

L'immunodiagnostic des maladies parasitaires

Des moyens sont à l'étude pour combattre ces affections dont souffrent plus de 900 millions d'êtres humains

par John B. Castelino

Les parasites sont parmi les principaux agents des affections dont souffre l'humanité. Les diverses manifestations en sont notamment les fièvres paludéennes et les difformités physiques telles l'onchocercose et l'éléphantiasis, toutes deux provoquées par des nématodes. Les maladies parasitaires font baisser la productivité de la main-d'œuvre et il est probable qu'elles sont responsables de certains états apathiques que l'on constate parmi les populations des régions où ces affections sont endémiques. A la limite, elles peuvent provoquer la mort, soit comme conséquence directe de l'infection parasitaire, soit à la suite de maladies virales, microbiennes, nutritionnelles ou autres auxquelles l'organisme ne peut résister, affaibli qu'il est par les ravages que cause le parasite.

Le rôle de la santé et de la qualité de la vie dans le développement socio-économique apparaît de plus en plus important. De là l'intérêt croissant que les milieux internationaux accordent à la recherche sur les maladies tropicales, comme en témoigne le programme spécial de recherche et de formation relatif à ces maladies lancé conjointement par le Programme des Nations Unies pour le développement, la Banque mondiale et l'Organisation

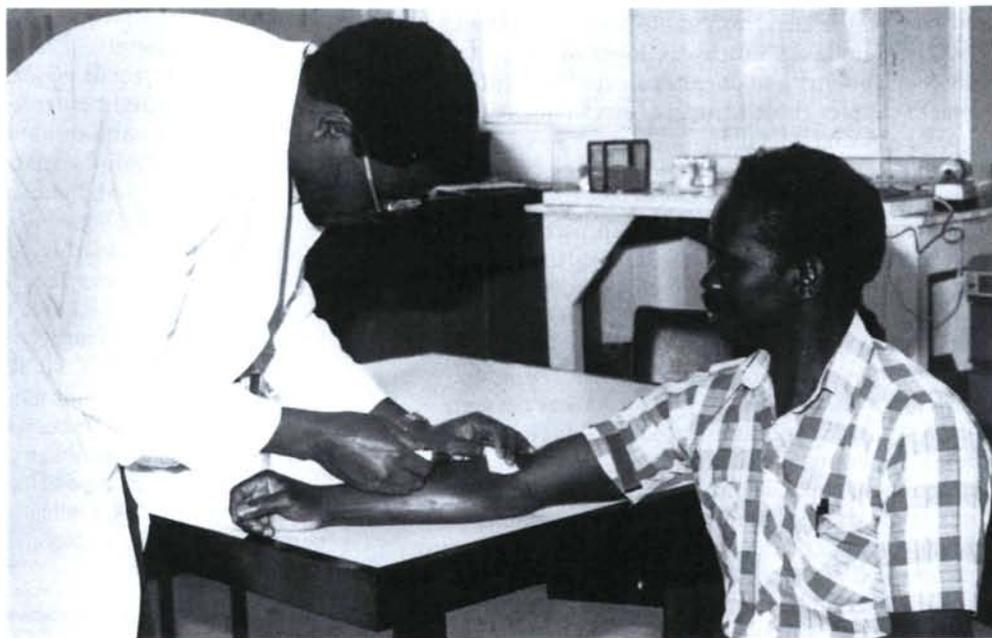
mondiale de la santé. Cinq des six maladies que vise ce programme spécial — la filariose, la leishmaniose, le paludisme, la schistosomiase et la trypanosomiase — sont provoquées par des parasites.

Malgré cette offensive, l'incidence des affections parasitaires reste, semble-t-il, assez élevée. Quelque 250 millions de personnes sont atteintes de filariose; à peu près autant souffrent de schistosomiase; environ 400 millions d'hommes, femmes et enfants, habitent des régions infestées par le paludisme, dont 50 millions sont atteints chaque année par la maladie et près de un million en meurent. Le développement des travaux d'irrigation et de remise en valeur, ainsi que l'augmentation de la densité des populations humaines dans les régions tropicales ne peuvent qu'aggraver encore la situation, à moins que des mesures énergiques ne soient prises pour lutter contre ces maladies.

A cette fin, il faut évidemment disposer de moyens de diagnostic clinique. Ces techniques sont également nécessaires pour étudier l'épidémiologie de la maladie, c'est-à-dire les voies de contagion au sein des groupes de population, et pour détecter les cas de contamination passée ou actuelle, lesquels peuvent ne présenter que quelques indices cliniques, et même aucun.

