

50 376
1977
51

N° d'ordre: 660

50376
1977
51

THESE
présentée à
L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES
de **LILLE I**
pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE SPÉCIALITÉ
BIOLOGIE CELLULAIRE
par **Eric JACQUELINE**

FACTEURS IMMUNITAIRES INHIBITEURS
DE LA PONTE DE TRICHINELLA SPIRALIS
MISE EN ÉVIDENCE ET ÉTUDE
IN VIVO ET IN VITRO



Jury:	M.M. Durchon	Président
	M.A. Vernes	Rapporteur
	M.J. Guillaume	
	M.J. Biguet	Membres
	M.H. Bazin	

Présentée en octobre 1977

CE TRAVAIL A ETE EFFECTUE DANS LES LABORATOIRES DE PARASITOLOGIE
DES UER DE PHARMACIE ET DE MEDECINE DE L'UNIVERSITE DE LILLE II
ET A L'UNITE INSERM U 42 FLERS.

ERRATUM

Page 20 : pour le paragraphe 2-2-1- lire :

2-2-1- 125 femelles ont été récoltées chez les souris témoins contre 93 chez les souris immunisées par l'antigène " métabolique " et 33 chez les souris immunisées par l'antigène " total ". L'antigène " total " induit donc une inhibition plus importante que l'antigène "métabolique" vis à vis du développement des larves en adultes.

SOMMAIRE

	pages
- Introduction	1
1- La biologie du parasite	2
2- L'immunologie de la trichinose	3
- Matériels et méthodes	7
1- Souche de <i>T. spiralis</i>	8
2- Animaux	8
2-1- Souris	8
2-2- Rats	8
2-3- Miniporcs	8
3- Antigènes de <i>T. spiralis</i>	8
3-1- Antigène "métabolique"	8
3-2- Antigène "total" somatique	9
4- Infestation et immunisation des animaux	9
4-1- Infestation	9
4-2- Immunisation	9
5- Récolte des sérums immuns et des immunoglobulines	9
6- Immunodépression des souris	10
7- Séparation des classes d'immunoglobulines par des méthodes chromatographiques	10
7-1- Séparation des Ig M et des Ig G	10
7-2- Isolement des Ig A sériques ou sécrétoires (de souris et de rats)	11
7-3- Contrôle des immunoglobulines	11
8- Mise en culture des trichines adultes et comptage des larves L1 pondues	12
9- Calculs statistiques	13
- Résultats	14
1- Mise en évidence des facteurs immunitaires de la ponte . Expérience <i>princeps</i> , <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> ..	15
2- Comparaison de l'efficacité vis à vis de la ponte des immunisations de souris par l'antigène "métabolique" et par l'antigène "total". Expérience <i>in vivo-in vitro</i>	20

	pages
2-1- Protocole expérimental	20
2-2- Résultats	20
3- Action des immuno-dépresseurs sur la ponte	22
3-1- Expériences <i>in vivo-in vitro</i>	22
3-1-1- Protocoles expérimentaux	22
3-1-2- Résultats	22
3-2- Expérience <i>in vitro</i>	25
3-2-1- Protocole expérimental	25
3-2-2- Résultats	25
4- Action <i>in vitro</i> de différents immunosérums anti- <i>T. spiralis</i> sur la ponte des femelles.....	28
4-1- Immunosérums de souris	28
4-2- Immunosérums de miniporcs	28
4-3- Cinétique d'action d'immunosérums de rats récoltés entre le 6 ème et le 13 ème jour après l'infestation.....	31
5- Action <i>in vitro</i> des immunoglobulines totales (anti-trichine) de rat et de miniporc	31
6- Actions comparées (sur la ponte <i>in vitro</i> des trichines) des Ig A, Ig M et Ig G sériques de miniporcs et de rats infestés	34
6-1- Immunoglobulines de miniporc	34
6-2- Immunoglobulines de rat	34
7- Action des sécrétions intestinales (totales et fractionnées) de souris et de rats, infestés ou immunisés	37
- Commentaires	40
- Bibliographie	46

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. LA BIOLOGIE DU PARASITE.

La trichinose est une helminthiase cosmopolite, provoquée par *Trichinella spiralis*, nématode qui peut parasiter pratiquement tous les mammifères. C'est en ingérant de la viande dite "trichinée" contenant des larves encapsulées dans les espaces interfasciculaires, qu'un individu se parasite ; il devient d'abord hôte définitif après le développement des larves en adultes dans son intestin grêle puis devient ensuite hôte intermédiaire quand les larves pondues par les femelles fécondées sont disséminées dans tout l'organisme et se fixent dans les muscles squelettiques où elles deviennent infestantes.

La trichinose apparaît sous forme d'épidémies parfois graves en Europe centrale et orientale, dans les pays de l'Arctic et, à un degré moindre, aux U.S.A. ; c'est très habituellement la viande de porc qui est à l'origine des épidémies.

Le cycle se déroule de la façon suivante :

30 heures après le repas infestant, les larves sont devenues adultes (GARDINER, 1976) après avoir effectué 4 mues (HARLEY, 1971) au niveau du duodénum et de jéjunum. Les adultes blanchâtres ont une taille assez variable ; en moyenne 3 mm de long sur 0,06 mm de diamètre pour les femelles et 2 mm sur 0,04 mm pour les mâles. Selon GARDINER l'accouplement et la ponte pourraient alors s'effectuer dans l'épithélium du grêle et non pas dans sa lumière comme cela était classiquement admis ; les larves L1 (100 μ x 6 μ) traversent ensuite la muqueuse intestinale et pénètrent dans des veinules mésentériques ou des lacunes lymphatiques. Le flot circulatoire les amène au coeur droit puis, par la petite circulation, au coeur gauche d'où elles sont disséminées

dans tout l'organisme ; les larves ayant atteint les muscles striés survivent des mois et même des années dans leur capsule (réaction fibreuse de l'hôte) ; elles mesurent alors jusqu'à 1 mm de long mais sont "spiralées" dans leur pseudo-kyste (400 x 250 μ). La chronologie du déroulement du cycle est schématisée sur la figure 1 (page 4).

La brièveté du cycle de *T. spiralis* fait de ce nématode un modèle expérimental remarquable, mais très complexe sur le plan immunologique. En effets les différents stades intestinaux, vasculaires puis musculaires qui se succèdent, représentent autant de stimuli antigéniques. Les réactions immunitaires qui leur correspondent sont *pro parte* spécifiques, se chevauchent et interviennent même, pour certaines d'entre elles, *a posteriori* dans le cas d'une primoinfestation.

C'est en effet une course par étapes que livre le parasite à son hôte ; les quatre principales étapes étant les suivantes :

- 1) le pourcentage de larves infestantes capables de se transformer en adultes.
- 2) la durée de présence des femelles fécondées dans l'intestin grêle.
- 3) le nombre de larves L1 pondues par ces femelles.
- 4) le nombre de larves capables de franchir la muqueuse intestinale et d'aller se fixer dans les muscles.

2. L'IMMUNOLOGIE DE LA TRICHINOSE.

Il est maintenant démontré par les auteurs que les réactions immunitaires consécutives à la trichinose sont cellulaires et humorales (LARSH, 1967). De l'acuité des réactions de type cellulaire dépend le pourcentage de larves devenant adultes (LARSH 1972) et la

