

10. ASPECTS SÉROLOGIQUES DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES

TESTS DE DIAGNOSTIC

1. Evolution de l'immunologie et champ d'application de la sérologie.
2. Principes sérologiques généraux
 - 2.1. Antigènes et anticorps
 - 2.2. Constitution antigénique des germes
 - 2.3. Cinétique de la production des anticorps au cours d'infections
3. Caractéristiques générales des tests sérologiques
 - 3.1. Réaction de précipitation
 - 3.2. Réaction d'agglutination
 - 3.3. Réaction du complément
 - 3.4. Tests au moyen de réactifs marqués
 - 3.5. Tests utilisant des germes vivants
 - 3.6. Sensibilité et spécificité intrinsèques
4. Sérodiagnostic et séroépidémiologie
 - 4.1. Tests de dépistage d'anticorps
 - 4.1.1. Récolte et conservation des échantillons de sang
 - 4.1.2. Choix du test et du réactif antigénique
 - 4.1.3. Sensibilité et spécificité
 - 4.2. Tests de dépistage d'antigènes
 - 4.3. Etudes statistiques
5. Application des techniques immunologiques au diagnostic de la trypanosomiase africaine
6. Conclusions

BIBLIOGRAPHIE

L'immunité, ou la non réceptivité à un germe pathogène, était un phénomène bien connu, car certaines maladies infectieuses confèrent à l'organisme la capacité de résister à une nouvelle infection de même nature.

L'origine de ce phénomène hantait les esprits, mais les mécanismes en ont été découverts seulement progressivement. Ils se composent d'une défense cellulaire, la phagocytose (Metchnikoff, 1880), et d'un mécanisme humoral produisant des substances qui se lient aux agents provocateurs. Les complexes ainsi formés sont généralement bénéfiques, mais peuvent aussi être nocifs par les mécanismes immunopathologiques d'hypersensibilité anaphylactique ou allergique qu'ils déclenchent, ou par les affections hématologiques qu'ils provoquent par auto-anticorps.

Les premiers anticorps humoraux qui ont été découverts sont les agglutinines (Grüber et Durham, 1896). Mises en présence du germe correspondant, elles l'agglutinent de manière très spécifique et visible à l'oeil nu comme au microscope. Le premier test de sérodiagnostic a été appliqué par Widal au bacille d'Eberth, *Salmonella typhi*. Ce test a été à l'origine de nombreuses techniques de diagnostic de maladies infectieuses. La sérologie, l'étude des procédés qui mettent en évidence la combinaison d'antigènes et d'anticorps par une réaction visible, était née.

D'autres anticorps sont bientôt identifiés: les précipitines (Kraus, 1897). Leurs propriétés fortement apparentées à celles des agglutinines trouveront leur application beaucoup plus tard dans la technique de diffusion en gélose avec formation de lignes de précipités (Oudin et Ouchterlony) et dans les techniques d'immuno-électrophorèse pour définir les lignes de précipitations spécifiques (Grabar, 1955).

Les lysines, mises en évidence chez le cobaye par le phénomène de Pfeiffer (1894) pour le vibrion du choléra, connaîtront un développement capital lorsque la réaction sera rendue possible *in vitro* par Bordet. Ce dernier a démontré que la bactériolyse était un phénomène qui pouvait être généré par d'autres produits, notamment les globules rouges. Leur hémolyse pouvait être inactivée par chauffage entre 55° et 56°C, mais réactivée par l'adjonction de sérum frais possédant la substance sensibilisatrice. Bordet et Gengou (1901) ont mis cette découverte à profit pour concevoir le test basé sur la déviation du complément (ou alexine). La réaction de fixation du complément se fait en deux temps: le complément se fixe sur le complexe antigène-anticorps s'il est présent, puis un système hémolytique, qui sera ou non hémolysé, détecte le complément resté disponible. La méthode est utilisée pour les antigènes les plus divers, bactériens, rickettsiens, viraux, mycotiques.

La réaction de Bordet-Wasserman en est l'application la mieux connue, mais elle est la moins spécifique.

Les premiers essais ont utilisé comme antigène le foie de mort-nés syphilitiques, riches en tréponèmes; par la suite on a constaté que les tréponèmes n'étaient pas indispensables et que des résultats aussi fiables pouvaient être obtenus avec des extraits lipidiques du foie et même des cardiolipines du myocarde. En effet, le BW détecte la présence de réagines et non d'anticorps spécifiques. En Afrique tropicale, la valeur du BW est moins grande à cause de la présence de tréponématoses non vénériennes, le pian, dans les régions humides, et le bétel ou syphilis endémique, dans les régions sèches, ou encore par l'apparition de réagines produites par des infections totalement différentes, comme l'accès aigu de paludisme. Le BW a été supplanté par des réactions de floculation (Kahn, Meinicke, VDRL), par l'utilisation de l'antigène de Reiter, par le test d'immobilisation de Nelson et par l'immunofluorescence.

Les agglutinines connaissent également des variantes non spécifiques. Un exemple en est fourni par la réaction de Paul et Bunnell qui ont constaté empiriquement que le sérum de malades atteints de mononucléose infectieuse agglutine les érythrocytes du mouton.

Le prototype des tests d'agglutination se retrouve dans la propriété qu'ont les sérums de malades atteints de rickettsiose d'agglutiner des *Proteus vulgaris*, isolés initialement de l'urine de malades atteints de typhus exanthématique, dénommés «X», mais dont seules les variantes «O» donnent des réponses fiables.

D'autres techniques démontrent, par analogie purement technique, la présence de perturbations des séroglobulines dans certaines affections, notamment celles du foie.

La découverte de l'existence d'hémo-agglutinines spécifiques par Landsteiner (1901) ouvre la voie de l'immunogénétique. Les trois groupes A, B et O, observés chez l'homme, sont à la base de la transfusion sanguine. En 1940, Landsteiner et Wiener y ajouteront le système rhésus, qui expliquera l'incompatibilité foeto-maternelle (érythroblastose foetale). D'autres facteurs seront découverts dont certains ont une importance particulière en Afrique tropicale, notamment pour la présence du *Plasmodium vivax* incapable de subsister dans des érythrocytes dépourvus du facteur Duffy.