Le diagnostic classique repose sur un examen microscopique visant à détecter la présence du parasite ou de ses œufs dans les selles, l'urine, le sang, ou des biopsies.

M. Castelino est membre de la Division des sciences biologiques de l'AIEA.



Au Centre d'études biomédicales du Kenya, un médecin fait une prise de sang en vue du dosage d'antigènes parasitaires. (Photo: KBRC, Nairobi)

Or, en ce qui concerne tant le diagnostic que l'étude épidémiologique des maladies considérées, les critiques se multiplient à l'égard de cette méthode qui est jugée peu sûre. Cela est vrai notamment lorsque les fluides corporels ou les selles examinés ne contiennent qu'un très petit nombre de parasites ou d'œufs, ou en sont même totalement dépourvus, comme c'est le cas si l'infection est légère, ou encore au début de la période d'incubation, aux derniers stades des formes chroniques, ou lorsque le parasite n'est présent dans les fluides qu'à certains moments de la journée.

Moyens de diagnostic

Le système immunitaire est l'un des moyens de défense de l'organisme contre l'infection. Les parasites, ainsi que leurs sécrétions ou excréments, sont porteurs de nombreuses protéines. Contre certaines d'entre elles (antigènes), l'organisme est capable de produire d'autres protéines à molécule complexe (anticorps) qui peuvent neutraliser les antigènes par liaison. Il existe des procédés permettant de doser ces anticorps ou antigènes, qui offrent de nouveaux moyens de diagnostic. Cette méthode, appelée *immunodiagnostic*, se fonde sur la réaction immunitaire de liaison entre anticorps et antigènes et fait appel à la technique de l'*immunoanalyse* pour le dosage de ces diverses protéines.

Dès les années soixante, l'intérêt de l'immunoanalyse pour l'étude des affections parasitaires est devenu manifeste. Le procédé s'est avéré utile non seulement à la recherche en laboratoire, mais aussi pour le diagnostic et les études épidémiologiques en campagne. La technique la plus couramment utilisée se fondait sur la réaction entre anticorps et antigène qui donnait un produit agglutiné ou précipité visible. Elle a prouvé son utilité, mais on l'a jugée trop peu sensible. C'est pourquoi on s'est tourné plus récemment vers l'immunoanalyse à l'aide de réactifs marqués par des radionucléides, d'enzymes ou de substances fluorescentes qui confèrent une grande sensibilité à ce moyen de détection des antigènes et anticorps.

La radioimmunoanalyse (RIA) et les techniques connexes sont en mesure de remplacer les examens classiques dans le diagnostic des affections parasitaires. Elles devraient être peu onéreuses, rapides, techniquement simples et bien adaptées aux besoins des vastes enquêtes épidémiologiques, notamment en vue de l'évaluation des effets des divers plans sanitaires nationaux et internationaux.

Les examens immunologiques sont particulièrement utiles lorsqu'il s'agit d'apprécier les résultats d'une chimiothérapie ou de dépister un état infectieux dû à des parasites présents en trop petit nombre pour apparaître au microscope. Les procédés de détection des anticorps dont on dispose semblent insuffisants en pareil cas, mais la mesure de ces substances présente au moins l'avantage de donner des indications sur la réponse immunitaire de l'organisme infecté. Dans les cas d'infection où apparaissent des anticorps spécifiques, par exemple dans le paludisme et la schistosomiase, l'immunoanalyse peut servir à déterminer les réactions de défense. C'est là une indication précieuse pour orienter la recherche sur la lutte immunologique contre les infections parasitaires.

Le dosage des antigènes provenant des parasites se substitue depuis peu aux procédés de détection des anticorps et plusieurs équipes de chercheurs sont en train de mettre au point des méthodes de dosage dont la plupart comportent le marquage des anticorps. Il semble que l'on peut maintenant doser les antigènes provenant du parasite et présents dans le sérum ou les urines de l'hôte; plusieurs programmes de l'AIEA ont contribué à l'évaluation de cette méthode d'examen.

