

**Contribution à l'étude des antigènes totaux
et des antigènes d'excrétion-sécrétion de *Fasciola hepatica* :
Purification d'un antigène somatique isolé
à partir de l'homogénat brut de douves adultes.**

***Hemissi Ahmed , **Benerbaïha Roumaila. S.**

*Département de Biologie. Université de Guelma. 24000.

**Laboratoire de parasitologie. Centre universitaire d'El-Tarf.

Résumé

Compte tenu de la complexité protéique des antigènes totaux de *Fasciola hepatica* (FhTA), la chromatographie d'exclusion diffusion, réalisée sur gel sephadex G-100, a donné cinq fractions antigéniques.

L'électrophorèse SDS- PAGE, effectuée sur les différents constituants antigéniques, a permis de mettre en évidence plusieurs bandes peptidiques de poids moléculaires variés, compris entre 10 et 180 Kd. Le test d'immunodiffusion prouve que la majorité des fractions de l'antigène FhTA sont douées d'activité antigénique, en présence de l'anti- sérum du lapin.

La fraction F.1, séparée à partir de l'homogénat total FhTA, est la seule fraction à avoir développée une réaction de précipitation très positive avec la Concanavoline A. Elle est donc purifiée sur colonne d'affinité ConA- Sepharose 4B. La molécule ainsi obtenue a été caractérisée par SDS- PAGE, et le profil électrophorétique a fait apparaître une seule bande de PM d'environ 40 Kd.

Mots clés : *Fasciola hepatica* ; Antigènes somatiques ; purification ; Chromatographie d'exclusion-diffusion ; affinité.

Summary

Taking into account the proteinic complexity of the Fasciola hepatica total antigens (FhTA), the exclusion-diffusion chromatography carried out on Sephadex G-100 gel, gave five antigenic fractions.

The SDS-PAGE electrophoresis, realized on the various antigenic components, made it possible to highlight several peptidic bands of varied molecular weights, ranging from 10 to 180 Kd. The immunodiffusion test proved that the majority of FhTA fractions are endowed with antigenic activity, in the presence of rabbit antiserum.

The fraction (F.1), separated starting from FhTA, is the only one to have developed a reaction of precipitation very positive with the Concanavoline A. it is thus purified by ConA sepharose-4B affinity column. The molecule obtained was then characterized by SDS-PAGE, and the electrophoretic profile revealed only one band of MW of approximately 40 Kd.

Key words : *Fasciola hepatica* ; Somatic antigens ; purification ; exclusion-diffusion chromatography ; affinity.

Introduction

Fasciola hepatica est un trématode, de structure complexe, qui contient de nombreuses substances douées de pouvoir antigénique. Ses antigènes peuvent être divisés en deux catégories :

- les antigènes somatiques, qui font partie intégrante de la structure du parasite ;
- les antigènes métaboliques qui sont les produits d'excrétion-sécrétion libérés spontanément dans les tissus de l'hôte.

La diversité antigénique de *F. hepatica* a fait d'elle, l'objet de plusieurs investigations ; les premiers travaux de Biguet et al [1], portant sur la séparation électrophorétique des différents constituants du broyat total de *F. hepatica* adulte, ont permis la mise en évidence de quinze fractions antigéniques. Tailliez et Korach [2], en se basant sur les résultats précédemment cités, ils ont déterminé, parmi la mosaïque antigénique, l'existence d'une fraction antigénique, qui a la particularité d'être très immunogène et spécifique à *F. hepatica*.

Jusqu'à ces dernières années, les antigènes bruts excrétés-sécrétés de *F. hepatica* ont été largement employés dans les dépistages sérologiques car ils sont responsables de la révélation précoce des anticorps spécifiques et de la stimulation d'une immunité protectrice chez l'hôte [3]. Cependant, ces antigènes sont d'obtention difficile et présentent des fractions non spécifiques [4]. Par ailleurs, l'évaluation des performances des différentes préparations antigéniques utilisées dans l'immuno-diagnostic de la fasciolose animale par le test Elisa [5],[6],[7],[8] a montré des réactions croisées s'expliquant par l'absence de la spécificité immunologique entre les immun-sérums et les extraits bruts de *F. hepatica*. Ceci justifie l'emploi de méthodes fiables pour l'isolement d'antigènes parasitaires hautement spécifiques. Cuperlovic [9], Cuperlovic et Lalic [10] ont décrit une technique de fractionnement des produits excrétés-sécrétés *in vitro* par les formes adultes de *F. hepatica*. L'antigène obtenu a été ensuite utilisé dans la réaction de fixation du complément pour l'exploration de la réponse immunitaire chez des lapins expérimentalement infestés. Hillyer et Serrano [5] ont, par ailleurs, constaté qu'au cours de la phase prépatente d'une fasciolose expérimentale chez les lapins, l'antigène somatique isolé à partir de l'extrait total de *F. hepatica* par fractionnement au sulfate d'ammonium, possède un potentiel immunodiagnostic satisfaisant, et détecte les anticorps spécifiques dès la 2^{ème} semaine post-infestation.

Dans cette étude, afin d'augmenter les possibilités du diagnostic immunologique de la fasciolose animale par le test Elisa, on a choisi de

mettre au point une technique de purification des antigènes somatiques de *F. hepatica*, en raison de leur obtention facile. Une étude immunologique et électrophorétique sur SDS-PAGE serait nécessaire pour caractériser l'antigène purifié.