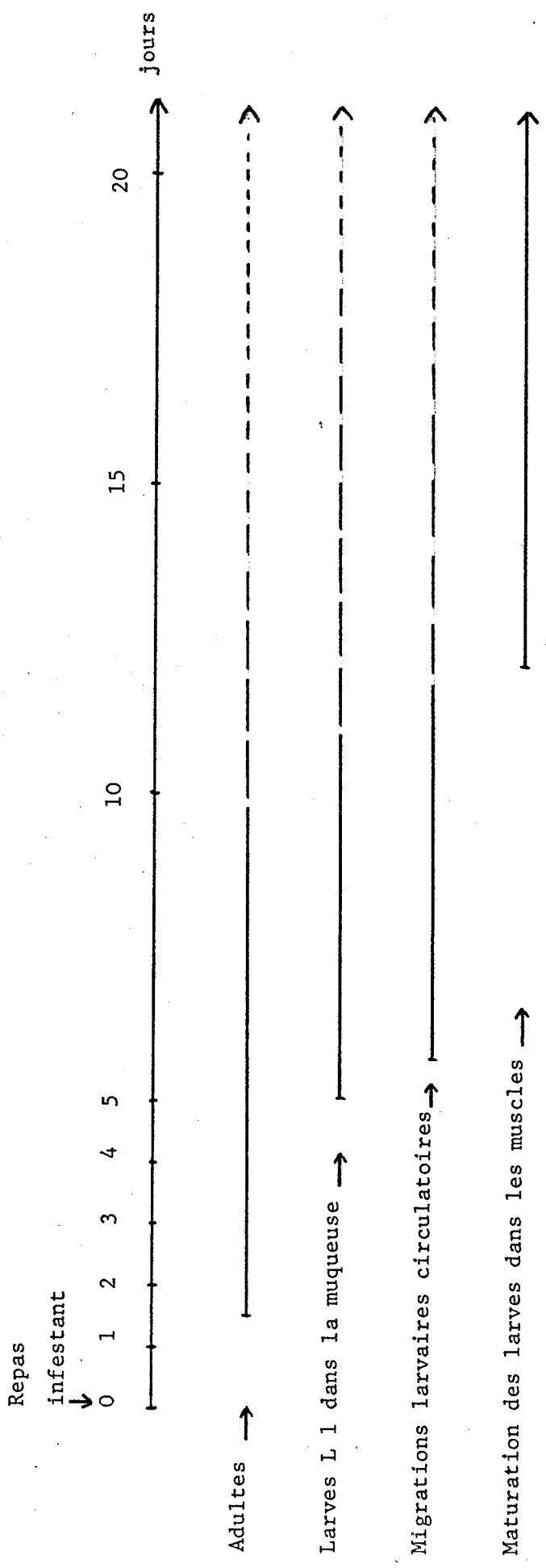


Figure 1

Chronologie du cycle de *Trichinella spiralis*



longévité des adultes dans l'intestin grêle (jusqu'à la "self cure") (LARSH, 1964 et 1975). Le fait est démontré indirectement sur des souris congénitalement athymiques chez lesquelles la "self cure" s'effectue nettement plus tard que chez les souris normales témoins (RUITENBERG, 1974)(WALLS, 1973). Des substances anti-inflammatoires telles que la cortisone prolongent également la longévité des adultes (COKER, 1955)(CAMPBELL, 1968) et le même résultat peut-être obtenu chez des souris rendues immunotolérantes par inondation antigénique (LANCASTRE, 1971). Toujours dans le même sens notre antigène "métabolique" (issu du liquide de mues de larves musculaires) induit, en l'absence d'anticorps décelables, une augmentation de l'HSR (hypersensibilité de type retardée) conférant aux souris et aux miniporcs ainsi immunisés une protection, appréciée en nombre de larves enkystées, qui peut dépasser 99% (VERNES, 1975 et 1976). Parallèlement au développement de l'HSR, se développent des réactions humorales sériques et locales (Immunoglobulines sécrétées dans l'intestin grêle). En ce qui concerne la cinétique (après primo-infestation) d'apparition des anticorps sériques, l'augmentation des globulines est plus marquée chez la souris que chez le rat (VERNES, 1975). Cette augmentation concerne les principales classes d'immunoglobulines à savoir Ig G1, Ig G2, Ig M et Ig A avec un maximum de 13 à 15 jours après l'infestation chez la souris (sauf pour les Ig M qui continuent à augmenter), y compris pour les anticorps sécrétoires intestinaux qui sont essentiellement des Ig A (CRANDALL, 1972). Il semble de règle que ces anticorps sécrétoires locaux soient synthétisés plus précocement que les anticorps sériques ; par exemple lors d'une infestation par *Nippostrongylus brasiliensis* les Ig A sécrétoires sont décelables dès le 6^{ème} jour d'infestation alors que

les anticorps sériques ne le sont qu'au 18 ème (POULAIN, 1976).
Pour *T. spiralis* tous les stades sont immunogènes sauf les larves L1 qui ne sont d'ailleurs pas sensibles aux réactions immunitaires une fois la barrière intestinale franchie (DESPOMMIER, 1971)(JAMES, 1975) ; l'immunogénicité des larves musculaires semble dépendre du stichocyte et de ses sécrétions particulières (DESPOMMIER, 1968, 1969, 1974 et 1976) ; stichocyte que ne possède pas la larve L1.

C'est à la suite d'un travail préliminaire effectué par DESPOMMIER, avec lequel nous échangeons des informations, que nous avons entrepris d'étudier les facteurs immunitaires inhibiteurs de la ponte. En effet cet auteur a démontré sur un modèle *in vivo-in vitro* que des femelles de trichine issues de souris immunisées par de l'antigène "particulaire" (DESPOMMIER, 1970 a et b) ont leur ponte inhibée de façon significative (DESPOMMIER, 1977). A sa demande nous avons voulu savoir si notre antigène "métabolique" induisait la même inhibition (malgré la différence de souche de trichine et de souche de souris). Nous avons ensuite poursuivi de notre côté l'expérimentation en explorant l'action d'immunodépresseurs *in vivo* et *in vitro* vis à vis de la ponte de femelles issues d'animaux témoins non artificiellement immunisés. Enfin nous avons effectué une première analyse *in vitro* des facteurs immunitaires humoraux et sécrétoires, inhibiteurs de la ponte chez la souris, le rat et le miniporc infestés ou immunisés.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. SOUCHE DE *T. SPIRALIS*.

Obtenu en 1970 chez le professeur LAMY à l'institut Pasteur de Paris et entretenu dans notre laboratoire par passage sur souris "CBA" et sur rat "Wistar".

2. ANIMAUX.

2-1- Souris :

Souris consanguines "CBA" exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (CNRS, 45, Orléans la Source), âgées d'environ 4 mois et pesant 20 à 25 gr.

2-2- Rats :

Rats "Wistar" conventionnels élevés dans notre animalerie (à air filtré et conditionné) et de 3 mois d'âge environ (origine CNRS).

2-3- Miniporcs :

Souche " Pitmann Moore " âgés d'environ 4 mois et d'un poids moyen de 10 Kg (élevage Lessieux, 95710 BRAY LUE).

3. ANTIGENES DE *T. SPIRALIS*.

3-1- Antigène " métabolique " :

Obtenu en faisant survivre pendant 24 heures à 37°C des larves musculaires dans du milieu 199 avec des antibiotiques

(0,2 mg/ml de Streptomycine Specia et 100 U.I./ml de Specilline G Specia) ; après élimination des larves par centrifugation (3000 g 10 minutes), le milieu est dialysé 72 heures contre de l'eau (en écoulement continu) et ensuite lyophilisé (VERNES, 1976).

3-2- Antigène "total" somatique :

Obtenu par broyage de larves musculaires en ClNa 1°/∞∞ puis centrifugation (8000 g, 1 heure), dialyse du surnageant contre de l'eau et lyophilisation.

4. INFESTATION ET IMMUNISATION DES ANIMAUX.

4-1- Infestation :

Les souris, les rats et les miniporcs sont infestés par canulation oesophagienne avec, respectivement, 200, 2000 et 5000 larves infestantes par animal.

4-2- Immunisation :

- Souris : elles reçoivent 1 mg d'antigène par injection intrapéritonéale; l'antigène étant dilué dans 0,1 ml de sérum physiologique et émulsionné dans 0,1 ml de Freund incomplet. Par voie orale l'antigène est simplement dilué dans du NaCl 9°/∞∞.

- Rats : par infestation oesophagienne (2000 larves).

- Miniporcs : soit par infestation oesophagienne (5000 larves) soit par 50 à 150 mg d'antigène métabolique administré *per os*.

5. RECOLTE DES SERUMS IMMUNS ET DES IMMUNOGLOBULINES.

- Les sérums sont récoltés 13 ou 14 jours après l'immu-

nisation (ou l'infestation) chez les souris et les rats (sauf pour l'étude cinétique) ; après 30 jours chez les miniporcs.

- Les sécrétions de l'intestin grêle de souris ou de rats sont récoltées 7 à 11 jours après l'immunisation (ou l'infestation) par lavage de la moitié antérieure du grêle par du NaCl à 9°/∞∞ ; le grêle est ensuite ouvert longitudinalement et mis en survie sur milieu 199 à 37°C pendant 15 heures. Après centrifugation (5000 g 20 minutes), le sérum physiologique et le milieu incubé sont mélangés et concentrés sur membrane Amicon UM 10 jusqu'à obtention de 5 ml pour un grêle de rat ou pour 3 grêles de souris.

- Les immunoglobulines sériques sont récoltées par 3 précipitations et centrifugations successives au sulfate d'ammonium à 45% de saturation et lavage au NaCl 9°/∞∞.

6. IMMUNODEPRESSION DES SOURIS.

Elle est effectuée par injection intrapéritonéale de méthotrexate (MTX) injectable (Laboratoire Specia) qui est un antimétabolite (de 2 à 4 mg par souris) auquel nous ajoutons de l'acétate de cortisone (Laboratoire Roussel) qui est un anti-inflammatoire (2 à 2,5 mg par souris).

7. SEPARATION DES CLASSES D'IMMUNOGLOBULINES PAR DES METHODES CHROMATOGRAPHIQUES.

7-1- Séparation des Ig M et des Ig G :

Elle est obtenue par chromatographie ascendante sur gel de Séphadex G 200 en tampon TRIS (0,1 M et NaCl 0,2 M) à

pH 8 dans une colonne de 1 m de haut et 5 cm de diamètre. Les dépôts sont de 3 à 5 ml et les fractions obtenues sont ramenées, par concentration sur membrane Amicon UM 10, au volume initial.

7-2- Isolement des Ig A sériques ou sécrétoires (de souris ou de rats) :

Elles sont obtenues par chromatographie d'affinité sur colonne de gel de Sépharose activé au CNBr (Pharmacia) sur lequel sont fixés 20 mg d'immunoglobulines anti Ig A de souris ou de rat par gramme de gel. Le temps de contact du sérum et du gel est de 1h30 ; l'élution est faite au tampon glycine HCl 0,2 M et NaCl 0,5 M pH 2,8. L'éluat est enfin dialysé contre du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 (24 h) et ensuite contre du NaCl 9‰ (24h). L'éluat est ramené au volume initial par concentration sur membrane Amicon UM 10. 3 ml de sérum (ou de sécrétions) sont déposés sur une colonne de 20 ml de gel. Le lavage de la colonne est effectué par du NaCl 0,5 M à un débit de 2 ml/heure. La concentration en Ig A est appréciée par la mesure de la densité optique à 280 nm.

7-3- Contrôle des immunoglobulines :

- Les poids moléculaires des globulines séparées sur G 200 sont contrôlés en localisant les pics obtenus par rapport à ceux déterminés par des protéines calibrées ("Combithek", Boehringer). Chez le rat les fractions Ig M et Ig G sont contrôlées par immunoélectrophorèse avec des anti Ig M (BAZIN, 1974) et des anti Ig G spécifiques (Laboratoire Cappel).

- Enfin les Ig A sériques ou sécrétoires sont mises en évidence et dosées selon la méthode d'immunodiffusion radiale de MANCINI (Laboratoire Meloy) chez la souris.

8. MISE EN CULTURE DES TRICHINES ADULTES ET COMPTAGE DES LARVES

L1 PONDUES.