Les possibilités de marquage aux enzymes et au fluorochrome posent le problème du choix des indicateurs. Le marquage aux radioisotopes est un moyen commode de déterminer quantitativement la présence de l'anticorps ou de l'antigène en cause. En outre, comme les signaux non spécifiques que comporte la mesure de la radioactivité sont faibles, les radioindicateurs s'avèrent particulièrement utiles lors de la mise au point des méthodes d'analyses visant la détection des antigènes. Quand la méthode est au point, on peut tout aussi bien utiliser des indicateurs non radioactifs, telles les enzymes, dans bon nombre de cas, ce qui présente l'avantage de réduire progressivement l'emploi des radioisotopes dans ce genre de travaux.

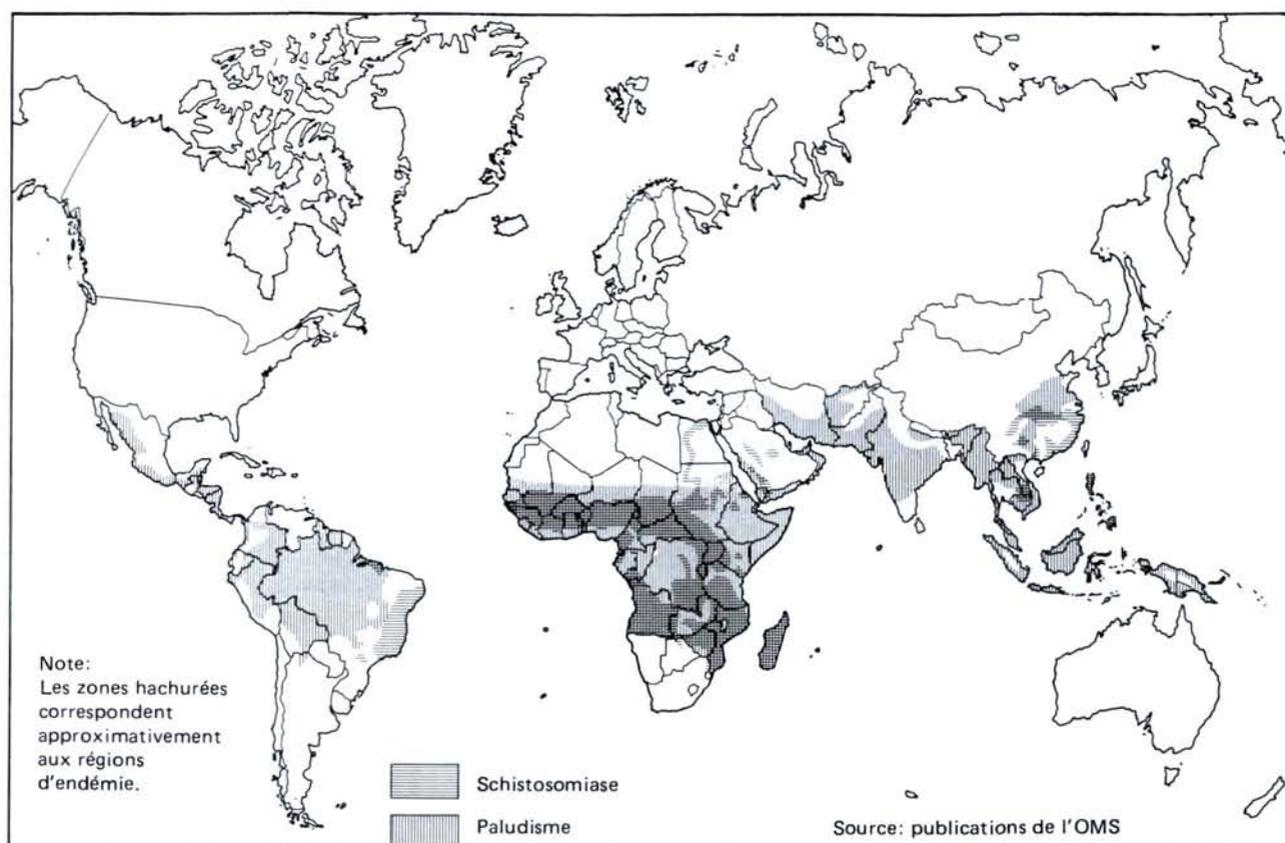
Les radioindicateurs ne vont pas être abandonnés pour autant, car l'instrumentation complexe nécessaire à la détection des indicateurs non radioactifs coûte aussi cher que les appareils de mesure de la radioactivité, dont il existe déjà un grand choix sur le marché. L'expérience technique acquise par l'Agence au cours des années en matière de radioimmunoanalyse peut s'appliquer directement aux méthodes utilisant des indicateurs non radioactifs et elle demeure valable non seulement pour mettre au point des méthodes sensibles d'analyse, mais aussi pour transférer la technologie en question aux Etats Membres moins avancés.