Matériels et méthodes :

1- Antigènes :

- Obtention des excrétions-sécrétions de *F. hepatica* (FhES)

Des douves vivantes, prélevées à l'abattoir sur des foies de bovins parasités, subissent plusieurs lavages au tampon phosphate PBS, pH 7.2, 0.05M. Elles sont ensuite maintenues deux heures à la température ambiante dans ce tampon, en présence de 1 mM phényl méthyl sulfonyl fluoride (PMSF) et 0.01 % Azide de sodium (NaN_3) [4],[11]. Le milieu d'incubation est passé sur un filtre de nylon d'une porosité de 40 μm puis centrifugé à une vitesse de 3500 tours/minute, à +4 °C. Le surnageant contenant les excrétions-sécrétions est mis en dialyse contre le tampon PBS et conservé à -20 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

- Obtention des antigènes totaux de *F. hepatica* (FhTA)

Les douves qu'on a récupéré après incubation ont subi trois cycles de congélation-décongélation de façon à fragiliser leurs parois. dix grammes (10 g) de douves adultes, séchés à l'air sont broyés puis ultrasonorisés une minute, à basse température, à l'aide d'une sonde moyenne à l'amplitude 04. Le broyat est alors homogénéisé avec 20 ml de tampon PBS, pH 7.2, 1 mM PMSF et 0.01 % NaN_3 [12]. Après centrifugation à 12000 tr/min pendant 01 h, on récupère le surnageant qui constitue l'antigène somatique brut. Il est dialysé à +4 °C pendant une nuit, puis conservé à -20 °C.

2- Sérums

Les sérums anti-extrait total de *F. hepatica* ont été obtenus par immunisation des lapins. A la 1^{ère} immunisation, 1 mg d'antigène brut additionné à 500 μl de PBS et à 500 μl d'adjuvant complet de Freund, a été administré au lapin. Pour les 2^{ème} et 3^{ème} immunisations, 1 mg d'antigène mélangé à 500 μl de PBS et à 500 μl d'adjuvant incomplet de Freund, a été administré respectivement 07 jours et 15 jours après la première immunisation. Les immun-sérums ont été recueillis une semaine après la dernière immunisation [13],[14]. Enfin les sérums des lapins ont été réunis dans un pool.

3- Concentration des protéines antigéniques

En raison de sa faible concentration dans le milieu d'incubation, le produit d'excrétion-sécrétion a subi une concentration par précipitation au sulfate d'ammonium à 80% de saturation [2],[5]. Cette manipulation est réalisée à 0 °C pendant 01 h sous agitation rotatoire. La suspension incubée une nuit à +4 °C, centrifugée à 3000 tr/min. le culot obtenu est repris avec du PBS puis dessalé par deux dialyses contre de l'eau distillée, et rééquilibré enfin par une autre dialyse contre du tampon. Le produit final constitue l'antigène excrété-sécrété FhES qui va nous servir d'échantillon plus concentré, dont l'analyse par gel filtration permettra d'avoir un bon profil chromatographique.

4- Chromatographie de gel filtration

Les antigènes somatiques (totaux) de *F. hepatica* ont été fractionnés dans une colonne (1,1 × 65 cm) de gel sephadex G-100 [Sigma], préalablement équilibrée avec du tampon PBS, pH 7.2, 0.01 % NaN₃ [12], [15]. Après avoir testé l'homogénéité du gel par passage du bleu de dextran, l'extrait brut FhTA a été resolubilisé dans le tampon de préparation (PBS) puis introduit, à raison de 0.8 ml, dans le gel suivi d'un volume égal de saccharose à 3 %. Séparément, et dans les mêmes conditions de travail, 01 ml du produit excrétoire-sécrétoire FhES ont été passés à travers cette même colonne. L'élution des différentes fractions antigéniques a été réalisée, pour les deux types d'antigènes, avec du tampon PBS, pH 7.2, 0.15 M, à l'aide d'une pompe péristaltique à un débit d'écoulement de 18 ml/h, et les fractions récoltées à raison de 1,5 ml ont été analysées par spectrophotomètre à 280 nm. Les tubes issus du fractionnement de l'antigène total FhTA, et qui constituent le premier pic du chromatogramme, ont été réunis pour former la première fraction (F.1).

La réactivité avec la Concanaline A (ConA) des différentes fractions de FhTA a été testée par la technique du "ring test", qui consiste à déposer dans un tube contenant la conA, la solution antigénique. Si la fraction testée possède une affinité à la conA, il se forme un précipité à l'interface des deux solutions.

5- Chromatographie d'affinité

La 1^{ère} fraction, obtenue par filtration moléculaire de l'antigène total FhTA, a subi une chromatographie sur colonne d'affinité conA-Sepharose 4B (0.5 × 6 cm) [Sigma chemical], préalablement équilibrée avec dix fois son volume de tampon d'élution Tris. 10 mM, pH 7.2, NaCl,

0.5 M contenant 1 mM MnCl₂ et 1 mM CaCl₂. Le produit dialysé deux fois avec 200 ml de tampon a été déposé à raison de 1 ml sur la colonne. La fraction non adsorbée par le gel a été éluée en premier temps dans le tampon Tris jusqu'à ce que le fluide à la sortie fournisse une densité optique (D.O) inférieure à 0.02 pour une longueur d'onde de 280 nm. L'élution de la fraction liée a été réalisée ensuite à l'aide d'une solution concentrée de D- glucose 0.8 M. Des fractions de 0.5 ml ont été recueillies, à raison de 10 ml/h. Le pic présentant une activité antigénique (Fraction non-liée) est analysé par électrophorèse SDS- PAGE.