Les trichines adultes sont récoltées chez le rat (2 ou 3 rats par manipulation) 5 jours après leur infestation grâce à une technique dérivée de la méthode coprologique de Baerman : l'intestin grêle est prélevé et ouvert longitudinalement, la décantation (une heure avec agitation périodique) des trichines se fait à 37°C dans du milieu 199 à travers un tamis, dans un entonnoir à robinet. Un pool de trichines adultes est ainsi constitué et les femelles peuvent être séparées des mâles à la loupe binoculaire. La mise en culture s'effectue sur milieu 199 avec ou sans sérum de veau (30%) dans des boîtes pour culture de cellules (Nuclon Delta 35 ml) contenant 10 ml de milieu. Le fond des boîtes est gravé au préalable selon des traits longitudinaux et parallèles espacés de 2 mm, permettant de compter les larves pondues au microscope inversé sans interrompre les cultures. Les femelles de trichine sont ainsi mises en culture à raison de 30 à 50 par boîte, chaque moyenne de ponte par femelle étant effectuée sur 2 ou 3 boîtes (selon le volume des récoltes). La culture dure 24 heures dans une étuve à 37°C dont l'atmosphère est continuellement renouvelée et saturée en humidité. Nos premières cultures furent effectuées dans une atmosphère contenant 10% de CO₂ mais celui-ci s'avéra inutile dans la mesure où la durée des cultures n'est que de 24 heures.

Pour l'expérience *princeps* nous avons mis 38% de sérum de veau (inactivé) dans le milieu 199. Ensuite nous nous sommes aperçus que les femelles pondent pratiquement autant de larves sans sérum de veau et nous ne l'avons donc plus utilisé ; d'autant plus que

sa présence aurait gêné l'interprétation des expériences menées avec des sérums de souris, de rats ou de miniporcs.

9. CALCULS STATISTIQUES.

Pour comparer les moyennes de ponte des trichines femelles témoins et des trichines en expérience nous avons effectué le "t" test de Student-Fischer appliqué à la comparaison de deux moyennes. Nous avons ainsi associé, un coefficient de variation à chaque moyenne de ponte, et la valeur de la probabilité p à chaque comparaison de moyenne. Dans ces conditions il est généralement admis qu'une différence peut être considérée significative si la probabilité est au moins de 95%, c'est à dire si p est inférieur ou égal à 0,05.

RESULTATS

RESULTATS

Pour toutes les expériences nous avons appelé J 0 (zéro) le jour de l'infestation des animaux, J (-x) (moins x) le jour d'une manipulation effectuée x jours avant l'infestation et J y y jours après l'infestation.

1. MISE EN EVIDENCE DES FACTEURS IMMUNITAIRES INHIBITEURS DE LA PONTE. EXPERIENCE PRINCEPS IN VIVO-IN VITRO.

1-1- Protocole expérimental :

Sept jours avant leur infestation par 200 larves, 50 souris reçoivent 1 mg d'antigène "métabolique" (dans 0,1 ml de NaCl 9°/∞ et dans 0,1 ml d'adjuvant de Freund incomplet) en injection intrapéritonéale. Cinquante souris témoins ne reçoivent à J (-7) qu'une injection de NaCl 9°/∞ et de Freund incomplet; elles sont également infestées par 200 larves chacune. De J 5 à J 9, chaque jour, 10 souris témoins et 10 souris immunisées sont sacrifiées ; pour chaque souris les femelles de *T. spiralis* sont récoltées, comptées et mises en culture. Les larves pondues sont comptées après 24 heures et 48 heures de culture .

1-2- Résultats :

Les résultats chiffrés sont donnés dans les tableaux I et II pages 17 et 18; ils sont reproduits sur la figure 2 page 19 . Quatre résultats peuvent en être extraits :

1-2-1- Globalement le pourcentage de trichines adultes femelles récoltées chez les souris immunes par rapport à celles issues des souris témoins est de 65% ; la différence

est statistiquement significative à J 5 et à J 9 (tableau II). Chez les souris immunes le développement des larves infestantes en adultes est donc partiellement inhibé (35% d'adultes viables en moins).

1-2-2- A J 9 l'élimination des adultes est pratiquement terminée chez les souris immunes et non chez les souris témoins (7,5 femelles par souris). Donc les adultes viables sont plus rapidement éliminés chez les souris immunes que chez les souris témoins (tableau I).

1-2-3- Vis à vis du nombre de larves pondues par femelle en 24 heures, on peut noter (figure 2 page 19) que la diminution de la ponte n'apparaît qu'à J 7 chez les femelles issues de souris témoins. On peut donc en conclure que chez les témoins les mécanismes de défenses immunologiques ne deviennent efficaces, vis à vis de la ponte des femelles, qu'au 7^{ème} jour après l'infestation.

Pour les manipulations *in vitro* nous avons donc utilisé des femelles prélevées sur souris ou sur rats 5 jours après leur primoinfestation.

1-2-4- Les pourcentages de réduction de la ponte chez les trichines issues des souris immunes par rapport à celles des témoins sont statistiquement hautement significatifs (tableau II) et vont en croissant régulièrement de 36% à J 5 jusqu'à 88% à J 9. Qualitativement, les réponses immunitaires des souris immunes augmentent dans le temps par rapport aux témoins.

Il faut enfin noter qu'entre 24 et 48 heures de culture (sans changer le milieu) les femelles pondent, en moyenne, environ 2 fois moins que pendant les premières 24 heures ; les mêmes pour-

		Femelles issues de souris témoins primoïnfectées										Femelles issues de souris immunisées									
J 5	Nb de femelles par souris	45	48	41	22	32	33	13	10	27	24	9	8	10	9	32	6	19	16	9	18
	Nb de larves 24 h	3094	3236	2464	1756	2092	1584	1056	644	1784	1372	206	358	362	382	1206	444	956	588	660	680
	Nb de larves 48 h	6250	4220	3416	1904	2158	2616	1224	1692	3268	3004	376	522	346	404	1404	872	1876	924	872	1204
J 6	Nb de femelles par souris	43	19	34	31	76	39	54	41	15	28	64	68	45	42	52	1	11	16	5	7
	Nb de larves 24 h	1924	596	2104	1600	3412	2168	4428	3408	1640	2496	1832	1448	784	644	1124	32	488	352	284	384
	Nb de larves 48 h	2180	1144	2968	2144	4812	2716	7804	4040	1840	2776	2636	1760	1632	956	1904	34	736	480	324	420
J 7	Nb de femelles par souris	24	0	9	10	37	16	17	7	21	7	35	1	7	34	22	7	3	1	0	0
	Nb de larves 24 h	672	0	372	448	1316	532	672	652	1964	408	584	8	148	604	164	124	76	48	0	0
	Nb de larves 48 h	836	0	560	640	3132	776	1104	768	2096	500	860	8	232	992	388	188	88	52	0	0
J 8	Nb de femelles par souris	20	0	22	2	13	1	20	0	0	6	0	0	10	8	0	3	18	0	3	16
	Nb de larves 24 h	1020	0	804	52	600	80	368	0	0	264	0	0	92	64	0	20	232	0	24	158
	Nb de larves 48 h	1380	0	1392	156	892	80	388	0	0	436	0	0	172	72	0	20	326	0	26	166
J 9	Nb de femelles par souris	5	1	17	3	8	12	1	5	19	1	1	0	0	0	0	0	0	10	0	0
	Nb de larves 24 h	68	8	336	76	208	152	16	76	184	12	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
	Nb de larves 48 h	80	20	480	76	224	156	24	84	264	16	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0

TABLEAU I : Résultats globaux de l'expérience *princeps*.



TABLEAU II :

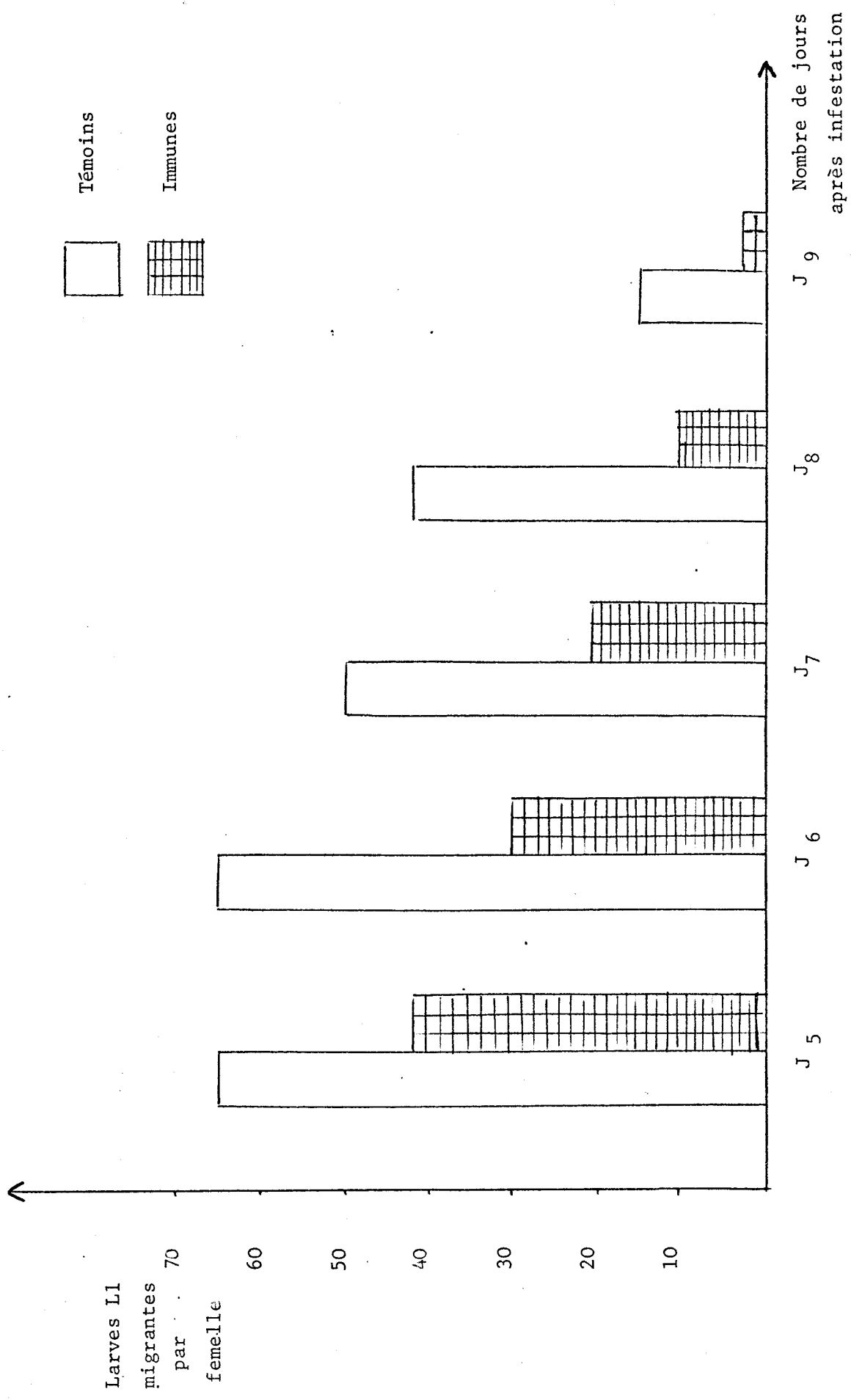
Résultats finaux et statistiques de l'expérience *princeps*