Importance de la radioimmunoanalyse

Les principes fondamentaux de la radioimmunologie ont été formulés il y a une trentaine d'années au cours d'études sur la liaison de l'insuline radiomarquée et des anticorps anti-insuline*. Le fondement de la radioimmunoanalyse a pu être établi lorsque l'on a constaté que l'insuline marquée pouvait être déplacée par de l'insuline non marquée pendant le dosage. La compétition qui s'établissait entre les deux insulines pour se lier aux anticorps anti-insuline (dont l'issue est prévisible selon les concentrations relatives des divers réactifs) a mené à la conception d'une analyse par liaison compétitive que l'on a appliquée depuis lors dans diverses situations qui exigeaient le dosage de substances présentes à l'état de traces dans les fluides de l'organisme.

L'immunoanalyse à l'aide d'un réactif immunologique (anticorps ou antigène parasitaire) et d'un radionucléide, d'une enzyme ou de fluorochrome est appelée à jouer un rôle important dans l'immunodiagnostic et l'épidémiologie des affections considérées. C'est une méthode très sensible qui se contente de quantités infimes d'antigènes ou de fluides du sujet examiné, peut s'employer dans les grandes campagnes de dépistage et permet de faire des dosages.

* Voir S.A. Berson, R.S. Yallow, A. Bauman, M.A. Rothschild et K. Newerly dans *Journal of Clinical Investigation* 35 (1956).



Distribution du paludisme et de la schistosomiase dans le monde

Les objectifs de l'immunodiagnostic

La recherche vise à mettre au point des méthodes d'immunodiagnostic des maladies parasitaires qui soient rapides, peu onéreuses et techniquement simples, et que l'on puisse utiliser lors des enquêtes épidémiologiques organisées pour évaluer les résultats des divers programmes nationaux et internationaux de lutte contre ces maladies dans les régions où elles existent à l'état endémique. Ces méthodes devraient être très sensibles et spécifiques de chaque maladie, afin de s'appliquer même dans les cas où les parasites sont trop peu nombreux pour être directement détectables. Cette qualité est essentielle aux fins d'une enquête épidémiologique, car il est bien connu que dans les régions sujettes à des endémies, les symptômes cliniques de la maladie peuvent n'apparaître que chez une partie seulement des individus contaminés.

Il faut aussi étudier des méthodes d'examen immunologique qui permettent d'apprécier l'efficacité des chimiothérapies ou autres traitements afin de pouvoir en suivre les progrès. Il faut enfin des méthodes permettant de détecter les sujets qui ont acquis l'immunité contre les maladies en question. Ces méthodes seront des plus utiles lorsqu'il s'agira de juger les résultats des campagnes de vaccination que l'on compte organiser dans l'avenir lorsque les vaccins seront au point.

La recherche doit être encouragée

L'analyse radioimmunologique et les techniques associées n'en sont pas encore au stade où elles pourraient se substituer aux méthodes classiques. Leur développement est entravé essentiellement par la faible demande

de trousse d'examen sur le marché et par le manque de réactifs appropriés. La spécificité et la sensibilité de l'immunoanalyse dépendent en effet de la technique et des réactifs appliqués. L'emploi de cette méthode est actuellement limité par l'absence de réactifs bien définis et par le caractère incertain des réactions qui en résulte.

La nécessité d'améliorer les techniques d'immunodiagnostic tant pour les examens individuels que pour les études épidémiologiques est largement reconnue et trouve son expression dans les priorités fixées par le programme spécial de recherche et de formation relatif aux maladies parasitaires établi par le PNUD, la Banque mondiale et l'OMS, et par un élément du sous-programme de l'AIEA concernant ces affections. Les progrès récents des procédés de séparation et la production d'antigènes et d'anticorps grâce aux moyens offerts par le génie génétique et la biotechnologie permettront de perfectionner les méthodes d'immunodosage sérodiagnostique à l'aide des radioisotopes ou autres indicateurs. L'OMS et l'AIEA encouragent les efforts dans ce sens.