L'histocompatibilité, importante pour les greffes cutanées, le deviendra davantage à mesure que les transplantations d'organes vont se multiplier. Il est incontestable que des systèmes HLA présentent une corrélation avec certaines maladies (p.ex. HLA B27 avec le syndrome de Reiter).

Le diagnostic sérologique a acquis une grande importance pratique par le nombre d'antigènes disponibles. Les techniques deviennent plus rigoureuses, plus sensibles et plus spécifiques, ou plus raffinées: immunofluorescence, formation de rosettes, etc. Quelle que

soit la méthode choisie, sa valeur dépend de la spécificité des antigènes qui s'améliore grâce aux méthodes biomoléculaires modernes. Disposer d'antigènes ne pose guère de problèmes pour les bactéries et les mycètes qui se cultivent; pour les virus, les antigènes sont devenus plus aisément accessibles depuis qu'on peut les multiplier en culture de tissus ou de cellules; les antigènes parasitaires, en particulier les métazoaires, réclament une préparation, sauf l'antigène tout fait du liquide hydatique. La valeur des antigènes propres aux diverses phases biologiques des parasites (oeufs, larves, adultes, sécrétions et excréments) est inégale. Leur utilisation doit être précisée pour chaque cas.

L'apparition plus ou moins précoce et variable des

anticorps, leur courbe d'évolution, la durée de leur persistance, selon la méthode utilisée pour les faire produire, doivent encore recevoir des précisions. L'augmentation de manière significative, de l'ordre de quatre fois, des taux d'anticorps au cours de la phase aiguë et de la convalescence offre une garantie meilleure que l'observation d'un taux limite.

Si un diagnostic sérologique correctement effectué a une incontestable valeur en médecine individuelle, à défaut de la mise en évidence directe de l'agent responsable, le sérodiagnostic a acquis une importance nouvelle par son application au niveau des communautés. Il est devenu un élément important dans l'épidémiologie des maladies transmissibles.

TESTS DE DIAGNOSTIC

1. Evolution de l'immunologie et champ d'application de la sérologie

Les débuts célèbres, mais encore empiriques, de l'immunologie remontent aux découvertes de Jenner et de Pasteur. On leur doit d'avoir révélé l'importance de cette science qui déboucha sur la préparation de vaccins efficaces pour prévenir des infections virales et bactériennes.

Peu à peu, la complexité des composantes humorales et cellulaires du système immunitaire est apparue. On doit à Heidelberger et Landsteiner les premières notions relatives à la structure moléculaire des antigènes et des anticorps. Les observations de Metchnikoff sur les phagocytes et la mise en évidence par Landsteiner et Chase de cellules sensibles à la tuberculine ont marqué le début de nos connaissances en matière d'immunité cellulaire.

Au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle, l'immunologie est devenue une discipline très spécialisée qui fait appel à la collaboration de cytologistes, de spécialistes en biologie moléculaire et de généticiens.

Le nombre d'applications de l'immunologie en médecine humaine et vétérinaire s'accroît de jour en jour, selon un rythme qui s'accélère soudain grâce à de nouvelles découvertes ou à l'introduction de nouvelles techniques, telles que les manipulations génétiques ou la production d'anticorps monoclonaux. Tout laisse prévoir que cette évolution se poursuivra et contribuera pour une grande part au succès de la lutte contre beaucoup de maladies tropicales.

L'importance de l'immunologie se manifeste tant dans l'identification antigénique des germes de maladies infectieuses et parasitaires que dans l'immunodiagnostic, l'immunité congénitale, l'immunoprophylaxie, l'immunothérapie, et jusque dans la possibilité de combattre par voie immunologique les insectes suceurs de sang qui sont vecteurs de maladies. Malgré les progrès accomplis, il reste encore un immense champ de recherches à explorer. Sous l'impulsion de l'Organisation Mondiale de la Santé, un nombre croissant d'experts originaires de pays tropicaux participent à ces recherches fondamentales et appliquées. De grands espoirs sont en train de naître par l'application de ces nouvelles techniques jusque dans les régions les plus reculées des pays endémiques.

L'exposé qui suit se limite essentiellement à la sérologie, une des disciplines d'application les mieux connues et les plus utilisées de l'immunologie. On s'en tiendra par ailleurs à une gamme de réactions antigènes-anticorps importantes dans les domaines suivants: sérotypage des germes infectieux, sérodiagnostic et dosage d'anticorps protecteurs.

a) Le sérotypage compare la constitution antigénique détaillée des organismes infectieux à l'aide d'antisérums classiques ou d'anticorps monoclonaux, pour mettre au

point un test sérologique simple permettant de caractériser l'organisme infectieux.

b) Le sérodiagnostic, au sens large du terme, cherche à mettre au point des tests simples, sensibles et spécifiques pour détecter des antigènes ou des anticorps chez l'hôte infecté. Dans les tests de recherche d'anticorps, la qualité du résultat dépend avant tout de la sélection aussi précise que possible du réactif antigénique. Dans les tests de dépistage des antigènes, on a recours à des anticorps monoclonaux judicieusement choisis.

c) Le dosage d'anticorps protecteurs chez les personnes infectées ou vaccinées relève de l'immunoprophylaxie et de la sérothérapie: on s'efforce alors d'utiliser des tests qui reflètent le plus fidèlement possible la situation in vivo. On peut par exemple observer dans quelle mesure le sérum neutralise le potentiel infectieux des germes ou de leurs toxines.

Ces diverses épreuves sérologiques ont évidemment une signification complémentaire: ainsi la présence d'anticorps protecteurs dans le sérum des patients a souvent une haute signification diagnostique.