		Nb* moyen de ♀ par souris	Nb de larves par ♀ à 24h	Pourcentage de réduction	Probabilités	
					Nb de ♀	Nb de larves
J5	témoins	29,5	65,8 [±] 6,9	<u>-36 %</u>	p 0,005	p=0,019
	immunes	15,5	42,7 [±] 10,2			
J6	témoins	38	65,5 [±] 16,8	<u>-53 %</u>	NS	p=0,0097
	immunes	31	31,4 [±] 10,7			
J7	témoins	15	51,9 [±] 19,1	<u>-62 %</u>	NS	p=0,0027
	immunes	11	20,2 [±] 10,4			
J8	témoins	8	43,1 [±] 17,8	<u>-79 %</u>	NS	p=0,0023
	immunes	5,5	9,1 [±] 2,1			
J9	témoins	7,5	15,8 [±] 4,3	<u>-88 %</u>	p<0,01	
	immunes	1	2			

Nb* = Nombre



Figure 2



Expérience princeps *in vivo-in vitro*



centages de réduction étant retrouvés. Nous avons donc choisi, pour les expériences suivantes, de compter les larves au bout de 24 heures de culture.

2. COMPARAISON DES EFFETS DE L'IMMUNISATION PAR L'ANTIGÈNE

"METABOLIQUE" ET PAR L'ANTIGÈNE "TOTAL". EXPERIENCE *IN VIVO-* *IN VITRO.*

2-1- Protocole expérimental :

Deux lots de 3 souris reçoivent, à J 7 une injection intrapéritonéale d'émulsion de Freund incomplet (0,1 ml) et de NaCl 9°/∞ (0,1 ml) contenant 1 mg (par souris) d'antigène "métabolique" pour un lot, ou d'antigène "total" pour l'autre lot. Trois autres souris (témoins) ne reçoivent que le Freund et le NaCl 9°/∞. A.J 0 les 9 souris sont infestées par 200 larves chacune et à J 7 les trichines adultes femelles sont dénombrées (par lot de 3 souris) et mises en culture 24 heures sur milieu 199. Les larves pondues sont alors comptées.

2-2- Résultats : tableau III page 21.

2-2-1- 125 femelles ont été récoltées chez les souris témoins contre 93 chez les souris immunisées par l'antigène "total". L'antigène "total" induit donc une inhibition plus importante que l'antigène "métabolique" vis à vis du développement des larves en adultes.

2-2-2- L'immunisation par l'antigène "total" provoque une inhibition de ponte (-74%) statistiquement significative ($p=0,002$) vis à vis des témoins. Cette inhibition de ponte est nettement supérieure à celle obtenue chez les *T. spiralis*

TABLEAU III :

Comparaison de l'efficacité des immunisations de souris par l'Ag "métabolique" et l'Ag "total".

	Nb moyen de larves par ♀	Réduction en %	Probabilités
Témoins	45,8 \pm 4,3		
Immunes par Ag métabolique	27,9 \pm 0,8	<u>- 39 %</u>	p=0,008
Immunes par Ag total	11,5 \pm 0,6	<u>- 74 %</u>	p=0,002



femelles issues des souris immunisées par l'antigène "métabolique" (-39%), la différence de ponte entre ces deux lots de femelles étant statistiquement très significative : $p=0,0002$.

3. ACTION DES IMMUNO-DEPRESSEURS SUR LA PONTE

3-1- Expériences *in vivo-in vitro*.

3-1-1- Protocoles expérimentaux :

Deux expériences parallèles ont été réalisées :

- 10 souris reçoivent 3 mg de méthotrexate et 2,5 mg d'acétate de cortisone en injection intrapéritonéale à J(-1).
- 10 autres souris reçoivent 2 mg de méthotrexate et 2 mg d'acétate de cortisone à J 0.

Ces 20 souris et 20 souris témoins sont infestées par 200 larves chacune à J 0.

De J 5 à J 9, 2 souris témoins et 2 souris traitées, par série, sont sacrifiées chaque jour ; les trichines femelles de chaque souris sont comptées et mises en culture ; les larves pondues sont comptées après 24 heures de culture.

3-1-2- Résultats

Trois résultats peuvent être extraits des tableaux IV et V pages 23 et 24, correspondants aux deux expériences précédentes :

3-1-2-1- L'action conjuguée du méthotrexate et de l'acétate de cortisone favorise l'installation du parasite : nettement plus de vers adultes sont récoltés chez les animaux traités (par rapport aux témoins), surtout entre J 6 et J 8. Quand

TABLEAU IV :

Cinétique d'action des immuno-dépresseurs injectés à J-1.

		Nb moyen de ♀ par souris	Nb de larves par ♀ à 24h	Différence en pourcentage	Probabilités
J5	témoins	55	65,3 ± 10,6	- 12,4 %	p=0,019 p=0,019
	traitées	34,5	57,2 ± 7,4		
J6	témoins	38	77,4 ± 5,6	- 7,8 %	p=0,022
	traitées	31	71,4 ± 2,1		
J7	témoins	25	68,9 ± 20,2	- 2,5 %	p=0,47
	traitées	30	67,2 ± 1,2		
J8	témoins	12,5	43,4 ± 10	+ 77,8 %	p=0,019
	traitées	28,5	77,2 ± 9,9		
J9	témoins	11	18,2		
	traitées	0			



TABLEAU V :

Cinétique d'action des immuno-dépresseurs injectés à J 0.

		Nb moyen de ♀ par souris †	Nb de larves par ♀ à 24h	Différence en pourcentage	Probabilités sur Nb de larves
J5	témoins	10	73,4 ± 12,1	-19,7%	p=0,10
	traitées	35	58,9 ± 16,8		
J6	témoins	12,5	101,9 ± 28,2	-18,1%	p=0,26
	traitées	34,5	83,3 ± 20,6		
J7	témoins	11,5	100,3 ± 26	-12,7%	p=0,27
	traitées	24,5	87,6 ± 18,7		
J8	témoins	3	42,7 ± 2,3	<u>+79,1%</u>	p=0,05
	traitées	31,5	76,5 ± 8,4		
J9	témoins	15	21,3	+40,8%	*
	traitées	19,5	30.		

Nb globaux de ♀ : souris témoins : 104 p < 0,01 (significatif)
 souris traitées : 290

* Self cure chez 1 des 2 souris témoins
 * Self cure chez 1 des 2 souris traitées.



le traitement a été pratiqué à J 0 (tableau V), 290 femelles ont été récoltées globalement chez les souris traitées contre seulement 104 chez les témoins ; cette différence étant statistiquement significative ($p = 0,01$).

3-1-2-2- Les vers femelles issus des souris traitées ont leurs pontes légèrement déprimées selon des pourcentages décroissants de J 5 à J 7 ; les valeurs négatives les plus fortes (-19,7%) étant logiquement enregistrées quand les produits sont injectés le jour de l'infestation. Cette expérience n'ayant pas été , au départ, conçue pour être analysée par un calcul statistique (insuffisance de points par résultat), un seul de ces pourcentages négatifs s'est avéré significatif (tableau IV à J 6).

3-1-2-3- Les femelles issues des souris traitées pondent notablement plus que celles issues des témoins à partir de J 8 (jusqu'à + 79,1%), de façon statistiquement significative.

Nous avons regroupé et traduit en courbes l'ensemble des résultats concernant l'expérience *princeps* et les immunodépressions dans la figure 3 page 27.

3-2- Expérience *in vitro*

3-2-1- Protocole expérimental

Cinq souris sont infestées (à J 0) par 200 larves chacune ; les trichines femelles sont récoltées à J 5, mises en pool et réparties en 3 lots de 3 boîtes à raison de 30 femelles par boîte : 3 boîtes témoins (milieu 199), 3 boîtes contenant 3,3 ug. (par ml de milieu) de méthotrexate et 3boîtes en contenant 10 ug par ml.

3-2-2- Résultats : tableau VI page 26.