Choix des antigènes pour l'immunoanalyse

Le dosage immunologique des anticorps anti-parasites est conditionné par la qualité de l'antigène. Celui-ci doit être de nature à réagir avec les anticorps présents chez tous les sujets contaminés, et il doit être spécifique du parasite en cause afin de ne pas réagir avec les anticorps dus à la présence d'autres parasites. Les parasites disposent de tout un arsenal d'antigènes dont un bon nombre se retrouvent chez plusieurs espèces. Il faut donc isoler les antigènes spécifiques de cette

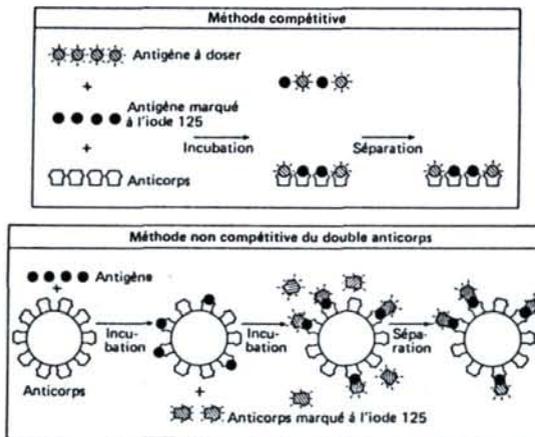
Méthodes d'immunoanalyse

Les méthodes d'immunodosage des antigènes, des anticorps et des complexes antigènes-anticorps en circulation sont essentiellement de deux sortes:

- La méthode par liaison compétitive qui consiste à mettre la substance à doser en compétition avec une substance analogue mais marquée, en présence d'une quantité limitée de l'anticorps réactif.
- La méthode par liaison non compétitive qui consiste à mettre la substance à mesurer (antigène ou anticorps) en présence d'une grande quantité de l'anticorps ou anticorps réactif, lequel a été préalablement marqué, directement ou indirectement.

Les substances réactives peuvent être en phase liquide et réagir en formant un complexe insoluble qui précipite. La substance réactive peut aussi être adsorbée sur un support en matière plastique et le dosage se fait alors en phase solide. On peut aussi utiliser une variante en phase solide de la méthode du double anticorps qui consiste à adsorber la substance réactive sur un support solide et à la faire réagir avec la substance à mesurer qui, une fois liée, est mise en présence d'un complément de substance réactive.

Les deux méthodes fondamentales sont schématisées ci-après.



multitude et s'assurer qu'ils ne sont pas porteurs de substances provenant de l'hôte. Il peut y avoir là un sérieux problème lorsqu'il s'agit d'un parasite étroitement associé aux tissus de l'hôte, comme c'est le cas de l'hématozoaire du paludisme.

Il faut aussi pouvoir obtenir l'antigène en quantité suffisante pour les campagnes de dépistage, et moyennant un prix de revient modéré. Sachant que l'on peut extraire de 1 à 3 milligrammes d'antigène spécifique pur de 1 gramme de vers *schistosoma mansoni*, il est clair que la méthode d'analyse doit être assez sensible pour détecter des quantités infinitésimales de l'antigène pur, de l'ordre du nanogramme par analyse. Les méthodes radioimmunologiques et connexes atteignent ce degré de sensibilité.

Le génie génétique et la biochimie proposent de nouveaux moyens pour l'analyse des mélanges d'antigènes et pour mettre en évidence et séparer les antigènes importants du point de vue immunologique, notamment à l'aide d'indicateurs radioactifs. Le programme de l'Agence sur les vaccins contre la schistosomiase encourage la recherche des moyens de préparer ces antigènes à partir du parasite.

Anticorps monoclonaux

En réponse à l'intrusion d'un antigène déterminé, l'organisme produit généralement une grande variété d'anticorps. Or, un procédé biotechnologique récemment mis au point permet d'obtenir des préparations où les divers composants (anticorps) sont séparés. Quand toutes les molécules d'anticorps d'une préparation sont identiques, l'anticorps est dit «monoclonal» et réagit uniformément avec un antigène déterminé ou un fragment de celui-ci.

Pour mettre en évidence les antigènes provenant d'un parasite, on utilise généralement des anticorps monoclonaux couplés à un support solide que l'on fait réagir avec le sérum du patient et l'on en sépare ensuite l'antigène correspondant. Cet antigène lié est mis en présence du même anticorps, ou d'un autre, après marquage par un radioisotope ou un autre indicateur, qui va se lier à son tour à l'antigène. C'est la méthode du double anticorps.