6- Quantification des protéines et des carbohydrates

Les concentrations en protéines des différents constituants antigéniques de *F. hepatica* ont été déterminées par la méthode de Bradford [16] utilisant le bleu brillant de coomassie. La quantification des carbohydrates totaux a été effectuée par la méthode au phénol-acide sulfurique décrite par Dubois et al [17].

7- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse des protéines antigéniques en SDS- PAGE a été effectuée selon la technique de Laemmli [18] dans un gel de séparation à 10 % d'acrylamide avec un rapport acrylamide / bis acrylamide de 30 : 0.8. L'acrylamide a été dissoute dans un tampon Tris-Hcl. 1.5 M. pH 8,8, 1 % (P/V) SDS, 0.5 % (P/V) persulfate d'ammonium et 0.033 % (V/V) temed. Le gel de concentration est constitué de 5 % d'acrylamide dans du tampon Tris- HCL. 0.5 M. pH 6,8 additionné de 1 % (P/V) SDS, 0.5 % (P/V) persulfate d'ammonium et 0.05 % temed. Les échantillons ainsi que les protéines servants de marqueurs sont dissociés par chauffage à 100 °C, pendant cinq minutes dans un tampon Tris- Hcl. 125 mM. pH 6,8 contenant 4 % SDS, 2,5 % 2-mercaptoéthanol, 0,1 % glycérol et 0,02 % de bleu de bromophénoï qui servira à identifier le front de migration. Les différents antigènes ont été placés du côté de la cathode, en contact avec le tampon d'électrophorèse composé de Tris- Hcl. 25 mM. pH 8,3, Glycine 0,192 M et 0,1 % SDS, et un courant constant de 100 V est appliqué. Les protéines séparées sur le gel sont colorées au bleu de coomassie R- 250.

8- Test d'immunodiffusion

L'immunoréactivité des antigènes a été testée, vis-à-vis de l'anti- sérum du lapin, par la technique de double diffusion d' Ouchterlony [19].

La diffusion est effectuée sur gélose à 1 %, préalablement liquéfiée dans du tampon véronal 0,05 M. pH 8,2. Les fractions antigéniques testées n'ont pas été diluées, alors que l'anti-sérum a été utilisé à une dilution de 1/100.

Résultats

Le fractionnement de l'extrait antigénique total de *Fasciola hepatica* FhTA par chromatographie d'exclusion-diffusion sur gel Sephadex G-100, a permis l'obtention de cinq fractions antigéniques (Fig. 1). la première fraction (F.1), obtenue directement après le

volume mort, est représentée par un pic assez asymétrique, mais très développé indiquant une forte concentration protéique.

Les autres fractions, obtenues dans des volumes d'éluion distincts, compris entre 30 et 100 ml, sont représentées par des pics mineurs, presque identiques et espacés.

Par ailleurs, le produit d'excrétion-sécrétion, fractionné par la même technique chromatographique, sur gel Sephadex G-100, n'a donné que trois fractions (Fig. 2) .

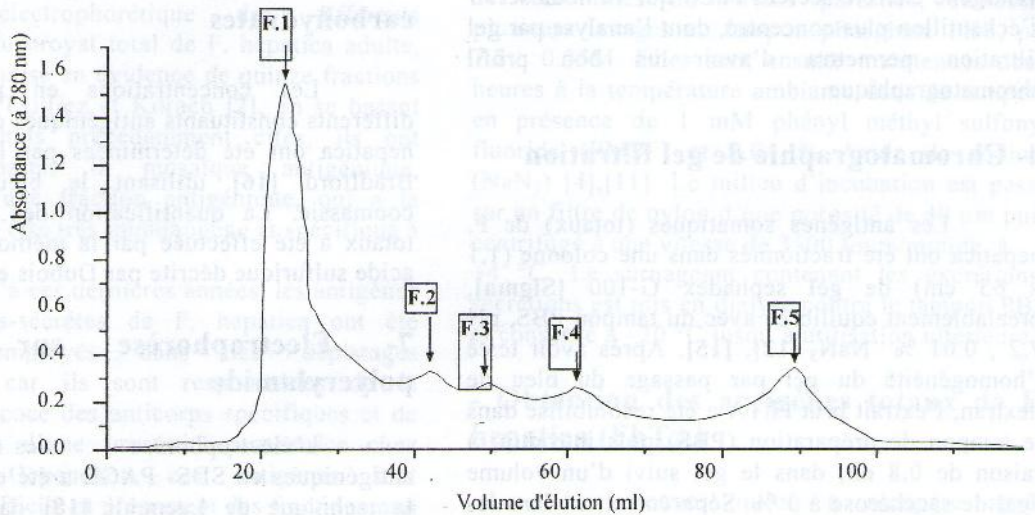


Figure (1) : Tracé chromatographique de la filtration moléculaire de l'antigène somatique de *Fasciola hepatica* (FhTA) sur gel Sephadex G- 100.