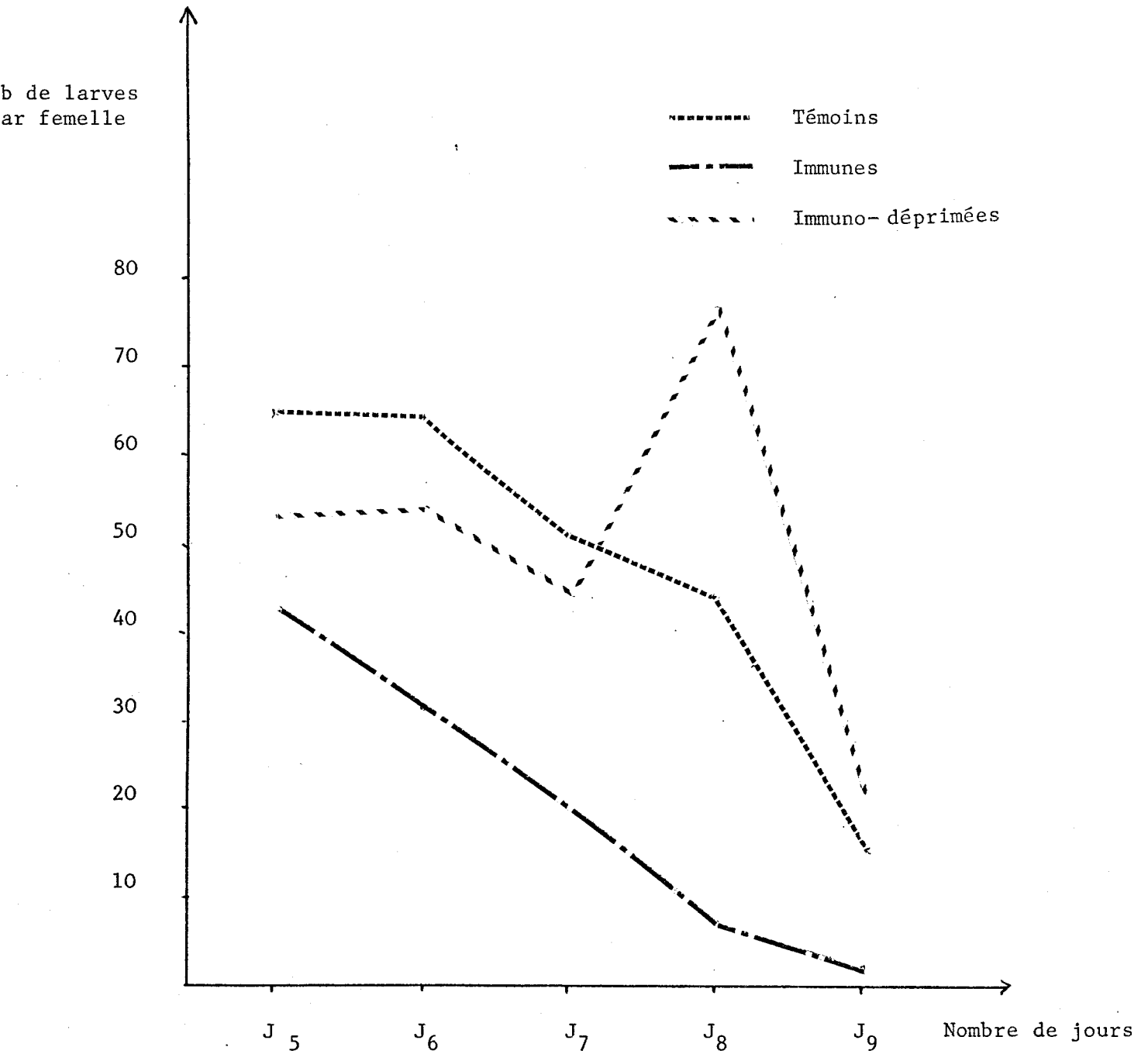
Nous avons constaté une légère action toxique de l'anti-mitotique au niveau de la ponte des femelles de *T. spiralis*; cette action n'est

TABLEAU VI :

Action du Methotrexate *in vitro*

	Nb de larves par femelle	% de réduction	Probabilités
Témoins	66,5 \pm 4,4		
MTX 3,3 μ g/ml (3x30 ♀)	62,4 \pm 8,7	- 6,1%	p=0,26
MTX 10 μ g/ml (3x30 ♀)	61,9 \pm 2,3	- 6,9%	p=0,20

Figure 3



Comparaison des cinétiques de pontes de femelles issues de souris témoins, immunes et immuno-déprimées.



pas statistiquement significative et n'est pas proportionnelle aux deux doses que nous avons employées .

4. ACTION IN VITRO DE DIFFERENTS IMMUNSERUMS ANTI-T.SPIRALIS SUR

LA PONTE DES FEMELLES *

4-1- Immunsérums de souris : tableau VII page 29

Nous avons testé d'une part des sérums anti-antigène "métabolique" et d'autre part un sérum anti-antigène "total" ; ces sérums ont été récoltés sur des souris immunisées *per os* ou par voie intrapéritonéale. Quelle que soit la voie d'administration de l'antigène "métabolique" les immunsérums correspondants ne déterminent pas de réduction de ponte statistiquement significative. Par contre l'antigène somatique est à l'origine d'un immunsérum actif vis à vis de la ponte (-16,4% de réduction) de façon largement significative ($p=0,0003$).

4-2- Immunsérums de miniporcs : tableau VIII page 30

L'antigène "métabolique"(administré *per os*) ne donne pas d'immunsérum actif vis à vis de la ponte. Chez un miniporc vacciné par ce même antigène puis infesté un mois plus tard, l'immunsérum récolté un mois après l'infestation s'est avéré plus efficace vis à vis de la ponte (réduction de 10,9%) ; mais l'écart type assez élevé ($\pm 5,6$) de la moyenne de ponte des femelles témoins fait que ce résultat n'est pas statistiquement significatif ($p=0,13$). Par contre un immunsérum de miniporc infesté depuis un mois provoque des réductions de ponte très significatives : - 20,5% quand il est dilué à 10% dans le milieu 199 et - 21,3% quand il est à 20% dans le milieu.

* Pour ces expériences et pour toutes celles qui suivent nous avons utilisé des femelles de *T. spiralis* prélevées à J5 sur des rats primo-infestés.

TABLEAU VII :

Action de différents immunsérums de souris sur la ponte de femelles de trichines prélevées sur souris. (I.P. = intrapéritonéale).

Immunsérums utilisés	Nombre moyen de larves pondues par femelle en 24 h de "culture"			Réduction de la ponte en % par rapport aux témoins	Probabilités
	sur 199 après incubation des femelles (2h) dans l'immunsérum	sur 199 contenant 10% d'immunsérum	sur 199 (témoins)		
Anti-Antigène métabolique (immunisation per os)		68,6 \pm 2,5	70,7 \pm 2,9	- 3,1 %	p= 0,24
Anti Antigène métabolique (immunisation I.P.)	77,3 \pm 18			- 1%	p= 0,47
Anti-Antigène somatique (immunisation I.P.)	65,3 \pm 0,1		78,1 \pm 0,40	<u>- 16,4 %</u>	p= 0,0003

TABLEAU VIII :

Action de différents immunsérums de miniporcs sur la ponte de femelles de trichines prélevées sur rat.

Immunsérums de porcs ↓	Nombre moyen de larves pondues par femelle en 24 h de "culture"		Réduction de la ponte en % par rapport aux témoins	Probabilités
	sur 199 contenant du sérum immun	sur 199 (témoins)		
Vacciné <i>per os</i> (Antigène métabolique)	70 ± 7,7 *	72,6 ± 1,1 *	- 3,7%	p=0,16
Vacciné <i>per os</i> puis infesté 1 mois plus tard	48,5 ± 5,6 *	54,4 ± 1,1 *	- 10,9%	p=0,13
Infesté depuis 1 mois	55,8 ± 0,3 *	70,2 ± 2,7 *	- 20,5%	p=0,0071
Infesté depuis 1 mois	60,5 ± 2,0 *	76,8 ± 0,8 *	- 21,3%	p=0,0030

* 199 avec 10% de sérum immun ou témoin

* 199 avec 20% de sérum immun ou témoin



4-3- Cinétique d'action d'immunsérums de rats récol-
tés entre le 6ème et le 13ème jour après l'in-
festation : tableau IX page 32

Cette expérience nous a permis de montrer que c'est 8 jours après l'infestation que les immunsérums sont les plus actifs mais qu'ils le sont dès le 6ème jour ; chaque sérum utilisé étant constitué d'un pool de 3 sérums. Quelques écarts types trop élevés font que seul le sérum récolté à J 8 (et pratiquement aussi à J 11) provoque une réaction de ponte statistiquement significative.

5. ACTION *IN VITRO* DES IMMUNOGLOBULINES TOTALES (ANTI-TRICHINE)

DE RAT ET DE MINIPORC : tableau X page 33.

Nous avons préparé les immunoglobulines, par précipitation au sulfate d'ammonium, à partir d'immunsérums de rats et de miniporcs infestés respectivement depuis 8 jours et 1 mois.

Ces immunoglobulines provoquent des réductions de ponte qui vont de 20,6% à 32,6%; tous les résultats étant statistiquement très significatifs.

Deux faits sont à noter :

- Les immunoglobulines anti-trichines provoquent des réductions de ponte plus importantes que les immunsérums correspondants, surtout à la concentration de 20% dans le milieu de culture : 29,3% de réduction de ponte pour les immunoglobulines de rat et 32% pour celles de miniporc.
- Aux mêmes concentrations (et notamment à 10%) les immunoglobulines de miniporc sont plus inhibitrices que celles de rat.

TABLEAU IX :

Cinétique d'action, sur la ponte des trichines, des sérums immuns de rat, du 6 ème au 13 ème jour après l'infestation.