2. Principes sérologiques généraux

2.1. Antigènes et anticorps

Toute réaction sérologique repose en premier lieu sur la liaison spécifique entre un antigène et un anticorps. La plupart des antigènes sont des polysaccharides ou des protéines contenant un grand nombre de groupes chimiques différents que les lymphocytes reconnaissent comme déterminants antigéniques. Des clones préexistants de lymphocytes B prolifèrent et se différencient en plasmocytes; ceux-ci produisent des anticorps monoclonaux spécifiques pour les divers déterminants antigéniques. Une partie des lymphocytes B sensibilisés reste en réserve en tant que cellules à mémoire non différenciées; elles permettent une réponse secondaire accélérée lors d'une confrontation ultérieure avec le même déterminant antigénique.

Les anticorps sont des immunoglobulines réparties en diverses classes et sous-classes à caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes.

Les IgG représentent environ 75 % des immunoglobulines sériques et se répartissent en quatre sous-classes: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Les anticorps à action prolongée qui résultent d'une immunisation profonde appartiennent à cette classe.

Les IgM sont, par contre, des anticorps précoces et temporaires.

Les IgM et des IgG1, IgG2 et IgG3, après liaison avec leurs antigènes, activent le système du complément, système enzymatique doté de diverses fonctions immunologiques et physiologiques.

Les IgA constituent 10 à 15 % des immunoglobulines sériques, mais sont surtout présentes dans les sécrétions extra-vasculaires telles que la salive, les larmes, le mucus nasal et intestinal ainsi que dans le lait maternel. On les divise en deux sous-classes: IgA1 et IgA2.

Les IgD ne sont présentes qu'à l'état de traces dans un sérum normal. Elles jouent le rôle de récepteur antigénique au niveau de la membrane cellulaire des lymphocytes B, tâche qu'elles partagent d'ailleurs avec les IgM.

Les IgE, présentes elles aussi en très faible concentration dans le sérum, sont des anticorps dirigés principalement contre les allergènes. Ces anticorps se fixent à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles et sont à la base des réactions d'hypersensibilité immédiate.

L'immunisation déclenchée par un seul antigène conduit donc à la production d'une énorme variété d'anticorps déterminants spécifiques, appartenant à diverses classes et sous-classes d'immunoglobulines, qui ont chacune des propriétés fonctionnelles différentes chez la personne sensibilisée.

Ces principes élémentaires permettent de se faire une idée de l'extrême complexité de l'immunité humorale suscitée par le contact avec des germes infectieux ou parasitaires, qui disposent chacun d'une mosaïque d'antigènes; de plus ceux-ci subissent parfois des modifications profondes au cours de l'évolution de l'infection. Il en résulte une activation polyclonale directe ou indirecte des lymphocytes B.

2.2. Constitution antigénique des germes

La mosaïque antigénique des germes est de plus en plus complexe au fur et à mesure qu'il s'agit de virus, d'organismes prokaryotes, d'organismes unicellulaires (protozoaires) ou d'organismes multicellulaires tels que les helminthes.

Chez les protozoaires et les helminthes, il peut y avoir des dizaines ou même des centaines de composants antigéniques. De plus, leur structure antigénique varie en fonction du stade de leur développement. Plusieurs mécanismes génétiques viennent encore accroître la diversification antigénique: ainsi, chez les virus et les prokaryotes, des mutations peuvent provoquer des changements brusques, tandis que certains protozoaires ont au cours de leur évolution élaboré par hybridation ou autres combinaisons un arsenal de gènes leur permettant de produire un composant antigénique important sous une forme alternative. Ce phénomène, connu sous le nom de variation antigénique, est particulièrement perceptible chez les Plasmodiums et les trypanosomes africains.

L'inventaire systématique de la mosaïque antigénique des germes est difficilement réalisable même pour les maladies les plus importantes.

Les antisérums d'infections naturelles conviennent mal pour l'identification sérologique, parce qu'ils ont une

composition mal définie. Les antisérums obtenus par hyperimmunisation constituent des réactifs que l'on peut standardiser beaucoup plus aisément. Les études comparatives immuno-électrophorétiques des mosaïques d'antigènes parasitaires en sont une illustration (J. Biquet et A. Capron à Lille). Les réactifs les plus affinés pour les dissections antigéniques sont certainement les anticorps monoclonaux: outre leur pouvoir analytique maximal, ils présentent l'énorme avantage de n'exiger que de très petites quantités d'antigènes sans purification préalable. Cette dernière caractéristique est d'une importance capitale lorsqu'il s'agit d'identifier des composants antigéniques qui ont des propriétés qualitatives particulières.

L'identification des antigènes reste une procédure lente et coûteuse. Il faut donc faire des choix prioritaires en recherchant les antigènes qui semblent déterminants pour le sérotypage, l'immunodiagnostic ou l'immunoprophylaxie.

L'identification sérologique des antigènes importants est un premier pas indispensable. Leur production artificielle rendue possible par des techniques de manipulation génétique ou des procédés classiques de synthèse. Ces techniques conduisent d'elles-mêmes à l'identification biochimique moléculaire.

2.3. Cinétique de la production des anticorps au cours d'infections

La nature et la quantité des anticorps produits dépendent de nombreux facteurs. En premier lieu, de la dose infectante, surtout lorsqu'il s'agit de vers parasites qui ne se multiplient pas dans l'organisme. Ensuite la production d'anticorps dépend de l'intensité, de la durée et de la localisation de l'infection. La production d'anticorps est stimulée par le contact des antigènes avec des cellules immuno-compétentes; plus ce contact est important, plus la quantité d'anticorps circulants sera élevée. Les infections qui se cantonnent dans la lumière intestinale induisent en général peu d'anticorps dans le sérum, mais elles peuvent induire la production locale d'immunoglobulines IgA et IgE. C'est aussi le cas pour les infections des voies respiratoires.