Dosage des anticorps

Les méthodes tant compétitive que non compétitive ont été appliquées pour mesurer les anticorps anti-parasites. L'immunodosage de ces anticorps permet de diagnostiquer une infection et de déterminer l'immunité, en particulier si des antigènes purs sont utilisés. Il est généralement admis, cependant, que cette méthode de dosage permet de déceler une infection présente ou passée, mais sans pouvoir discriminer entre les deux possibilités, car les anticorps ne disparaissent pas chez le sujet traité. Cela exclut ce genre de dosage s'il s'agit d'évaluer les résultats d'une chimiothérapie ou de tout autre traitement. En outre, comme il s'écoule un certain temps entre le moment de l'infection et l'apparition des anticorps dans les fluides en circulation, l'immunodosage permet rarement de diagnostiquer la maladie pendant ses premiers stades.

Ces inconvénients ont amené à rechercher d'autres méthodes capables de détecter les antigènes dans la circulation; ces méthodes sont actuellement à l'étude pour plusieurs affections parasitaires.

Immunodosage des antigènes en circulation

Les antigènes libérés dans les fluides du sujet par le parasite devraient normalement être des indicateurs de l'infection active, puisque leur concentration est en principe proportionnelle au degré d'infection, mais il se trouve qu'ils provoquent dans l'organisme du malade l'apparition d'anticorps qui se lient à eux pour les éliminer de la circulation; ces antigènes liés finissent par se dégrader et sont évacués avec l'urine. Dans le cas de certains parasites, la dégradation et l'élimination de l'antigène sont très rapides, si bien qu'il est inutile de tenter l'immunodosage. Dans d'autres cas, l'antigène est présent à si faible concentration qu'il faut procéder à des dosages extrêmement fins en recourant aux techniques de radioimmunoanalyse et aux méthodes associées.

Le problème se complique encore du fait que, parmi les anticorps en circulation, certains sont libres tandis que d'autres se sont liés totalement ou partiellement avec les antigènes libérés, formant ainsi un complexe. Il en

résulte une compétition entre l'anticorps réactif utilisé pour l'analyse et les anticorps du sujet. Il se peut, en outre, que des substances non spécifiques normalement présentes dans le sang quand il y a infection parasitaire

viennent de surcroît troubler les mesures. Enfin, il ne faut pas oublier que certains antigènes ne sont pas spécifiques d'une espèce déterminée de parasite et sont donc inutilisables pour faire un immunodiagnostic.

Le programme de recherche coordonné de l'AIEA

Le programme de l'Agence relatif à l'immuno-diagnostic porte essentiellement sur trois affections parasitaires, à savoir: la filariose, le paludisme et la schistosomiase. La filariose est parfois difficile à diagnostiquer, car les symptômes ressemblent souvent à ceux d'autres maladies. De plus, le ver responsable ne produit pas toujours des larves, alors que c'est précisément la présence de celles-ci dans le sang du malade qui permet de diagnostiquer l'infection lorsqu'on procède par la méthode classique de l'examen microscopique. On se heurte aux mêmes difficultés, bien qu'à un moindre degré, dans les cas d'infection chronique légère par les parasites du paludisme ou de la schistosomiase, ou dans les cas de guérison imparfaite.

Le programme de l'Agence encourage l'étude de méthodes immunoanalytiques qui soient capables de détecter effectivement, et de doser, les antigènes parasitaires présents dans le sang, le sérum et l'urine. Il donne les orientations d'une collaboration dans la recherche qui mènera à la production et à la sélection d'anticorps monoclonaux spécifiques de certains antigènes parasitaires en vue de leur application diagnostique éventuelle; ces travaux utilisent le sérum et l'urine de sujets infectés ou non vivant dans les régions d'endémie. Les anticorps choisis serviront alors aux immunoanalyses diagnostiques et aux opérations associées visant à déterminer si la méthode est applicable dans ces régions. Les résultats obtenus dans le cadre de ce programme sont encourageants.