Immunsérums à ↓	Nombre moyen de larves pondues par femelle en 24 h de "culture"		Réduction de la ponte en % par rapport aux témoins	Probabilités
	sur 199 contenant 10% de S.I.	sur 199 contenant 10% de S.T.		
J 6	47,2 ± 8,2	55,6 ± 6,8	- 15,1 %	p=0,17
J 7	75,6 ± 8,1	87,2 ± 4,9	- 13,3 %	p=0,10
J 8	64,5 ± 5,3	84,0 ± 6,0	- <u>23,2 %</u>	p=0,03
J 9	87,3 ± 3,8	92,7 ± 8,9	- 5,8 %	p=0,27
J 11	85,8 ± 3,8	91,5 ± 0,9	- 6,2 %	p=0,06
J 12	74,5 ± 2,5	78,4 ± 3,0	- 4,9 %	p=0,15
J 13	76,9 ± 3,3	83,7 ± 9,6	- 8,1 %	p=0,17

S.I. = Sérum immun

S.T. = Sérum témoin



TABLEAU X :

Actions globales des Immunoglobulines de rat et de miniporc
sur des femelles de trichines prélevées sur des rats.

Ig utilisées	Concen- trations dans le 199 *	Nombre moyen de larves par femelle en 24 h de culture		Réduction de la ponte en% par rapport aux témoins	Probabilités
		sur 199 contenant des Ig	sur 199 (témoins)		
Ig de Rat	10%	48,1 ± 3,3	60,6 ± 3,6	-20,6%	p=0,0066
	20%	42,8 ± 6,3		-29,3%	p=0,0073
Ig de Miniporc	10%	58 ± 4,7	86,2 ± 8,3 *	-32,6%	p=0,025
	20%	54,8 ± 5,3	80,4 ± 4,0 *	-32,0%	p=0,014

* Les Ig sont ramenées au préalable à la même concentration que dans le sérum

* Dans milieu 199 avec des Ig témoins aux mêmes concentrations que les Ig immunes.



6. ACTIONS COMPAREES (SUR LA PONTE *IN VITRO* DES TRICHINES) DES
IG A, IG M ET IG G SERIQUES DE MINIPORC ET DE RATS INFESTES :
 tableau XI page 35.

6-1- Immunoglobulines de miniporc.

Faute d'immunoglobulines anti Ig A spécifiques du porc nous ne pouvions pas séparer les Ig A en chromatographie d'affinité. Nous avons donc simplement fractionné les immunoglobulines sériques sur gel de Séphadex G 200. Nous avons ainsi obtenu 2 pics (figure 4 page 36) : le premier correspond essentiellement aux Ig M mais aussi à une partie des Ig A et des traces d'Ig G (visualisées en immunoélectrophorèse) ; le second correspond surtout aux Ig G mais aussi à des Ig A et à des traces d'Ig M.

La partie supérieure du tableau XI montre que la fraction contenant essentiellement des Ig M est nettement plus active (-22,2%) que celle contenant des Ig G (-12,7%) ; seule cette fraction Ig M donne un pourcentage de réduction de ponte statistiquement significatif ($p=0,050$). Quant au sérum total du même miniporc infesté il s'avère ici encore moins actif (-13%) que ses immunoglobulines séparées.

6-2- Immunoglobulines de rat :

Grâce à des anti-Ig A spécifiques nous avons pu séparer les Ig A sériques en chromatographie d'affinité ; les autres immunoglobulines étant ensuite fractionnées sur Séphadex G 200. Nous obtenons alors un pic Ig M (avec des traces d'Ig G) et deux autres pics (au lieu d'un habituellement) qui se sont avérés, en immunoélectrophorèse, ne correspondre tous les deux qu'à des Ig G ; il s'agit là sans doute d'un artéfact de manipulation qui n'a

TABLEAU XI :

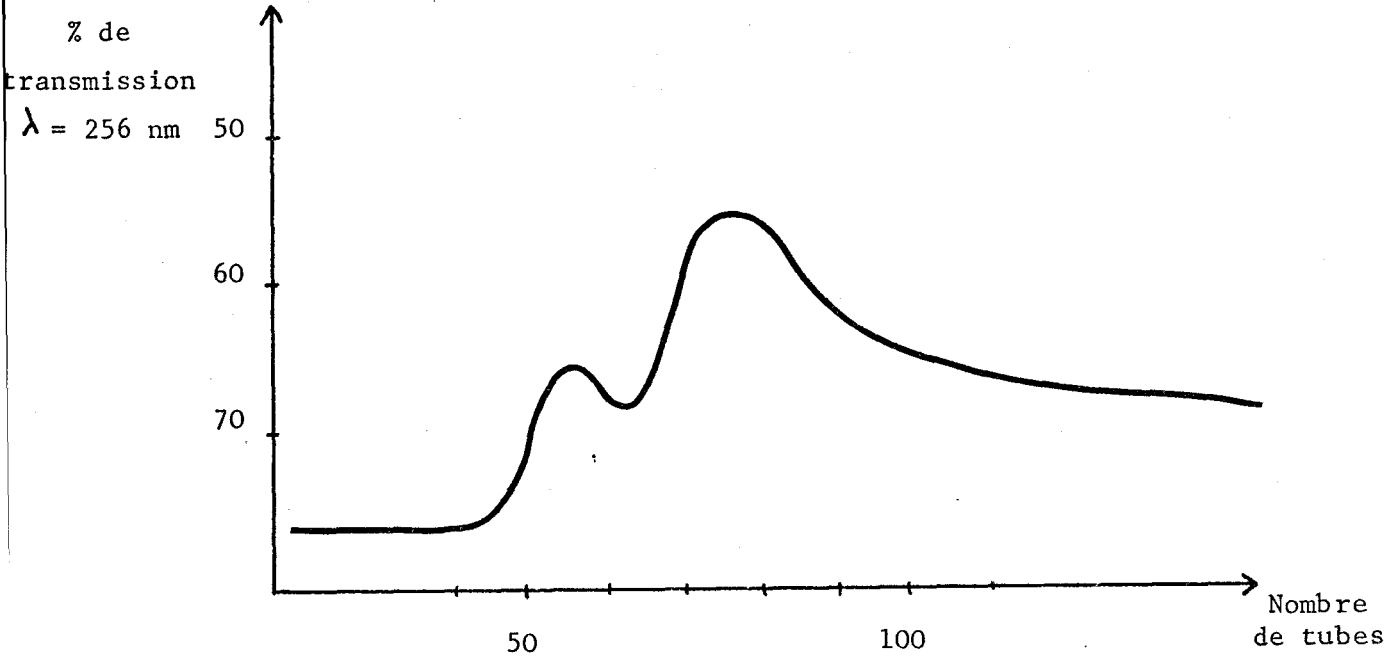
Actions comparées (sur la ponte des trichines) des Ig A, Ig M et Ig G sériques de miniporc et de rats infestés.

Animaux infestés	Fractions utilisées (10% dans 199)	Nombre moyen de larves par femelle en 24 h de culture		Réduction de la ponte en % par rapport aux témoins	Probabilités
		199 contenant des SI* ou des Ig	199 (témoins)		
Miniporc infesté depuis 1 mois	sérum total	72,5 ± 0,5	83,3 ± 7,8	-13 %	p=0,08
	Ig M + Ig A	64,9 ± 5,1		<u>-22,2 %</u>	p=0,050
	Ig G + Ig A	72,8 ± 6,6		-12,7 %	p=0,14
Rats infestés depuis 13 jours	Ig A	61,5 ± 7,5	63,9 ± 8,6	-3,7 %	p=0,13
	Ig M	51,2 ± 2,6		<u>-19,8 %</u>	p=0,035
	Ig G (1er pic sur G200)	55,8 ± 3,0		-12,6 %	p=0,10
	Ig G (2ème pic sur G200)	53,5 ± 1,2		-16,2 %	p=0,085

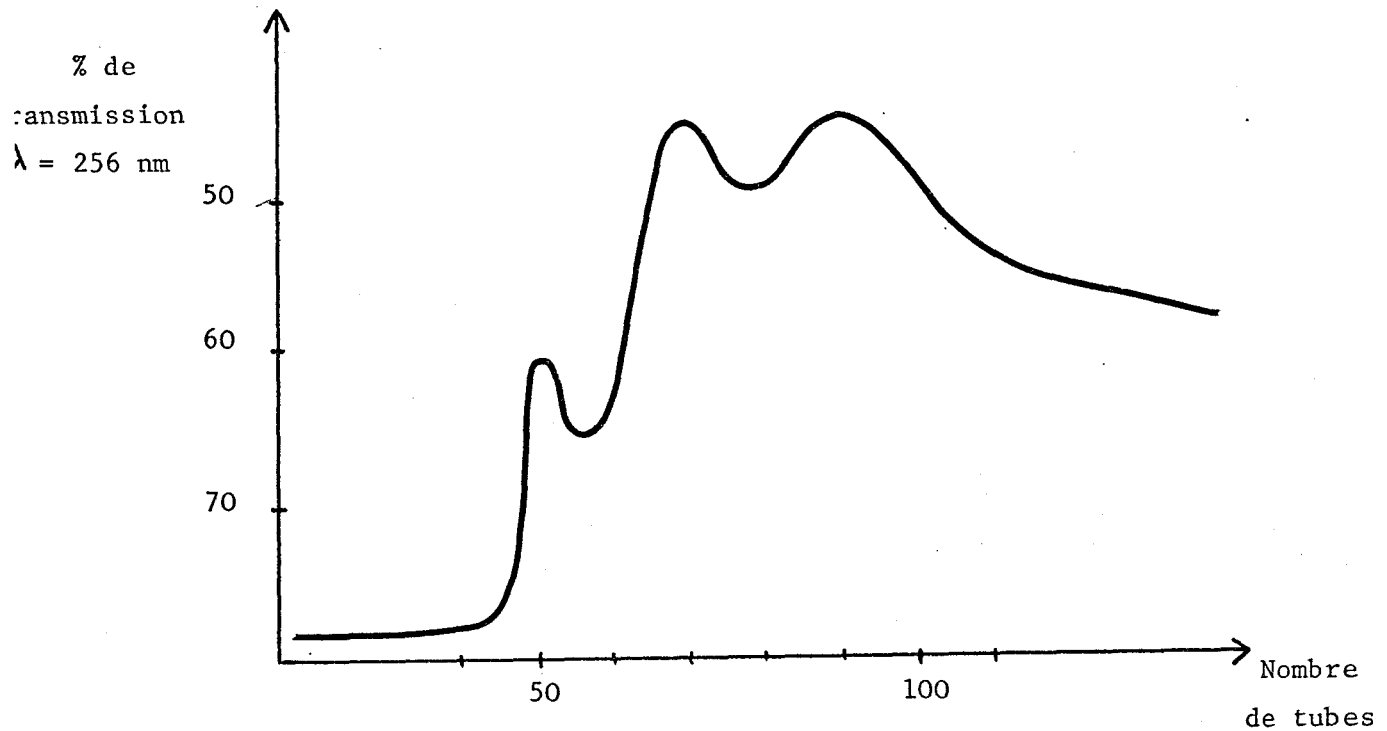
* S I = sérum immun



Figure 4



Ig totales de miniporc primoinfesté.
Fractionnement sur Séphadex G 200.