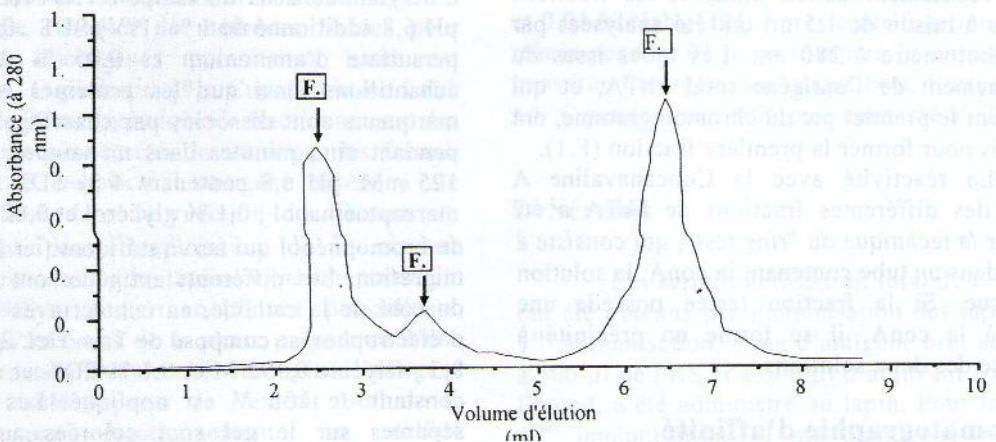


Figure (2) : Tracé chromatographique de la filtration moléculaire de l'antigène brut excrété- sécrété de *Fasciola hepatica* (FhES) sur gel sephadex G-100.

Le tableau n°1, montre les valeurs colorimétriques des protéines et des carbohydrates issus du dosage des différents constituants antigéniques de *Fasciola hepatica*.

Tableau n°1: Valeurs colorimétriques des protéines et des carbohydrates obtenues par dosage des différentes fractions antigéniques de *Fasciola hepatica*.

* déterminées par la méthode de bradford.

** déterminés par la méthode au phénol- acide sulfurique.

Produits Antigéniques	Protéines * (mg/ml)	Carbohydrates ** (mg/ml)
FhTA	12.00	3.70
Fract. 1	2.30	1.40
Fract. 2	2.10	0.60
Fract. 3	3.80	0.90
Fract. 4	1.20	0.15
Fract. 5	0.50	0.08
PES	0.85	2.30

La purification de la première fraction antigénique dont la réactivité avec la ConA est hautement positive, a été réalisée sur une colonne d'affinité et les résultats obtenus sont représentés dans la (Fig. 3).

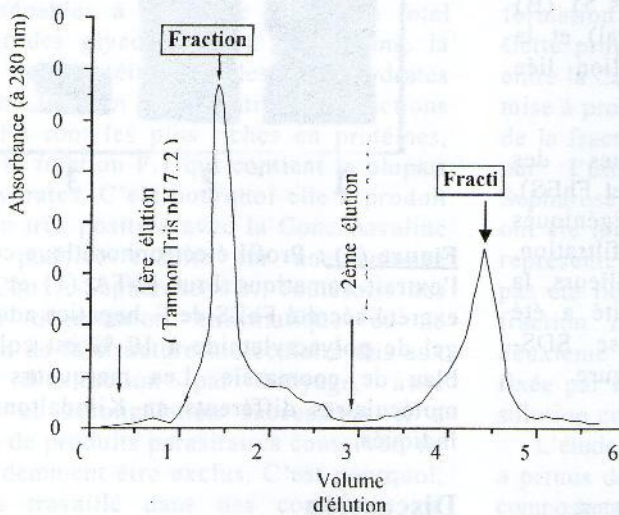


Figure (3) : Profil de chromatographie d'affinité ConA- Sepharose 4B de la fraction n°1 (F.1) issue du gel filtration de l'antigène somatique (FhTA).

Dans la (Fig. 4), sont représentés les résultats d'immunodiffusion. La formation de complexes anticorps- antigènes (réaction positive) entraîne l'apparition sur la surface du gel, autour du puits central, d'arcs de précipitation colorés en bleu par le réactif de Coomassie

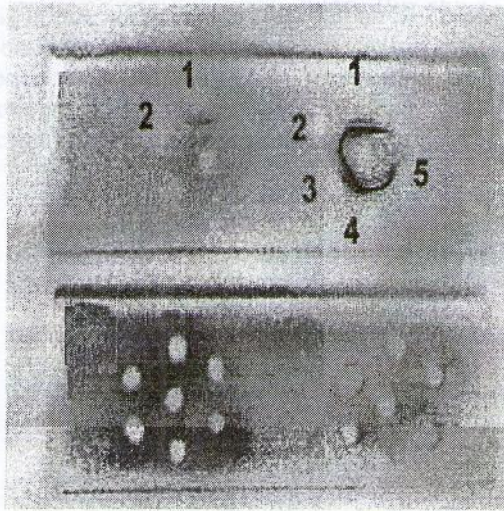


Figure (4) : Réactions d'immunodiffusion. (A) entre le sérum anti-FhTA (puits central) et les différentes fractions : F.1 (puits 1), F.2 (puits 2), F.3 (puits 3), F.4 (puits 4) et F.5 (puits 5). (B) entre le sérum anti-FhTA (puits central) et la fraction non- liée (puits 1), la fraction liée (puits 2). (C) sérum négatif.

Les profils électrophorétiques des antigènes bruts de *F. hepatica* (FhTA et FhES), ainsi que les différentes fractions antigéniques séparées par chromatographie de gel filtration, sont regroupés dans la (Fig. 5). Par ailleurs, la molécule purifiée sur colonne d'affinité a été également analysée par électrophorèse SDS-PAGE, et est représentée sur la même figure.

