parasitaires : le titrage des anticorps chez un organisme infesté dépend non seulement de la charge parasitaire mais aussi d'un grand nombre de facteurs inhérents à la réactivité de l'organisme hôte.

Il faut signaler d'autre part, que l'anticorps monoclonal étudié dans ce travail n'a pas permis de détecter d'antigène circulant dans le sérum des hamsters et des souris infestés même après essai de dissociation des immun-complexes par différentes techniques. Les urines semblent donc être une localisation privilégiée pour la recherche d'antigènes en raison du phénomène de concentration très important qui s'effectue au niveau du filtre rénal (11). De plus, à ce niveau les immun-complexes sont dissociés, les anticorps plus ou moins dégradés et l'antigène plus stable est libéré. C'est

ainsi qu'un antigène thermostable de *Schistosoma mansoni* a pu être mis en évidence dans les urines de 80 % des sujets infestés à l'aide d'une technique d'immunodiffusion utilisant un sérum polyclonal (7).

*Spécificité.* L'antigène détecté par l'anticorps monoclonal étudié est bien d'origine parasitaire : il n'est pas décelable dans les urines des souris et des hamsters non infestés et surtout l'étude comparative par la méthode de double diffusion en gélose d'un pool d'urines de hamsters infestés et d'un extrait antigénique ovulaire permet de mettre en évidence une ligne de précipitation continue témoignant de l'identité des structures antigéniques réactives présentes dans les deux solutions. Cette réaction d'identité permet d'exclure la possibilité d'un néoantigène, c'est-à-dire d'une structure qui ne serait pas de nature parasitaire mais n'existerait pas chez l'organisme sain.

L'antigène détecté est retrouvé à tous les stades de développement de *Schistosoma mansoni*. Il n'est donc pas spécifique de stade. C'est le cas de nombreux motifs antigéniques détectés au moyen d'anticorps monoclonaux qui sont retrouvés dans tout ou partie des stades de développement (14, 27).

L'antigène détecté est spécifique du genre *Schistosoma* : aucun des parasites, aucun des microorganismes que nous avons testés n'a réagi avec l'anticorps monoclonal étudié. On sait depuis longtemps qu'il existe des communautés antigéniques entre les schistosomes et d'autres parasites, en particulier diverses espèces d'Helminthes. Ces communautés antigéniques sont responsables de réactions croisées qui ont pu être parfois observées même avec des anticorps monoclonaux, phénomène *a priori* surprenant qui témoigne simplement de la grande répartition dans la nature de certains épitopes (26).

L'antigène détecté n'est pas spécifique d'espèce : nous l'avons en effet retrouvé dans une localisation identique chez les vers adultes de *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* et *Schistosoma bovis*.

REMERCIEMENTS. Nous remercions le Pr T. Baltz (U.E.R. de Biochimie et Biologie Cellulaire de l'Université de Bordeaux II) qui nous a procuré la souche myélomateuse P3 X3 Ag8.653 ainsi que les Prs C. Combes et J. Jourdane (Département de Biologie Animale, Université de Perpignan) qui nous ont procuré les exemplaires de *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis*.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. ABDEL-HAFEZ S. K., PHILIPS S. M., ZODDA D. M. : *Schistosoma mansoni* : detection and characterization of schistosome derived antigens by Inhibition Enzyme Linked Immunosorbent Assay (I.E.L.I.S.A.) utilizing monoclonal antibodies. *Z. Parasitenk.*, 1984, 70, 105-117.
2. ARAUJO F. G., HANDMAN E., REMINGTON J. S. : Use of monoclonal antibodies to detect antigens of *Toxoplasma gondii* in serum and other body fluids. *Infect. Immunol.*, 1980, 30, 12-16.
3. AVRAMEAS S., TERNYNCK T. : Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intra-cellular penetration. *Immunochemistry*, 1971, 8, 1175-1179.
4. BALTZ T., LACASSIE I., TRIBOULEY-DURET J., TRIBOULEY J. : Density gradient separation of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Parasitol.*, 1982, 68, 963-965.