Ig (moins les Ig A) de rats primo-infestés.
Fractionnement sur Séphadex G 200.



d'ailleurs pas d'incidence notable sur les résultats (figure 4).

Ces résultats sont consignés dans la partie inférieure du tableau XI : ils confirment l'action prépondérante des Ig M (-19,8%) par rapport aux Ig G (-12,6% et -16,2%) et montrent le rôle négligeable joué par les Ig A sériques sur les pontes des femelles (-3,7%). Là encore seule la fraction Ig M provoque une inhibition statistiquement significative : $p=0,035$.

Par ailleurs nous avons effectué, par immunodiffusion radiale, un dosage cinétique des Ig A sériques de souris primoinfestées qui confirme quantitativement le fait que ces Ig A ne semblent jouer qu'un rôle négligeable dans la trichinose. En effet celles-ci n'augmentent que faiblement vers le 13^{ème} jour après l'infestation par rapport aux témoins non infestés (0,53 mg/ml):

J 5 : 0,51 mg/ml	J 11 : 0,49 mg/ml
J 13 : 0,59 mg/ml	J 19 : 0,51 mg/ml

7. ACTION DES SECRETIONS INTESTINALES (TOTALES ET FRACTIONNEES)

DE SOURIS ET DE RATS, INFESTES OU IMMUNISES : tableau XII page 39.

Quatre résultats peuvent être extraits de ce tableau :

7-1- L'action des sécrétions globales des souris et des rats témoins est négligeable : respectivement -1,8% et -6,7%, chiffres qui ne sont pas statistiquement significatifs.

7-2- Les sécrétions globales de souris et de rats infestés respectivement depuis 11 jours et 7 jours sont nettement plus actives (-11,3% et -25%) ; ces pourcentages sont statistiquement significatifs.

7-3- La présence des vers adultes dans l'intestin

grêle n'est pas indispensable pour déclancher l'apparition des sécrétions actives puisque des souris, seulement immunisées *per os* par l'antigène total, ont des sécrétions inhibitrices de la ponte (-11%) de façon significative.

7-4- Les Ig A sécrétoires semblent (quantitativement et qualitativement) constituer la majeure partie des globulines sécrétées. En effet, après leur extraction par chromatographie d'affinité nous n'avons pas réussi à détecter d'autres immunoglobulines sur Séphadex G 200.

Qualitativement ces Ig A sécrétoires se sont avérées actives, vis à vis de la ponte des *T. spiralis* femelles, à de faibles concentrations (de 15 à 24 μg par ml) aussi bien chez le rat (-13,1%) que chez la souris (-16,5%) de façon statistiquement significative. Quant aux autres protéines (récoltées sur des rats à J 7), c'est à dire les sécrétions globales moins les Ig A sécrétoires, leur faible activité (-6,7%) n'est pas significative.

TABLEAU XII :

Action des sécrétions intestinales (totales ou fractionnées)
de souris et de rats infestés ou immunisés.

Animaux utilisés ↓	Sécrétions ou Fractions Sécrétoires ↓	Nombre moyen de larves par femelle en 24 heures de culture		Réduction de la ponte en % par rapport aux témoins	Probabilités
		199 contenant 10% des sécrétions ou d'IgA sécrétoires	199 (témoins)		
Souris témoins	sécrétions globales	72,4 ± 1,0	73,7 ± 2,2	-18%	p=0,23
Souris à J 11	sécrétions globales	65,4 ± 1,4		<u>-11,3%</u>	p=0,020
Souris immunisées <i>per os</i> par Ag total	sécrétions globales	70,8 ± 4,8	79,6 ± 2,3	<u>-11%</u>	p=0,050
Rats témoins	sécrétions globales	74,4 ± 9,4	79,4 ± 7,1	-6,7%	p=0,24
Rats à J 7	sécrétions globales	59,5 ± 2		<u>-25%</u>	p=0,053
Rats à J 7	Ig A S.* (150µg/bte)	75,3 ± 0,2	86,7 ± 11,1	<u>-13,1%</u>	p=0,048
	Autres sécrétions	80,9 ± 24,6		-6,7%	p=0,11
Souris à J 7	Ig A S. de souris (240µg/bte)	63,5 ± 1,2	76,1 ± 5,7	<u>-16,5%</u>	p=0,044

* Ig A S. = Ig A sécrétoires.



COMMENTAIRES

COMMENTAIRES

Bien que la souche de *T. spiralis*, la lignée de souris, l'antigène et l'adjuvant que nous avons utilisés soient différents, les résultats de notre expérience *princeps* (tableau II page 18) confirment ceux de DESPOMMIER (1977) récemment publiés ; le nombre de larves pondues est sous la dépendance de réactions immunitaires qui représentent un facteur limitant de la parasitose. Il faut noter que ces réactions immunitaires peuvent intervenir chez les souris immunisées dès le 5^{ème} jour après l'infestation, ce qui apporte un argument supplémentaire aux conclusions de DENHAM (1966) sur la précocité d'intervention des réactions immunitaires au cours de la trichinose. La figure 2 (page 19) montre que chez les souris primo-infestées, la pression immunitaire commence à se faire sentir à J 7 mais qu'elle ne devient vraiment efficace qu'aux 8^{ème} et 9^{ème} jours après l'infestation (baisse de la ponte chez les "témoins" et augmentation chez les souris immunodéprimées). On peut donc en déduire que les femelles de *T. spiralis* issues de souris primo-infestées et récoltées à J 5 et à J 6 peuvent être considérées comme d'authentiques témoins : en effet elles n'ont pas encore subi de pression immunitaire comme le prouve indirectement, par comparaison avec ce qui se passe chez les souris témoins, l'absence d'augmentation de ponte chez les souris immunodéprimées. Deux hypothèses complémentaires peuvent être avancées pour expliquer la légère diminution de ponte des femelles issues de souris immunodéprimées, par rapport aux témoins, de J 5 à J 7 (tableau IV et V pages 23 et 24) ; la première concerne la toxicité éventuelle de l'antimitotique sur les vers, toxicité

qui s'est avérée faible et non statistiquement significative *in vitro* (tableau VI page 26) ; la seconde suggère que sous l'influence des immuno-dépresseurs, des vers de faible vitalité et qui normalement auraient été éliminés, étaient néanmoins susceptibles d'atteindre leur maturité chez leur hôte, mais avec une capacité de ponte réduite. Sans être démontrée, cette seconde hypothèse est rendue très vraisemblable par le fait que, de J 5 à J 7, il y a pratiquement trois fois plus de femelles installées dans le tube digestif des souris traitées par les immuno-dépresseurs que dans celui des souris témoins (tableau V page 24).

En ce qui concerne les deux antigènes que nous avons utilisés nous savons (VERNES, 1975 et 1976) que l'antigène "métabolique" administré *per os* induit, en l'absence apparente d'anticorps sériques, une augmentation notable de l'HSR (hypersensibilité de type retardée) qui confère aux souris et aux porcs ainsi immunisés une protection (appréciée en nombre de larves enkystées) dépassant 99%. Malgré cette absence d'anticorps sériques nous avons montré (expérience "princeps") que *in vivo* l'antigène métabolique induit une réduction de ponte statistiquement significative, peut-être consécutive à l'action des mécanismes cellulaires sur les femelles au niveau de la muqueuse intestinale. L'efficacité de la "vaccination" par l'antigène "métabolique" pourrait résulter, d'une part, d'une inhibition partielle de la ponte et d'autre part d'un blocage, à un certain niveau, des larves L 1 pondues. DENNIS (1970), DESPOMMIER (1971) et JAMES (1975) ont montré que les larves L 1 ne sont ni immunogènes ni sensibles aux réactions immunitaires de l'hôte ; ces larves, injectées par une intra-veineuse, sont en effet retrouvées enkystées dans les muscles

pour une grande partie d'entre-elles quel que soit le degré d'immunité de l'hôte . Il est donc logique de penser que le blocage des larves L 1 doit s'effectuer au niveau de la muqueuse intestinale, avant que ces larves ne gagnent les espaces lymphatiques ou les veinules mésentériques. Il ne s'agit là encore que d'une hypothèse que nous nous attachons actuellement à vérifier.

L'antigène somatique "total" injecté par voie intrapéritonéale (ou *per os*) induit une montée des anticorps très proche de celle provoquée par une primo-infestation (CRANDALL,1972). Il n'est donc pas étonnant que cet antigène induise *in vivo* une inhibition de ponte nettement supérieure à celle que déclenche l'antigène "métabolique" (tableau III page 21). Nous avons retrouvé *in vitro* (tableau VII page 29) l'action significative des sérums anti-antigène somatique alors que les sérums anti-antigène "métabolique" sont inactifs ; un même résultat est atteint avec des immunosérums de porcs primo-infestés (tableau VIII page 30), les immunosérums de porcs "vaccinés" par l'antigène "métabolique" s'avérant inefficaces.