Schistosomiase

Plusieurs anticorps monoclonaux pouvant servir au diagnostic de cette affection ont déjà été produits par trois établissements qui participent au programme: l'Université de Leiden (Pays-Bas), l'Institut Pasteur de Lille (France) et l'Institut Walter et Eliza Hall pour la recherche médicale, de Melbourne (Australie). Ces substances ont été utilisées dans le procédé dit du double anticorps, l'un étant couplé à la phase solide et l'autre, souvent le même, étant marqué. Ces anticorps, spécifiques du schistosome, peuvent détecter les antigènes de ce ver dans le sérum ou dans l'urine des sujets infectés, et cela indifféremment, s'avérant ainsi d'une grande utilité lors des études épidémiologiques, car il est plus commode de recueillir des spécimens d'urine que de faire des prises de sang. En outre, il semble que l'analyse d'urine permet plus facilement de contourner la difficulté due aux facteurs rhumatoïdes, aux complexes immunitaires et aux anticorps anti-parasites et anti-anticorps fréquemment présents dans le sérum des sujets infectés.

Filariose et paludisme

Plusieurs anticorps monoclonaux visant les filaires ont été préparés à Lille et à Melbourne. La méthode du double anticorps utilisant ces substances doit permettre de détecter les antigènes dus aux filaires dans le sérum des malades. Comme c'est le cas pour la schistosomiase, le dosage est plus précis dans l'urine car il n'y a pas d'interférence chez les sujets malades et les sujets latents.

Pour ce qui est du paludisme, plusieurs anticorps monoclonaux ont également été préparés, cette fois à l'Université Mahidol de Bangkok, et une appréciation

préliminaire permet de dire que l'un d'entre eux semble bien adapté au diagnostic.

Outre son programme sur l'immunodiagnostic des maladies parasitaires, l'Agence s'occupe des vecteurs du paludisme. On connaît mal encore les rôles respectifs des diverses espèces de moustiques qui transmettent le paludisme.

Le programme de l'Agence vise à promouvoir l'emploi de l'immunodosage pour identifier les sporozoïtes — stade infectieux de l'agent du paludisme — dans les glandes salivaires de l'insecte vecteur. Un anticorps monoclonal capable de se lier aux antigènes émis par les sporozoïtes est utilisé pour cette recherche. Préparé au Centre médical de l'Université de New York, il sert aux analyses par la méthode du double anticorps. Les premiers résultats d'une série d'essais effectués en Gambie, au Burkina Faso et au Mali indiquent qu'il y a de bonnes chances de pouvoir appliquer la méthode dans le cadre d'une campagne de grande envergure, en remplacement de l'examen microscopique classique des glandes salivaires de moustiques fraîchement tués, car le procédé du double anticorps est plus rapide et peut s'appliquer à des moustiques séchés conservés depuis plusieurs mois. Il permet aussi d'identifier les diverses espèces de l'insecte vecteur et d'obtenir une évaluation quantitative objective de la concentration de sporozoïtes. La persistance de la maladie, notamment en Afrique, malgré des dizaines d'années de lutte à base d'insecticides, souligne la nécessité de recourir à des moyens d'analyse qui promettent d'aboutir à une meilleure compréhension de la dynamique et de l'épidémiologie du paludisme.

Mentionnons enfin le programme de l'Agence visant à encourager l'application des techniques nucléaires en vue de la fixation d'anticorps anti-parasites sur des supports solides aux fins des immunodosages. C'est ainsi que l'Institut japonais de recherche sur l'énergie atomique, à Takasaki, et le Centre de génie biologique de l'Université de Washington sont parvenus à fixer sur des supports en polymères les anticorps anti-schistosomes fournis par l'Institut Pasteur de Lille. L'anticorps ainsi fixé demeure stable aux températures ambiantes et conserve la plupart de ses propriétés pour l'immunodiagnostic.

Pour faciliter les prélèvements en campagne

Les études épidémiologiques comportent nécessairement le prélèvement de sang et d'urine, aux fins de l'immunodiagnostic, le plus souvent dans des lieux éloignés du laboratoire. L'équipe mobile passe parfois plusieurs jours à recueillir les spécimens avant de revenir au laboratoire central pour les faire analyser, ce qui oblige à les conserver sous réfrigération pour éviter leur détérioration. Or, le programme de l'Agence vise précisément à mettre au point un support spécial utilisable dans le cas d'infections comme la schistosomiase où l'antigène spécifique présent dans l'urine ou dans le sérum n'est pas sensible à la chaleur. Ce support pourrait être une plaquette de matière plastique dont une extrémité serait enduite d'un anticorps stable polymérisé que l'on pourrait tremper dans le spécimen d'urine ou de sang avec lequel il réagirait en fixant l'antigène. Après séchage, la plaquette serait envoyée au laboratoire central qui procéderait à son marquage par une enzyme, du fluorochrome ou un radioisotope en vue de l'analyser.