Une autre forme de production fragmentée de divers anticorps s'observe lors de l'infection du système nerveux central. Les anticorps présents dans le liquide céphalorachidien constituent la fraction IgM produite in situ, tandis que les IgG dépendent de l'état de la barrière hémato-méningée et peuvent provenir du sérum.

Dans certaines infections parasitaires, la cinétique de la production d'anticorps dépend de chaque stade de développement des parasites et de leur migration éventuelle. Ainsi, dans la schistosomiase, le système immunitaire se trouve confronté successivement à des cercaires, à des schistosomules, à des vers adultes, mâles et femelles, et à des oeufs. Dans le paludisme, aux sporozoïtes injectés par le moustique font suite les divers stades du développement dans les hépatocytes et les érythrocytes.

Dans la trypanosomiase africaine, la diversité dans le temps des stimulants antigéniques résulte du développement de variants antigéniques successifs qui se développent jusqu'à leur forme de pénétration dans le système nerveux central.

Les stimulations antigéniques des germes vivants proviennent en majeure partie des antigènes de surface ou de substances antigéniques sécrétées. Des composés chimiques provenant de l'hôte lui-même ou induits par la présence de virus peuvent à leur tour devenir des stimulants antigéniques secondaires. Les germes infectieux détruits par les défenses immunitaires ou par chimiothérapie peuvent libérer une charge d'antigènes nouveaux.

La mosaïque d'anticorps est fortement influencée par des réinfections ou par des surinfections dues à d'autres germes.

Le pouvoir immunogène peut varier fortement d'un antigène à l'autre. Quand il doit faire face simultanément à divers antigènes, le système immunitaire répond de manière sélective: ce phénomène est appelé compétition antigénique. Enfin, l'immunocompétence de l'hôte est également un facteur déterminant de la production d'anticorps. Cette compétence peut être compromise dans des circonstances très diverses; des infections ou des parasitoses persistantes peuvent elles-mêmes exercer un effet immunosuppresseur.

Lors d'une stimulation antigénique, il faut quelques jours avant que la synthèse d'anticorps s'amorce. Une partie des anticorps produits est consommée *in vivo* pour former des immun-complexes avec l'antigène correspondant. Les immun-complexes peuvent rester fixés sur les germes ou sur les tissus de l'hôte. Ils peuvent aussi circuler sous forme soluble dans le plasma sanguin ou dans d'autres liquides organiques. L'intensité et la persistance du stimulant antigénique détermineront la quantité et la durée de production des anticorps correspondants, appartenant aux différentes classes ou sous-classes d'immunoglobulines.

Ces considérations générales donnent une idée des nombreuses facettes de la dynamique de la réponse immunitaire. Si l'on veut s'attacher à l'étude sérologique d'un modèle d'infection déterminé, il faut prendre le temps d'en faire une analyse théorique approfondie.

3. Caractéristiques générales des tests sérologiques

Pour visualiser la réaction entre les antigènes et les anticorps, on dispose d'un large éventail de techniques, comportant d'innombrables variantes et combinaisons. Celui qui est initié aux notions théoriques et pratiques de sérologie ne se contentera pas des applications de routine, mais cherchera à être créatif en imaginant des alternatives.

Le but d'un test sérologique consiste soit à rechercher un antigène déterminé au moyen d'anticorps de référence, soit à détecter des anticorps au moyen d'un

antigène de référence. A mesure que les antigènes ou les anticorps en question sont mieux définis, on dispose de meilleures techniques de dosage et l'interprétation des résultats est d'autant plus fiable. Le choix d'un test est fonction de plusieurs facteurs, notamment la nature du problème posé, la sensibilité et la spécificité souhaitée, le nombre de tests à exécuter, les possibilités financières et techniques. Dans de nombreux cas, plusieurs solutions sont possibles.

Dans certaines réactions antigènes-anticorps, le résultat est observé de manière directe. Dans d'autres cas, il faudra se baser sur des effets secondaires ou ajouter un système d'indicateurs permettant de détecter les immun-complexes formés. En principe, chaque système de tests peut être dirigé soit vers le dépistage d'anticorps, soit vers la détection d'antigènes. On recherche en somme la complémentarité ou la capacité réciproque de liaison de deux composants dont l'un est connu.

Envisageons quelques réactions et tests sérologiques courants.

3.1. Réaction de précipitation

Un antigène et un anticorps se combinant en milieu liquide ou semi-liquide peuvent donner lieu à un précipité. La valeur analytique de cette réaction de précipitation prend toute son ampleur lorsqu'elle s'effectue en gel ou sur d'autres supports solides, éventuellement en combinaison avec des méthodes physiques de séparation (immunodiffusion ou immuno-électrophorèse).

3.2. Réaction d'agglutination

Des particules en suspension, porteuses d'antigènes ou d'anticorps, entrant en réaction avec leur combinant (anticorps ou antigène), peuvent donner lieu à la formation d'agrégats macroscopiques ou microscopiques. Des micro-organismes peuvent être utilisés pour ces tests d'agglutination directe. Il est possible aussi de sensibiliser, par des antigènes ou des anticorps, des particules immunologiquement neutres, telles que des érythrocytes traités ou des grains de latex, et de réaliser ainsi des tests d'agglutination indirecte offrant des applications polyvalentes.

3.3. Réaction du complément

Comme on l'a exposé plus haut, certains anticorps activent le système du complément dès qu'ils entrent en combinaison avec leurs antigènes. Cette activation du complément peut être mesurée de diverses manières. Classiquement, on utilise à titre d'indicateur un système hémolytique. Il existe cependant des techniques plus récentes qui permettent de doser l'activation d'éléments isolés du complément.

3.4. Tests au moyen de réactifs marqués

Les antigènes aussi bien que les anticorps peuvent être «marqués». C'est en général aux anticorps marqués que

l'on a recours. Le marquage peut, entre autres, être effectué par la liaison de l'anticorps avec un fluorochrome, un enzyme, un élément radioactif ou encore avec la ferritine. Les anticorps conjugués sont utilisés dans les réactions d'immunofluorescence, de radio-immunotitrage ou dans les réactions immuno-enzymatiques. Les possibilités sont quasi illimitées.