La cinétique d'action, sur la ponte, des immunosérums de rats primo-infestés nous montre (tableau IX page 32) que l'efficacité est maximale à J 8 ; il est intéressant de noter que c'est justement de J 6 à J 8 que les femelles pondent le plus ; peut-être s'agit-il d'une adaptation de la réponse immunitaire au cycle de la trichinose.

Dans nos conditions expérimentales les immunoglobulines immunes se sont avérées plus actives que les sérums totaux correspondants, notamment à la concentration de 20% dans le milieu de culture (tableau X page 33). Ce fait suggère que les protéines

et les éléments organiques du sérum jouent un rôle trophique efficace dans les métabolismes des femelles en culture, et que cette action positive masque, en partie, l'activité inhibitrice des immunsérums.

Notre étude de l'action des différentes immunoglobulines sériques (tableau XI page 35) mène à la conclusion que seules les Ig M induisent une inhibition de ponte statistiquement significative ; les Ig G n'ont qu'une action modérée qui s'est avérée, dans le cadre de nos expériences, non significative. Quant aux Ig A leur rôle semble négligeable. Ces résultats confirment ceux de KWAN (1971) : des larves infestantes de *T. spiralis* incubées avec des Ig M anti-trichines avant l'infestation, induisent une parasitose (appréciée par le nombre d'adultes et de larves musculaires) moindre que lorsqu'elles sont incubées avec des Ig G. PERRUDET-BADOUX (1975), de son côté, a obtenu des infestations du même ordre de grandeur chez deux lots de souris génétiquement sélectionnées, les unes pour leur forte production en anticorps sauf pour les Ig M, et les autres pour leur faible production en anticorps sauf également pour les Ig M. Ceci démontre indirectement le faible rôle joué par les immunoglobulines autres que les Ig M.

Il est enfin intéressant de constater qu'au niveau des sécrétions intestinales seule la fraction Ig A s'est avérée active vis à vis de la ponte (tableau XII page 39) dans nos conditions expérimentales. Nous apportons ainsi un argument nouveau aux travaux qui attribuent aux Ig A sécrétoires un rôle primordial dans l'immunité au cours de la trichinose (CRANDALL, 1972) ainsi qu'aux conclusions de BAZIN (1973) sur les réponses immunologiques.

induites par voie orale.

Il n'est peut-être pas sans intérêt de noter que les deux anticorps les plus actifs ont une structure polymérique : jusqu'à 15 S de constante de sédimentation pour les Ig A sécrétoires et 19 S (pentamère) pour les Ig M sériques. Nous essaierons donc, dans un proche avenir, de déterminer si l'efficacité de ces anticorps dépend effectivement de cette structure particulière.

En conclusion nos travaux ont permis d'apporter quelques éléments originaux concernant l'immunologie de la trichinose et ses répercussions sur la ponte des femelles de *T. spiralis*.

L'action prépondérante des Ig M au niveau du sérum, et des Ig A sécrétoires au niveau de l'intestin grêle, nous incite à poursuivre nos recherches dans ces deux directions pour essayer d'élucider leur mécanisme d'action.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- BAZIN H.; ANDRE C.; HEREMANS J.F. (1973)
Réponses immunologiques induites par voie orale.
Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), 124 C, pp. 253-271.

- BAZIN H. ; BECKERS A. ; QUERINJEAN P. (1974)
Three classes and four (sub) classes of rat immunoglobulins
Ig M, Ig A, Ig E and Ig G1, Ig 2a, Ig 2c.
European Journal of Immunology, 4, pp. 44-48.

- CAMPBELL W.C. (1968)
Effects of anti-inflammatory agents on spontaneous of trichinella
and trichuris in mice.
The Journal of Parasitology, 54, 3, pp. 452-456.

- COKER C.M. (1955)
Effects of cortisone on *Trichinella spiralis* infections in
immunized mice.
The Journal of Parasitology , 41, pp. 498-504.

- CRANDALL R.B. ; CRANDALL C.A. (1972)
Trichinella spiralis : immunological response to infection in mice.
Experimental Parasitology , 31, pp. 378-398.

- DENHAM D.A. (1966)
Immunity to *Trichinella spiralis*. I. The immunity produced by mice
to the first four days of the intestinal phase of the infection.
Parasitology, 56, pp. 323-327.

- DENNIS D.T. ; DESPOMMIER D.D. ; DAVIS N. (1970)
Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat.
Journal of Parasitology , 56, pp. 974-977.

- DESPOMMIER D.D. (1971).
Immunogenicity of the newborn larva of *Trichinella spiralis*.
The Journal of Parasitology , 57, 3, pp. 531-534.

- DESPOMMIER D.D. (1974)
The relationship between synthesis, storage and secretion of functional antigens by the larva of *Trichinella spiralis*, and the induction of protective resistance in the host.
Proceedings ICOPA III, Munich , p. 1162.

- DESPOMMIER D.D. ; CAMPBELL W.C. ; BLAIR L.S. (1977).
The *in vivo* and *in vitro* analysis of immunity to *Trichinella spiralis* in mice and rat.
Parasitology, 74, pp. 109-119.

- DESPOMMIER D.D. ; MULLER M. (1970 a)
Fonctional antigens of *Trichinella spiralis*.
Journal of Parasitology, 56, 2, p. 76.

- DESPOMMIER D.D. ; MULLER M. ; (1970 b)
The stichosome of *Trichinella spiralis* : its structure and function.
Journal of Parasitology , 56, 2, pp. 76-77.

- DESPOMMIER D.D. ; MULLER M. (1976)
The stichosome and its secretion granules in the mature muscle larva of *Trichinella spiralis* .
The Journal of Parasitology, 62, 5, pp. 775-785.

- DESPOMMIER D.D. ; WOSTMANN B.S. (1968)
Diffusion chamber for inducing immunity to *Trichinella spiralis* in mice.
Experimental Parasitology , 23, pp. 228-233.

- DESPOMMIER D.D. ; WOSTMANN B.S. (1969)
Trichinella spiralis : immune elimination in mice.
Experimental Parasitology, 24, pp. 243-250.

- GARDINER C.H. (1976)
Habitat and reproductive behaviour of *Trichinella spiralis*.
Journal of Parasitology , 62, 6, p. 865.

- HARLEY J.P. ; GALLICCHIO V. (1971).
Growth of *Trichinella spiralis* larva from birth today 13 post-inoculation in the male albino rat.
Journal of Parasitology, 57, 4, p. 781.

- JAMES E.R. ; DENHAM D.A. (1975).
Immunity to *Trichinella spiralis* VI : the specificity of the immune response stimulated by the intestinal phase.
Journal of Helminthology, 49, pp. 43-47.

- KWAN C.K. (1971).
Trichinella spiralis : Ig M and Ig G and infectivity for mice.
Experimental Parasitology , 30, pp. 82-87.

- LANCASTRE F.A. ; MOUGEOT G. ; BAZIN J.C. ; DEPERNET D. (1971)
Trichinose expérimentale (2ème note). Longévité et distribution des trichines adultes chez les souris normales et immunotolérantes.
Annales de Parasitologie (Paris), 46, 6, pp. 709-718.

- LARSH J.E. (1967)
The present understanding of the mechanism of immunity to *Trichinella spiralis*.
The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 16, 2, pp. 123-132

- LARSH J.E. ; GOULSON H.T. ; WEATHERLY N.F. (1964).
Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis* .II. Transfer of peritoneal exudate cells.
Journal of Parasitology, 50, 4, pp. 496-498.

- LARSH J.E. ; RACE G.J. (1975).
Allergic inflammation as a hypothesis for the expulsion of worms from tissues : a review.
Experimental Parasitology, 37, pp. 251-266.

- LARSH J.E. ; WEATHERLY N.F. ; GOULSON H.T. ; CHAFFEE E.F. (1972).
Studies on delayed (cellular) hypersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis* VII. The effect of ATS injections on the



- numbers of adult worms recovered after challenge.
The Journal of Parasitology, 58, 6, pp. 1052-1060.
- PERRUDET-BADOUX A. ; BINAGHI R.A. ; BIOZZI G. (1965).
Trichinella infestation in mice genetically selected for high and low antibody production.
Immunology, 29, 2, pp. 387-390.
 - POULAIN J. ; PERY P. ; LUFFAU G. (1976)
Nippostrongylus brasiliensis in the rat : immune response in serum and intestinal secretions.
Annales d'Immunologie (Institut Pasteur), 127 C, pp. 209-213.
 - RUITENBERG E.J. ; STEERENBERG P.A. (1974).
Intestinal phase of *Trichinella spiralis* in congenitally athymic (nude) mice.
Journal of Parasitology, 60, 6, pp. 1056-1057.
 - VERNES A. (1976).
Immunization of the mouse and minipig against *Trichinella spiralis*.
In Biochemistry of parasites and host-parasite relationship.
H.Van den Bosshe éd. ; pp. 319-324.
 - VERNES A. ; FLOC'H F. ; BIGUET J. ; TAILLIEZ R. (1975 a).
Trichinose expérimentale I. Cinétique des phénomènes d'hypersensibilité retardée chez la souris CBA et le rat Wistar.
International Journal for Parasitology, 5, pp. 63-70.
 - VERNES A. ; TAILLIEZ R. ; FLOC'H F. ; BIGUET J. (1975 b).
Trichinose expérimentale II. Variations quantitatives et qualitatives des globulines sériques chez la souris CBA et le rat Wistar.
International Journal for Parasitology, 5, pp. 71-75.
 - WALLS R.S. ; CARTER R.L. ; LEUCHAR E. ; DAVIS A.J. (1973).
The immunopathology of trichinosis in T-cell deficient mice.
Clinical Experimental Immunology , 13, pp. 231-242.