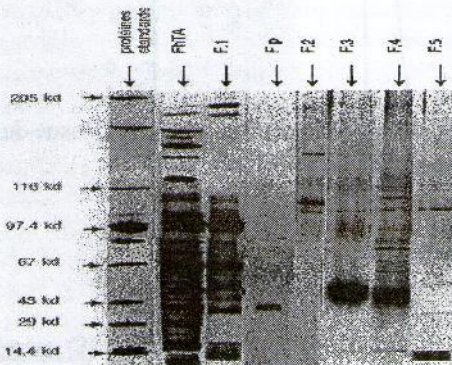


Figure (5) : Profils de séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à 10 %, coloré par le bleu de

coomassie, de l'antigène brut (FhTA), la fraction purifiée (Fp) et les différentes fractions antigéniques de *F. hepatica*.

Les résultats de l'étude comparée (Fig. 6), réalisée sur les deux types d'antigènes par électrophorèse SDS-PAGE, en présence des marqueurs standards, a permis d'avoir deux profils de migration électrophorétiques dont l'aspect est relativement similaire.

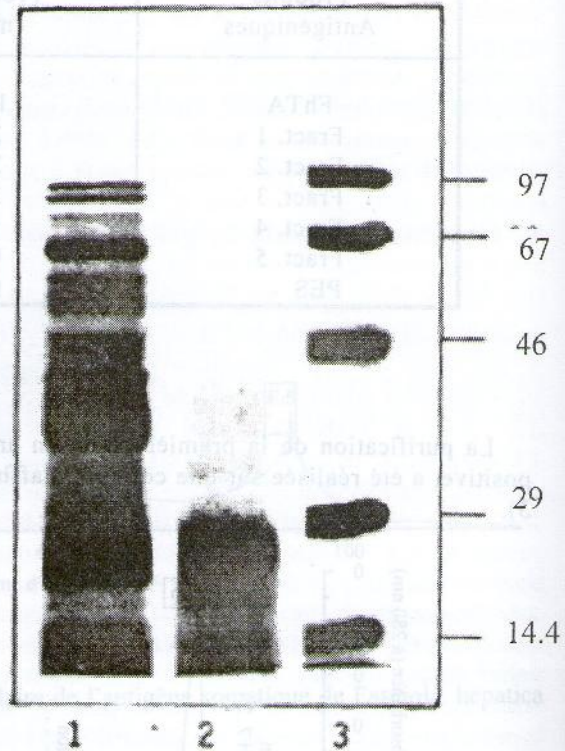


Figure (6) : Profil électrophorétique comparé de l'extrait somatique brut FhTA (1) et l'antigène excrété-sécrété FhES de *F. hepatica* adulte (2). Le gel de polyacrylamide à 10 % est coloré par le bleu de coomassie. Les marqueurs de poids moléculaires différents en Kilodaltons (3) sont indiqués.

Discussion

La chromatographie de gel filtration est une technique qui se révèle très utile dans la séparation des protéines antigéniques les plus complexes. Son emploi conduit en effet à l'obtention de diverses fractions riches en protéines antigéniques. Les pics correspondants aux différentes fractions séparées sont relativement homogènes, développés et bien distants, ce qui prouve une bonne résolution chromatographique.

Ces résultats se rapprochent de ceux rapportés par Cecchini et Kasali [20] qui, en filtrant un broyat de douves adultes sur gel Sephadex G-200, ils ont obtenu six pics différents dont le deuxième, ayant un poids moléculaire supérieur, a révélé par le test Elisa une activité immunologique similaire à celle de l'antigène excrété-sécrété (ES). Cervi et al [21] ont par ailleurs fractionné le broyat total de *F. hepatica* et ont constaté, parmi les six fractions obtenues sur gel de sephadex G-100, l'existence de deux fractions (F. I_a et F. I_b) ayant révélé un comportement antigénique identique vis à vis de l'antisérum. Elles se sont alors inscrites dans la 1^{ère} fraction (F.I) et, par conséquent, cinq fractions très distinctes ont été retenues.

Pour ce qui est du produit excrétoire-sécrétoire, les résultats obtenus par l'application de la même technique de filtration moléculaire sur gel, sont en concordance avec ceux trouvés par Rivera et al [3], en utilisant le gel Sephacryl S-200.

D'autre part, Les taux satisfaisants en protéines et en carbohydrates confirment la reproductibilité des différentes techniques mises en œuvre pour l'isolement et la séparation des antigènes. En effet, et d'après les résultats du dosage colorimétrique effectué sur les différentes fractions antigéniques, il s'est avéré que toutes les fractions, séparées à partir de l'antigène total FhTA, sont des glycoprotéines. Néanmoins, la proportion des protéines et des carbohydrates diffère d'une fraction à une autre ; les fractions F1, F2 et F3 sont les plus riches en protéines, mais seule la fraction F.1 qui contient la plupart des carbohydrates. C'est pourquoi elle a produit une réaction très positive avec la Concanavoline A, et est purifiée ensuite sur une colonne d'affinité Con A-Sepharose 4B. Toutefois, des risques de dégradation enzymatique et de modification de la structure moléculaire dus aux techniques d'extraction par broyage, avec congélation et décongélation successives et à l'utilisation de produits parasitaires conservés, ne peuvent évidemment être exclus. C'est pourquoi, nous avons travaillé dans des conditions de température et de durée qui minimisent les risques d'auto-dégradation de l'antigène. En outre, les antigènes parasitaires sont des substances qui peuvent facilement être altérées en présence des enzymes protéolytiques produites généralement par les parasites dans leur milieu de culture [22]. L'incubation des douves dans un milieu tamponné, en présence d'un antiseptique (Azide de sodium NaN₃), permet de récolter les antigènes bruts dans les meilleures conditions. Aussi, l'emploi d'un agent anti-protéase (PMSF) au cours des différents processus d'isolement nous a permis également d'effectuer, à l'air ambiant, une

incubation assez longue sans qu'il se produise de décomposition ou dénaturation au niveau de la structure moléculaire des protéines antigéniques.