Pour le sérotypage ou pour la détection d'antigènes, on peut utiliser des anticorps monoclonaux marqués. Ce système indirect de détection d'anticorps est polyvalent. En effet, il existe une gamme très large de conjugués marqués d'anti-immunoglobulines; ils sont éventuellement propres à des classes ou sous-classes déterminées d'immunoglobulines. On peut effectuer ces réactions en milieu liquide, mais il est aussi possible de coupler les antigènes ou les anticorps à l'un ou l'autre support solide et de les faire réagir avec le combinant correspondant en solution. On peut aussi localiser au microscope optique ou électronique les antigènes ou les anticorps fixés dans des structures cellulaires.

3.5. Tests utilisant des germes vivants

Ces tests sont appliqués depuis longtemps sur nombre de virus, de prokaryotes, de protozoaires, d'oeufs et de larves de vers. Ils se prêtent idéalement au dépistage d'anticorps protecteurs, dans le sérum d'hôtes infectés ou vaccinés, qu'ils soient ou non activateurs du complément. Ces anticorps sont la plupart du temps dirigés contre les antigènes de surface et ont une action agglutinante, lysante, opsonisante (favorisant la phagocytose) ou toute autre action neutralisant l'infection. Du fait de leur grande spécificité, ils peuvent être utilisés aussi bien pour le sérotypage qu'à des fins diagnostiques.

3.6. Sensibilité et spécificité intrinsèques

La sensibilité intrinsèque d'un test sérologique peut se mesurer par la plus petite concentration détectable d'antigène ou d'anticorps. A cet égard, les tests utilisant des réactifs marqués sont très sensibles.

On peut définir la spécificité comme le degré de fiabilité d'un résultat positif. Théoriquement, le résultat d'un test sérologique dépend uniquement de la réaction entre les déterminants antigéniques et les anticorps correspondants. Dans la plupart des cas cependant, d'autres facteurs interagissent. La spécificité de certains tests sérologiques est menacée par l'interférence de diverses réactions physico-chimiques parallèles, causant un «bruit de fond».

Les réactions sérologiques croisées posent un problème plus difficile. Elles sont dues au fait que des germes différents peuvent posséder en commun certains composants de la mosaïque antigénique. Les analogies de la structure antigénique s'accroissent dans la mesure où les organismes sont taxonomiquement plus rapprochés. Des combinaisons hétérologues d'antigènes et d'anticorps peuvent ainsi fournir des résultats faussement

positifs. En réalité, le test renvoie une image fidèle des déterminants antigéniques et des anticorps présents dans le mélange, mais l'interprétation peut en être trompeuse.

4. Sérodiagnostic et séroépidémiologie

Des tests sérologiques sont utilisés depuis longtemps pour le diagnostic individuel ou pour des enquêtes épidémiologiques (fièvre jaune, poliomyélite, rickettsioses, syphilis, etc.). Pour les infestations parasitaires, ils ont été introduits dans les 20 à 30 dernières années.

L'utilité diagnostique d'un test sérologique est d'autant plus grande que les germes responsables sont eux-mêmes plus difficiles à mettre en évidence du fait de leurs dimensions, de leur petit nombre ou de leur localisation chez le patient.

Dans les enquêtes sérologiques à grande échelle, les tests fournissent une information rapide sur la prévalence et l'incidence de l'infection.

La très grande majorité des tests de sérodiagnostic se basent sur la recherche d'anticorps. Les tests basés sur le dépistage d'antigènes sont en plein développement.

4.1. Tests de dépistage d'anticorps

4.1.1. Récolte et conservation des échantillons de sang

La qualité d'un test sérologique dépend en premier lieu de la qualité de l'échantillon à examiner. Le sérum pur est la substance idéale pour une réaction. Sur le terrain, il est cependant plus facile de prélever un petit échantillon de sang à la pulpe du doigt, par exemple au moyen d'un tube capillaire héparinisé dans lequel on isole le plasma. On peut aussi diluer l'échantillon dans un liquide tampon ou hémolysant, ou encore fixer la goutte de sang sur un papier-filtre et l'éluer ensuite.

Lorsque les tests ne peuvent être exécutés immédiatement, il est essentiel de conserver les échantillons de manière adéquate. Les anticorps IgM et IgE sont à ce point de vue particulièrement délicats.

4.1.2. Choix du test et du réactif antigénique

Pour des raisons de facilité, on peut faire choix d'un test commercialisé et utiliser une méthode classique. Un laboratoire de sérodiagnostic a tout intérêt à observer une certaine uniformité d'appareillage et de techniques. La préférence va de plus en plus à des méthodes d'analyse qu'on peut automatiser, par exemple les tests Elisa. Pour l'emploi sur le terrain, seuls les systèmes simples entrent en ligne de compte. Ce sont les tests d'agglutination qui répondent le mieux à cette exigence, mais certaines versions très simples de tests immuno-enzymatiques sont également en préparation.

Celui qui désire préparer lui-même ses réactifs antigéniques peut s'inspirer de formules existantes. Les sources d'antigènes sont multiples: cultures in vitro, animaux expérimentalement infectés, matériel parasitaire provenant d'animaux infectés dans la nature ou de patients.

Certains antigènes peuvent être obtenus auprès de l'OMS.

La plupart des réactifs antigéniques peuvent être stabilisés par congélation ou lyophilisation. On peut donc, si nécessaire, en préparer de grandes quantités.

4.1.3. *Sensibilité et spécificité*

Lorsqu'on utilise un test de sérodiagnostic, il est d'usage de définir la sensibilité comme le pourcentage d'individus présentant un test positif parmi un groupe de personnes connues comme infectées. A ce point de vue, un test de dépistage d'anticorps présente l'inconvénient de n'être positif qu'après quelques semaines. D'autre part, certains anticorps subissent des variations de titres au cours de l'infection, en raison de modifications de leur synthèse ou de leur métabolisme *in vivo*. La spécificité des antigènes et la classe des immunoglobulines de l'anticorps jouent ici un rôle déterminant.