5. BOUT D., SANTORO F., CARLIER Y., BINA J. C., CAPRON A. : Circulating immunocomplexes in schistosomiasis. *Immunology*, 1977, 33, 17-22.
6. BOYDEN S. V. : The adsorption of proteins on erythrocytes heated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 1951, 93, 107-120.
7. CARLIER Y., BOUT D., BINA J. C., CAMUS D., FIGUEIREDO J. F. M., CAPRON A. : Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24, 949-954.
8. CARLIER Y., BOUT D., CAPRON A. : Further studies on the circulating M antigen in human and experimental *Schistosoma mansoni* infections. *Ann. Immunol.*, 1978, 129, 811-818.
9. CARLIER Y., BOUT D., STRECKER G., DEBRAY H., CAPRON A. : Purification, immunochemical and biologic characterization of the *Schistosoma* circulating M antigen. *J. Immunol.*, 1980, 124, 2442-2450.
10. CLAMP J. R., HOUGH L. : The periodate oxidation of aminoacids with reference to studies on glycoproteins. *Biochem. J.*, 1965, 94, 17-24.
11. COONROD J. D. : Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infection diseases. *Am. J. Med.*, 1983, 75, 85-92.
12. DEELDER A. M. : Serodiagnosis of trematode infections with emphasis on the detection of circulating antigen in schistosomiasis. Fourth European Multicolloquium of Parasitology. Izmir Turkey (Abstracts edited by Tumbay E., Yasarol. S. and Ozel M.A.P.) *Bilgehan Publishing House*, Izmir Turkey, 1984, 255-259.
13. DEELDER A. M., KORNELIS D., VAN MARCK E. A. E., EVELEIGH P. C., VAN EGMOND J. G. : *Schistosoma mansoni* : characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster and human infections. *Exp. Parasitol.*, 1980, 50, 16-32.
14. DISSOUS C., GRZYCH J. M., CAPRON A. : *Schistosoma mansoni* surface antigen defined by a rat monoclonal IgG2a. *J. Immunol.*, 1982, 129, 2232-2234.
15. DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMYTH F. : Colorimetric method for determination of sugars and related substance. *Analyt. Chem.*, 1956, 28, 350-356.
16. FAZEKAS de SAINT GROTH S., SCHEIDEGGER D. : Production of monoclonal antibodies : strategy and tactics. *J. Immunol. Meth.*, 1980, 35, 1-21.
17. GOLD R., ROSEN F. S., WELLER T. H. : Aspecific circulating antigen in hamsters infected with *Schistosoma mansoni* : detection of antigen in serum and urine, and correlation between antigenic concentration and worm burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1969, 18, 545-552.
18. HAMBURGER J., LUSTIGMAN S., ARAPSIONGOK T. K., OUMA J. H., MAHMOUD A. A. F. : Characterization of a purified glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs : specificity, stability and the involvement of carbohydrate and peptide moieties in its serologic activity. *J. Immunol.*, 1982, 128, 1864-1869.
19. LAZDINS J. K., DAVID J. R., STEIN M. J., SHER A. : *Schistosoma mansoni* : rapid isolation and purification of schistosomula of different developmental stages by centrifugation on discontinuous density gradients of Percoll. *Exp. Parasitol.*, 1982, 53, 39-44.
20. OLIVER-GONZALES J. : Antiegg precipitins in the serums of humans infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Infect. Dis.*, 1954, 95, 86-91.
21. PAUTRIZEL R., TRIBOULEY J., DURET J. : Diagnostic sérologique de la bilharziose à *Schistosoma mansoni* à l'aide d'une réaction de fixation du complément utilisant un antigène délipidé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1963, 104, 502-510.
22. QIAN Z. L., DEELDER A. M. : Circulating antigen in *Schistosoma* infections. *Acta Leidensia*, 1982, 49, 71-80.
23. QIAN Z. L., DEELDER A. M. : *Schistosoma japonicum* : immunological characterization and detection of circulating polysaccharide antigens from adult worms. *Exp. Parasitol.*, 1983, 55, 168-178.
24. SAUNERON M. F., APPRIOU M., RIPERT C., TRIBOULEY-DURET J., TRIBOULEY J. : Étude par la réaction d'immunofluorescence des anticorps dirigés contre les antigènes de l'épithélium intestinal de *Schistosoma mansoni*. II Chez le sujet bilharzien. *Ann. Parasitol Hum. Comp.*, 1985, 60, 147-154.
25. SEDMAK J. P., GROSSBERG S. E. : A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Ann. Biochem.*, 1977, 79, 544-552.
26. STEK M., COULIS P. A., BOCTOR F. N., PELLEY R. P. : Reactivity of anti MSA1 monoclonal antibody with schistosomal and non schistosomal antigenic extracts. *Lancet*, 1983, 11, 522-523.
27. STRAND M., Mc MILLAN A., PAN X. Q. : *Schistosoma mansoni* : reactivity with infected human sera and monoclonal antibody characterization of a glycoprotein in different developmental stages. *Exp. Parasitol.*, 1982, 54, 145-156.
28. TIMMS A. R., BUEDING E. : Studies of a proteolytic enzyme from *Schistosoma mansoni*. *Br. J. Pharmacol., Chemother.*, 1959, 14, 68-73.
29. TRIBOULEY J., TRIBOULEY-DURET J., APPRIOU M., SAUNERON M. : 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.