L'obtention d'antigènes solubles à la fois concentrés et dépourvus de contaminants lipidiques, nous a amené à utiliser la technique de précipitation au sulfate d'ammonium. Cette technique comporte, quant à elle, un risque au moins théorique de dénaturation du fait de l'emploi de solutions salines concentrées. Cependant, la limpidité des préparations antigéniques, leur pouvoir antigénique, leur mobilité électrophorétique militent en faveur d'une structure moléculaire intacte que confirme la constance des résultats concernant la composition, l'homogénéité et la stabilité des différentes préparations.

La nature glycoprotéique des antigènes totaux de *F. hepatica* a été également confirmée par la réaction de précipitation en milieu liquide ou réaction de "ring test", en présence d'une lectine Concanavoline A ; substance naturelle capable de reconnaître spécifiquement une structure glycanique, et permet ainsi de fractionner les glycoprotéines en fonction de l'accessibilité des résidus mannosyls et/ou glucosyls de leur chaîne glycanne. La 1^{ère} fraction (F.1), dont le taux en carbohydrates est très élevé par rapport aux autres fractions, a montré en effet une réaction fortement positive avec la ConA, qui s'est traduit par la formation d'un anneau clairement individualisé. Cette propriété de liaison (interaction covalente entre la ConA et les résidus glycosylés) a été donc mise à profit pour séparer la molécule protéinique de la fraction (F.1) des contaminants glucidiques par l'utilisation du gel d'affinité ConA-Sepharose 4B. Suite à cette purification, deux pics ont été mis en évidence (Fig. 3) ; le premier pic représente la fraction protéinique purifiée, qui n'a pas été liée par la ConA, et qui correspond à la fraction récupérée dans le tampon Tris ; le deuxième pic représente la fraction glucidique fixée par la ConA, et récupérée ensuite dans une solution concentrée de D-glucose.

L'étude sérologique par le test de double diffusion a permis de révéler l'activité antigénique des divers composants antigéniques de *F. hepatica* ; les fractions antigéniques, déposées dans les puits périphériques sur une couche de gélose (Fig. 4A), ont produit des arcs de précipitation très nets contre le sérum anti-FhTA qui a été déposé, quant à lui, dans le puits central, à l'exception de la fraction (F.5) qui s'est révélée négative par ce test. En revanche, seule la fraction non-liée "not-binding ConA fraction" qui forme une ligne de précipitation avec l'immun-sérum (Fig. 4B). Par contre, aucune réaction de précipitation positive n'a été observée entre le sérum normal et les fractions antigéniques testées (Fig. 4C). La fraction non-liée est donc douée d'un pouvoir antigénique dû à la nature protéinique de cette molécule. La fraction

liée "binding ConA fraction" ne forme, quant à elle, aucun trait de précipitation. Ceci, prouve que les carbohydrates en général, et en particulier les composés regroupant dans leurs structures de D-glucoses et/ou D-mannoses, sont dépourvus d'activité antigénique, et ont de ce fait une faible sensibilité par rapport aux protéines qui peuvent jouer un rôle essentiel sur le plan antigénique.

La complexité antigénique de *F. hepatica* a été démontrée par électrophorèse vertical, sur SDS-PAGE (Fig. 5). L'analyse électrophorétique de l'extrait antigénique total FhTA a permis donc de mettre en évidence plus de 45 bandes antigéniques colorées toutes par le bleu de coomassie, et au moins 12 peptides qui peuvent apparaître au niveau du profil de migration de l'antigène ES de *F. hepatica*. Les composants antigéniques de FhTA les plus abondants sont des groupes de peptides de PM compris entre 10 - 25, 30 - 35 et 60 à 90 Kd, ainsi que divers peptides de PM supérieurs de l'ordre de 125, 150, 168 et 180 Kd ont été nettement visualisés.

La migration électrophorétique de la F.1 a fait apparaître, en plus de quelques polypeptides de faible PM de l'ordre de 10 à 21 Kd, deux groupes de bandes majeures qui sont aussi commune à l'antigène total FhTA. La F.2 contient principalement trois composants antigéniques de PM supérieurs, alors que la majorité des bandes est observée à partir des profils de F.3 et F.4. Ces deux fractions ont, en fait, plusieurs antigènes en commun, notamment dans les régions de PM situés entre 45 à 60 et 90 à 120 Kd. L'apparition sur la F.5 de bandes mineures, d'aspects relativement invisibles, est due à l'existence de faible quantité de protéines, qui serait également à l'origine de l'absence d'activité antigénique au niveau de cette fraction.

L'examen du profil électrophorétique de la F.1, montre nettement l'élimination de quelques fractions peptidiques par rapport à l'antigène du départ, ce qui indique une séparation partielle suite à la filtration moléculaire de l'antigène brut. Puis, on constate l'apparition d'une seule bande après la purification de la fraction F.1 par affinité, ce qui signifie un degré de pureté très satisfaisant. En se basant sur la mobilité électrophorétique relative des marqueurs de PM connus, on a évalué le poids moléculaire de cette molécule qui est d'environ 40 Kd. Ce constituant antigénique qu'on a pu purifier par des techniques chromatographiques, s'approche de la fraction 43 Kd spécifique de *Fasciola* qui a été isolée, à partir d'un broyat total de douves adultes, par Shaker et al [23] sur une colonne d'affinité de gel sepharose- 4B couplé aux δ - globulines anti-shistosoma mansonii.