La spécificité d'un test de sérodiagnostic est généralement mesurée par le pourcentage de «faux positifs» parmi les personnes non touchées par l'infection recherchée. Pour l'évaluation de la spécificité, il est nécessaire de rechercher soigneusement la corrélation avec d'autres infections. Il existe un grand risque de réactions croisées perturbantes si l'on utilise un antigène non purifié. Les tests sérologiques d'infestations vermineuses, où l'on se satisfait parfois de résultats spécifiques de groupe, en sont un exemple frappant.

Pour renforcer la spécificité d'un test, il n'est pas toujours nécessaire d'utiliser la longue procédure de purification de l'antigène. On connaît depuis longtemps le principe de titration selon lequel, en procédant par dilutions, on peut mieux distinguer les «vrais positifs» des «faux positifs». L'interprétation est encore plus aisée lorsque l'on teste le sérum à l'aide d'un éventail de diverses préparations antigéniques. La méthode Elisa se prête bien à ce procédé. Il existe d'autres systèmes de tests, comme l'immuno-électrophorèse où les différents composants antigéniques sont fractionnés. On peut également mettre à profit la fragmentation naturelle des composants antigéniques: produits métaboliques ou de sécrétion, antigènes de surface et composants internes liés à la structure. Les antigènes de sécrétion ont souvent une grande spécificité. Pour les micro-organismes, ils peuvent être obtenus au départ de leurs métabolites en culture; pour les vers, on les laisse survivre un certain temps dans un milieu artificiel. Les antigènes de surface méritent aussi une attention particulière. Ils entrent sélectivement en compte dans les tests qui utilisent des organismes vivants ou judicieusement fixés. Pour utiliser la fragmentation antigénique au niveau des structures morphologiques ou subcellulaires, on peut réaliser des tests sérologiques au moyen d'anti-immunoglobulines marquées réagissant sur des préparations microscopiques. Enfin, on peut quelquefois augmenter la spécificité de manière

simple par dépistage sélectif d'anticorps de classes ou de sous-classes déterminées d'immunoglobulines.

Un test idéal de sérodiagnostic est à la fois très sensible et hautement spécifique. Mais les deux caractéristiques ne sont pas toujours conciliables. Si l'on désire s'en tenir à un seul test, on doit ou bien accepter une solution de compromis, ou bien donner la priorité à l'une des caractéristiques. Pour éviter ce dilemme, on peut utiliser deux tests: l'un hautement sensible, l'autre hautement spécifique.

4.2. *Tests de dépistage d'antigènes*

En sérologie moderne, on a tendance à compléter le dépistage des anticorps par la recherche des antigènes. Cette tendance a été remarquablement renforcée grâce à la possibilité de préparer des anticorps monoclonaux hautement spécifiques d'antigènes déterminés. Depuis longtemps déjà on met à profit la possibilité de visualiser des germes de petite taille ou peu nombreux, par leur coloration immunochimique au moyen d'anticorps marqués. Progressivement l'on s'est acheminé vers un système consistant à dépister à l'aveugle, par immunochimie, un antigène déterminé dans un prélèvement, qui peut être aussi bien de l'urine, du sang, des matières fécales, de la lymphe, du liquide cébrospinal, du matériel de biopsie, un milieu de culture, que tout autre échantillon. L'antigène visé peut être lié à la structure du germe, ou être présent en solution. Le grand art consiste à sélectionner des composants antigéniques qui soient significatifs pour le diagnostic. Ici encore se pose le problème de la sensibilité et de la spécificité.

Dans la plupart des tests de dépistage d'antigènes, on utilise des anticorps marqués par des enzymes ou par des substances radioactives. On cherche à développer des tests simples d'agglutination. Certains sont déjà disponibles sur le marché (p.ex. hépatite B, rotavirus, cryptocoques, schistosomes).

La présence d'antigènes signe la présence d'une infection ou d'une infestation active. Le test peut être positif à un stade précoce de l'infection, et deviendra rapidement négatif après guérison. La spécificité peut être garantie par l'emploi d'anticorps monoclonaux bien choisis. Ce sont autant d'avantages sur la recherche d'anticorps. On va vraisemblablement vers l'emploi simultané des deux catégories de tests.

4.3. *Etudes statistiques*

Il existe des modèles mathématiques et des programmes informatisés pour l'organisation et l'interprétation d'enquêtes séro-épidémiologiques. Il est conseillé de recourir à l'avis d'experts avant d'entreprendre des enquêtes à grande échelle.

Une notion importante en matière de tests de sérodiagnostic est leur valeur prédictive. Elle dépend de leur sensibilité et de leur spécificité et varie en fonction de l'incidence de l'infection dépistée.

5. Application des techniques immunologiques au diagnostic de la trypanosomiase africaine

Les nombreuses études immunologiques consacrées à la trypanosomiase africaine ont poursuivi trois objectifs majeurs: l'amélioration du diagnostic par la mise au point de tests sérologiques, la caractérisation antigénique des parasites et l'étude des manifestations immunopathologiques au cours de l'infection.

La méthode classique de diagnostic repose sur la recherche du parasite dans le suc ganglionnaire, le sang et le liquide céphalorachidien. Cet examen parasitologique est fastidieux et aléatoire car les trypanosomes sont souvent en nombre réduit, et leur présence est irrégulière au cours de l'évolution de la maladie.

De nombreux chercheurs ont exploré les possibilités diagnostiques de diverses méthodes sérologiques. Les pionniers se servaient déjà du test de gélification au formol, technique extrêmement simple mais peu spécifique, basée sur le déséquilibre protéinique du sérum des trypanosés, essentiellement représenté par l'hyperglobulinémie.

A partir de 1940, plusieurs chercheurs belges, parmi lesquels J. Rhodain, C. Van Goidsenhoven, F. Schoenaers, A. Dubois, F. Evens, A. Kaeckenbeek et G. Neujean, ont travaillé à la mise au point d'un test plus spécifique, notamment la réaction de fixation du complément. Comme en témoignent de nombreuses publications, les obstacles les plus difficiles à surmonter ont été d'une part, l'obtention de trypanosomes purs à partir de sang de rats fortement parasités, et d'autre part, la préparation d'un réactif antigénique stable et dépourvu d'activité anticomplémentaire. Le problème de la séparation sélective de trypanosomes sanguicoles fut définitivement résolu en 1968 par S. Lanham qui introduisit une technique d'échangeurs d'ions.

Vers la fin des années cinquante, Charmot, P. Grabar et P. Burtin mettaient en évidence la macroglobulinémie de type IgM dans le sérum des patients trypanosés. Un peu plus tard, plusieurs chercheurs français en montraient l'intérêt diagnostique et développaient des techniques simples de dosage. En 1966, G. Binz, G. Timperman et M.P. Hutchinson utilisaient ce paramètre pour effectuer une enquête dans le sous-district de Gombe Sud au Zaïre, portant sur près de 10 000 personnes; 200 nouveaux cas ont été dépistés.

Au cours des années soixante, une nouvelle méthode sérologique fait son entrée dans certains laboratoires d'Afrique: le test d'immunofluorescence indirecte. Parmi les avantages que présente cette épreuve, il faut mentionner la grande sensibilité, l'exécution aisée, le coût réduit et la facilité de l'échantillonnage. Des gouttes de sang prélevées au doigt sont récoltées sur papier filtre, puis envoyées au laboratoire. Au Zaïre, cette méthode a été introduite par le laboratoire de parasitologie de l'Université de Kinshasa, sous la supervision successive de M.

Wéry, P. Kageruka, M.C. Henry et P. Mulumba. Son application générale a été organisée par le Bureau Central de la Trypanosomiase sous la direction de J.F. Ruppel et G. Kazyumba. Dès lors, des centaines de milliers de Zaïrois ont été soumis à cet examen. Le laboratoire de sérologie de l'Institut de Médecine Tropicale à Anvers a résolu le problème de la standardisation de l'antigène par la préparation d'un réactif lyophilisé contenant des trypanosomes de type antigénique défini. Ce réactif est à la disposition de tous les techniciens.

Au cours des années soixante-dix, l'épreuve immunoenzymatique Elisa vient s'ajouter à la gamme des tests sérologiques. Plusieurs auteurs en ont démontré la valeur dans le diagnostic de la maladie du sommeil. T. Vervoort et ses collègues parviennent à augmenter la sensibilité et la reproductibilité de la méthode par l'utilisation d'antigènes sélectionnés.

Toutefois l'application du test Elisa et même celle de l'immunofluorescence est restée trop limitée. Ces tests de laboratoire ont comme principal inconvénient le délai parfois considérable entre le moment de l'échantillonnage et la lecture des résultats, entraînant des difficultés pour retrouver les séropositifs.

En 1975, G.J. Boné et J. Charlier introduisent un test d'hémagglutination indirecte permettant le diagnostic sur le terrain. L'antigène est stable; il est fourni lyophilisé en doses individuelles dans des tubes capillaires. Les manipulations sont simples et la réponse est obtenue en une demi-heure. Sous sa forme commercialisée, ce test connaîtra un grand succès, mais pour des raisons obscures, il n'a pas été appliqué à très grande échelle. D'après certains commentaires, il serait encore d'exécution trop compliquée.

En 1978, E. Magnus, T. Vervoort et N. Van Meirvenne ont atteint la limite de la simplification en proposant un test d'agglutination sur carte qui peut être exécuté en quelques minutes: on mélange une goutte de réactif contenant des trypanosomes colorés avec une goutte de sang, de sérum ou de plasma. Une évaluation préliminaire organisée par l'OMS en 1983 a démontré les possibilités de ce test. Depuis lors, il a été mis progressivement en application au Zaïre (Testryp-CATT, cf. p. 250).

Caractérisation antigénique des parasites

Une connaissance précise de la structure antigénique des trypanosomes est indispensable pour comprendre les relations immunologiques entre l'hôte et le parasite.

En 1975, D. Le Ray a publié une étude détaillée des structures immuno-électrophorétiques exprimées par *Trypanosoma brucei* au cours du cycle évolutif. Au total 48 composants antigéniques ont été objectivés. Ils se répartissent en antigènes hétérospécifiques, présents sur toutes les formes parasitaires, et en antigènes spécifiques. Le premier groupe représente environ 20% du profil antigénique et contient surtout des composants partagés avec le milieu de culture ou le sérum de l'hôte. Les

antigènes spécifiques se répartissent eux-mêmes en deux groupes, suivant que leur expression au cours du cycle est constante ou qu'elle est limitée à la surface des formes métacycliques et sanguicoles. En outre cette étude a confirmé que les antigènes variables sont les seuls capables d'induire une immunité protectrice.

Le phénomène de la variation antigénique chez les trypanosomes africains, connu depuis le début du siècle, a attiré l'attention de dizaines de chercheurs. Parmi eux, N. Van Meirvenne, P.G. Janssens, E. Magnus et D. Le Ray ont contribué à l'étude systématique des répertoires antigéniques par l'introduction de nouvelles méthodes de sérotypage. Cette approche a mené à l'identification d'une série d'antigènes variables prédominants utilisables dans le sérodiagnostic.

A partir de 1978, de nombreux biologistes moléculaires entreprirent l'étude des bases génétiques de la variation antigénique. Au département de biologie moléculaire de l'Université Libre de Bruxelles et de la Vrije Universiteit Brussel, M. Steinert, E. Pays, R. Hamers, G. Matthijssens et leurs collaborateurs ont fourni une contribution remarquable à cette étude. La recherche actuelle s'oriente surtout vers le sérotypage des trypanosomes métacycliques excrétés par la mouche tsé-tsé. On sait déjà qu'il s'agit là d'un mélange de variants antigéniques relativement constant et moins hétérogène.