L'analyse SDS- PAGE comparée (Fig.6) a permis en outre de constater une abondance considérable dans les antigènes de FhTA dont le nombre apparaît trois fois plus supérieur que celui des antigènes ES. Cependant, il semble que les deux types d'antigènes sont similaires, ce qui mène à dire que les composants entrant dans la constitution de l'antigène somatique FhTA sont aussi présents au niveau de l'antigène métabolique ES, notamment en ce qui concerne les composants antigéniques ayant un PM inférieurs. Ce résultat auquel on est parvenu, a été déjà signalé par plusieurs auteurs [24], [25], [26]. Leurs travaux portés sur l'identification des différents types d'antigènes parasitaires, ont permis de révéler l'existence de certaine communauté antigénique entre les deux formes antigéniques.

La caractérisation des antigènes spécifiques par des méthodes immunologiques, à l'aide de sérums des différentes espèces hyperimmunisés, a fait l'objet de plusieurs expérimentations. Ruiz-Navarrete et al [27] ont analysé les différents composants de *F. hepatica* adulte, par la technique de Western blotting, en présence de l'anti-sérum des moutons et ont trouvé que divers constituants de *F. hepatica* de PM de l'ordre de 20, 30, 35 et 72 Kd sont reconnus par les sérums des ovins prélevés deux semaines après une infestation expérimentale. Ils ont remarqué par ailleurs que la fraction de PM 35 Kd est toujours fortement reconnue 6 à 8 semaines post-infestation. Des études similaires ont été menées par de nombreux auteurs [28], [29], [30], et les résultats obtenus ont montré que le groupe d'antigènes de FhTA de PM compris entre 30 et 38 Kd sont détectés, dès la 2^{ème} semaine de l'infestation, par les sérums de plusieurs espèces, en particulier des ovins et des bovins. Enfin, il est probable que la molécule qu'on a pu purifier, à partir de l'extrait somatique brut de *F. hepatica*, pourrait correspondre à cette catégorie d'antigènes précocement reconnue par des antisérums différents, en raison de leurs PM très proches.

Ce travail a été effectué dans le but d'approfondir les connaissances de bases qui sont acquises jusqu'à présent sur la complexité de la mosaïque antigénique de *Fasciola hepatica*, et de faire ainsi, par la mise au point de méthodes fiables d'isolement et de caractérisation, une initiation à l'élaboration de produits antigéniques purs pouvant être employés, avec succès, pour la quantification des anticorps dirigés contre les antigènes de *F. hepatica*, en utilisant un test immuno-enzymatique spécifique, l'Elisa Fasciolose.

Références

- [1] Biguet J., Capron A. et Tran Van Ky P., Les antigènes de *Fasciola hepatica*: Etude électrophorétique et immunoélectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondants à sept autres helminthes., *Ann. Parasitol.*, 37 (1962), pp. 221-231.
- [2] Tailliez R. et Korach S., Les antigènes de *Fasciola hepatica*. I. Isolement et caractérisation d'un antigène spécifique du genre., *Ann. Inst. Pasteur.*, 118 (1970a), pp. 61-78.
- [3] Riverra M.C.A., Santiago N. et Hillyer G.V., Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*., *j. parasitol.*, 74, N° 4 (1988), pp. 646-652.
- [4] Lehner R.P. et Swell M.H., A study of the antigens produced by adulte *Fasciola hepatica* maintained in vitro., *parasite Immunol.*, 2 (1980), pp. 99-109
- [5] Hillyer G.V. et Serrano A.E., Fractionation of *Fasciola hepatica* Tegument antigen and their application to the serodiagnosis of experimental fascioliasis by the enzyme-linked immunosorbent assay., *j. helminthol.*, 60 (1986), pp. 173-178.
- [6] Pourquier Ph., Caquineau L., Galaup M., LE Moal Y., Martin L., Salingardes F. et Turmel R., Evaluation de l'infestation naturelle de cheptels bovins par *Fasciola hepatica* d'après le titrage d'anticorps du sang ou du lait avec un réactif Elisa utilisant l'antigène spécifique F2., *Bull. Soc. Vét. Prat de France*, 79 (6-7) (1995), pp. 285-291.
- [7] Farrel C.J., Shen D.T., Wescott R.B. et Lang B.Z., An enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle., *Am. J. Vet. Res.*, 42 (1981), pp. 237-240.
- [8] Romasanta A.M., Romero J.L., Arias M., Sanchez-Andrade R., Lopez C., Diagnosis of parasitic zoonoses by immunoenzymatic assay-analysis of cross reactivity among the excretory/secretory antigens of *Fasciola hepatica*, *Toxocara canis*, and *Ascaris suum*., *Immunol. Invest.* 2003 Aug, 32 (3): 131-141.
- [9] Cuperlovic K., Metabolic antigen of *F. hepatica* in immunodiagnosis of fascioliasis., *Acta Veterinaria (Beograd)*, 22 (1972), pp. 219-223.
- [10] Cuperlovic K. et Lalic R., Studies of metabolic antigen activity of adult *Fasciola hepatica* by complement fixation test., *Acta Veterinaria (Beograd)*, 22 (1972), pp. 195-198.
- [11] Espino A.M., Rodriguez Medina J.R., Hillyer G.V., Isolation and immunological characterization of fatty acid binding proteins as a forms from *Fasciola hepatica*., *J. Parasitol.*, 2001, Oct; 87 (5), pp. 1028-1033.
- [12] Zimmerman G.L., Clark C.R., Separation of parasite antigens by molecular exclusion, anion exchange and chromatofocusing utilizing FPLC protein fraction systems., *Vet. Parasitol.* 1986, Mar; 20 (1-3), pp. 217-228.
- [13] Casanneva R., Hillyer G.V., Ramajo V., Oleaga A., Espinoza E.Y., Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh 15 fatty acid-binding protein. *J. Parasitol.* 2001, Jun; 87 (3), pp. 697-700.
- [14] Muro A., Ramajo V., Lopez J., Simon F., Hillyer G.V., *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid-binding proteins., *Vet. Parasitol.*, 1997, May; 69 (3-4), pp. 219-229.
- [15] Espino A.M., Gomez T., Dumenigo B., Bell Badel I., Separation of *Fasciola hepatica* antigens by gel chromatography., *Rev. Cubana Med. Trop.*, 1986, May-Aug; 38 (2), pp. 151-158.
- [16] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye-binding., *Anal. Biochem.*, 72 (1976), pp. 248-254.
- [17] Dubois M., Giles A.K., Hamilton P.A et Smith F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances., *Analyt chem.*, 28 (1956), pp. 350-356.
- [18] Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄., *Nature*, Vol. 227 (1970), pp. 680-685.
- [19] Ouchterlony O., Diffusion in gel methods for immunological analysis., *progr. Allergy*, 5 (1958) pp. 1-78.
- [20] Cecchini G. et Kasali O.B., Comparaison of different *Fasciola hepatica* antigens and their use to detect infection in sheep by an enzyme immunoassay., *j. Vet. Med.*, B.36 (1989), pp. 468-472.
- [21] Cervi L.A., Rubinstein H. et Masih D.T., Serological, electrophoretic and biological properties of *Fasciola hepatica* antigens., *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, 34 (1992), pp. 517-525.
- [22] Carmona C., McGonigles S., Dowd A. J., Smith A. M., Goughlan S., McGowrane E. et Dalton J. P., A dipeptidylpeptidase secreted