Immunopathologie

La composante immunopathologique dans la pathogénèse de la maladie du sommeil était depuis longtemps prévisible sur une base d'analogie avec des mécanismes bien connus de l'immunologie fondamentale. Néanmoins, ce n'est qu'à partir de 1973 que les données expérimentales commencèrent à démontrer l'exactitude des hypothèses (P. Boreham, B.M. Greenwood et L.G. Goodwin). Malheureusement la recherche en immunopathologie exige des laboratoires bien équipés (P.H. Lambert, M. Berney et G. Kazyumba: analyses sur des échantillons de sérum et de liquide céphalorachidien de patients zaïrois).

Plus récemment, à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers P. Mulumba, M. Wéry, E. Van Marck et P. Gigase ont mené une recherche histopathologique et immunologique des lésions cérébrales au cours de la trypanosomiase expérimentale.

Perspectives

La lutte contre la maladie du sommeil à *Trypanosoma gambiense* nécessite le dépistage et le traitement systématique des nouveaux cas. Le dépistage n'est plus pensable sans faire appel à des tests sérologiques. Actuellement, les tests d'agglutination directe et indirecte sont les seules méthodes suffisamment simples pour être utilisées sur le terrain. Les techniques utilisant comme marqueurs des isotopes, fluorochromes ou enzymes ne peuvent être utilisées que dans des laboratoires bien équipés. L'analyse immuno-enzymatique Elisa pourrait éventuellement

être adaptée aux conditions du terrain. D'autres tests simples mis au point récemment, permettant la visualisation d'immun-complexes sur un support de matière solide ou gélifiée, restent à évaluer. Du point de vue général, tous les tests peuvent être améliorés quant à leur sensibilité, spécificité et simplicité. Certes, l'utilisation d'anticorps monoclonaux sélectionnés permettra la mise au point de tests très spécifiques pour la détection d'antigènes circulants.

En raison du phénomène de la variation antigénique, il semble y avoir peu d'espoir de parvenir à la production d'un vaccin classique contre la trypanosomiase africaine.

Les aspects immunopathologiques de la maladie du sommeil méritent des études approfondies, y compris des essais thérapeutiques de lutte contre certains phénomènes inflammatoires.

6. Conclusions

Les affections causées par des virus, des micro-organismes, des protozoaires, des vers et des champignons continuent à menacer la santé des hommes et des animaux. La lutte contre les vecteurs, l'amélioration de l'hygiène, de nouveaux moyens chimioprophylactiques et chimiothérapeutiques peuvent résoudre une grande part des problèmes. L'immunologie est en mesure d'apporter une importante contribution sur le plan de la prophylaxie, du diagnostic et de la thérapeutique.

L'apport de la sérologie peut être esquissé selon le scénario suivant: en premier lieu, il semble nécessaire d'inventorier de manière systématique, au moyen d'anticorps monoclonaux, les structures antigéniques des principaux germes. Pour réaliser cet objectif en un temps raisonnable, il faudra automatiser en grande partie les procédés d'analyses. Des antigènes importants pourraient être mieux caractérisés au moyen des technologies existantes. Si ces antigènes sont difficiles à isoler à partir du milieu naturel, il est possible de les synthétiser par manipulations génétiques ou par des procédés classiques.

Caractériser les antigènes conduit automatiquement à des méthodes simples de sérotypage qui utiliseront de plus en plus des anticorps monoclonaux.

On peut s'attendre à une amélioration progressive de la sensibilité et de la spécificité des tests de sérodiagnostic. Leur utilisation à grande échelle sera stimulée par la commercialisation de tests simples et standardisés. Les tests de dépistage d'anticorps pourront être sensiblement améliorés par l'emploi de préparations d'antigènes mieux définies et par la différenciation des isotypes d'immunoglobulines. C'est cependant du développement des tests de dépistage d'antigènes que l'on doit attendre le progrès le plus spectaculaire.

On peut espérer enfin que la recherche sérologique contribuera à l'identification des antigènes protecteurs pour la préparation de vaccins.

N. Van Meirvenne

BIBLIOGRAPHIE

- BIQUET J., ROSE F., CAPRON A. & TRAN VAN KY P. (1965), Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immuno-électrophorèse, — *Rev. Immunol.*, Paris, 29, pp. 5-23.
- COHEN S. & WARREN K. (1982), *Immunology of parasitic infections*, Blackwell Sci. Public., Oxford.
- MOREL C. (1984), *Genes and antigens of parasites, A laboratory manual*, Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- OMS (1985), *Recherche sur les maladies tropicales, TDR. Septième rapport du Programme.*
- OMS (1989), Utilisation d'antigènes de synthèse pour le diagnostic des maladies infectieuses, — *OMS Sér. Rapp. Techn. n° 784*, 82 p.
- SOULSBY E. (1987), *Immune responses in parasitic infections, Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis*, Vol. I: *Nematodes*, Vol. II: *Trematodes and Cestodes*, Vol. III: *Protozoa*, Vol. IV: *Protozoa, Arthropods and Invertebrates*, CRC Press, Boca Raton (Floride).
- VOLLER A. & DE SAVIGNY D. (1981), Diagnostic Serology of tropical parasitic diseases, — *J. Immunological Methods*, 46, pp. 1-29.
- WEIR D.M. (1986), *Handbook of experimental Immunology*, Vol. 1: *Immunochemistry*, Vol. 2: *Cellular Immunology*, Vol. 3: *Genetics and molecular Immunology*, Vol. 4: *Application of Immunological methods in Biomedical Sciences*, Blackwell Sci. Public., Oxford.

Thèse d'agrégation

- LURHUMA ZIRIMWABAGABO (1977), *Les complexes immuns circulants, leur mise en évidence et perspectives dans les domaines diagnostiques et thérapeutiques*, KUL, Louvain.