by *Fasciola hepatica*., parasitology, 109 (1993), pp. 113-118.

[23] Shaker Z.A., Demardash Z.A., Mansour W.A., Hasanein H.I., El-ohandes M. et El-Gindy H.I., Purification and characterization of a specific *Fasciola* antigen., J. Egypte. Soc. Parasitol., 24.2 (1994), pp. 309-316.

[24] Rockni M.B., Massoud J., Hanilo A., Comparison of adult somatic and cysteine proteinase antigens of *Fasciola gigantica* in enzyme linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human fasciolosis. Acta Trop. 2003 Sep; 88(1), pp : 69-75.

[25] Allam A. F., El-Agami el-S.I., Hehny M.H., Molecular and immunological characterisation of *Fasciola* species., Br. J. Biomed Sci. 2002; 59 (4): 191-195.

[26] Almaza C., Avila G., Quiroz H., Effect of parasite burden on the detection of *Fasciola hepatica* antigens in sera and feces of experimentally infected sheep., Vet Parasitol. 2001 May 22;97(2):101-12.

[27] Ruiz-Navarrette M.A., Arriaga C., Bautista C.R. et Morilla A., *Fasciola hepatica*: characterization of somatic and excretory-

secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep., Rev. Lat. Amer. Microbiol., 35 (1993), pp. 301-307.

[28] Santiago N., Hillyer G.V., Garcia-Rosa M., et Morales M.H., Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infection in rabbits., Am. J. Trop. Med. Hyg., 35 (1986), pp. 135-140.

[29] Qureshi T., Wagner G. G., Lynn D. D., Davies D. S. et Graig T. M., Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*., Vet. Parasitology., 58 (1995), pp. 357-363.

[30] Santiago N. et Hillyer G.V., Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*., j. parasitol., 74 (1988), pp. 810-811.

[1] Dutton J. P., A dipentylphosphase secreted by Fasciola hepatica... [2] ... [3] ... [4] ... [5] ... [6] ... [7] ... [8] ... [9] ... [10] ... [11] ... [12] ... [13] ... [14] ... [15] ... [16] ... [17] ... [18] ... [19] ... [20] ... [21] ... [22] ... [23] ... [24] ... [25] ... [26] ... [27] ... [28] ... [29] ... [30] ... [31] ... [32] ... [33] ... [34] ... [35] ... [36] ... [37] ... [38] ... [39] ... [40] ... [41] ... [42] ... [43] ... [44] ... [45] ... [46] ... [47] ... [48] ... [49] ... [50] ... [51] ... [52] ... [53] ... [54] ... [55] ... [56] ... [57] ... [58] ... [59] ... [60] ... [61] ... [62] ... [63] ... [64] ... [65] ... [66] ... [67] ... [68] ... [69] ... [70] ... [71] ... [72] ... [73] ... [74] ... [75] ... [76] ... [77] ... [78] ... [79] ... [80] ... [81] ... [82] ... [83] ... [84] ... [85] ... [86] ... [87] ... [88] ... [89] ... [90] ... [91] ... [92] ... [93] ... [94] ... [95] ... [96] ... [97] ... [98] ... [99] ... [100] ...