50376
1983
227

UNIVERSITÈ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1983
227

THESE

presentee pour l'obtention du titre
de Docteur de 3e cycle en
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

84 976
036 121 185

par

Isabelle des Moutis

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX POUR LA DETECTION D'ANTIGENES CIRCULANTS DANS L'ONCHOCERCOSE.

JURY : Président : M. H. DURCHON
Rapporteur : M. A. CAPRON
Membres : M. J.P. DESSAINT
M. E. VIVIER
M. A. DHAINAUT

Soutenue le : 14 JANVIER 1983

Ce travail a été réalisé grâce à l'équipe de Chercheurs du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction de Monsieur le Professeur André CAPRON.

J'exprime mes sentiments de gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur André CAPRON et aux membres du Jury.

Je remercie vivement les membres du Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, ainsi que ceux du CEPIALET de Caracas qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

RESUME

L'Onchocercose est une maladie tropicale conduisant à de nombreux cas de morbidité et d'invalidité grave, notamment la cecité. Un test de diagnostic précoce de l'Onchocercose est indispensable pour le contrôle des zones soumises à un traitement anti-vectoriel. Les travaux décrits dans cette thèse ont permis de produire un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène circulant de l'Onchocercose. Cet antigène a pu être détecté par le biais de cet anticorps monoclonal chez 80 % d'Africains et 76 % d'Indiens du Vénézuela vivant en zones endémiques. Les données épidémiologiques et parasitologiques recueillies sur le terrain ont montré que l'anticorps monoclonal utilisé permet de détecter de l'antigène circulant de l'Onchocercose dans 83 % des cas présentant un diagnostic parasitologique négatif. De plus, chez des enfants de moins de 10 ans, présentant donc une infection relativement récente, la technique mise au point permet de déceler cet antigène circulant de l'Onchocercose dans 91 % des cas étudiés alors que le diagnostic parasitologique ne se révèle positif que chez 52 % d'entre eux.

La technique de détection de l'antigène circulant de l'Onchocercose développée dans cette thèse renforce donc considérablement les possibilités de diagnostic de l'Onchocercose. De plus, des travaux préliminaires permettent d'espérer, dans un futur proche, la mise au point d'une méthode enzymologique de dosage de l'antigène circulant par le biais du monoclonal, technique qui pourrait être utilisée comme diagnostic de masse sur le terrain.

MOTS CLES

ONCHOCERCOSE/FILARIOSE/PARASITOSE - ANTIGENE. SERUM - ANTICORPS MONOCLONAL - DIAGNOSTIC. IMMUNOLOGIE

Travaux ayant fait l'objet de publication

- HAQUE, A., OUAISSI, M.A., SANTORO, F., des MOUTIS, I. & CAPRON, A. (1982) Complement-mediated leukocyte adherence to infective larvae of Dipetalonema viteae (Filariodes) requirement for eosinophils or eosinophil products in effecting macrophage adherence. Journal of Immunology 129, 2219-2225.

- OUAISSI, M.A., KOUEMENI, L.E., des MOUTIS, I., HAQUE, A. & CAPRON, A. (1982) Détection des antigènes circulants dans l'onchocercose : possibilité nouvelle d'un diagnostic immunologique. Médecine des Armées 10, 157-160.

- OUAISSI, M.A., des MOUTIS, I., CORNETTE, J., PIERCE, R. & CAPRON, A. (1982) Detection of IgE antibodies in Onchocerciasis using a semi-purified fraction from Dipetalonema viteae total antigen. International Archives of Allergy and Applied Immunology, sous presse

- des MOUTIS, I., OUAISSI, A., GRZYCH, J.M., YARZABAL, L., HAQUE, A. and CAPRON, A. Onchocerca volvulus : Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, sous presse.

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

Ag Ov : Antigène soluble d'*Onchocerca volvulus*

Ag TCAs : Ag Ov soluble dans l'acide trichloroacétique

Ag TCAins : Ag Ov insoluble dans l'acide trichloroacétique

PEG : Polyéthylèneglycol

ACF : Adjuvant complet de Freund

DMSO : Diméthylsulfoxide

IF : Immunofluorescence

ELISA : "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"

Ig : Immunoglobuline

OPD : O-phényl-diamine

OD : O-Dianisidine

IBF : Industrie Biologique Française

DDG : Double diffusion en gel

RIPEGA : "Radioimmunoprecipitation PEG Assay"

Ac Mn : Anticorps Monoclonal

SRIA : "Sandwich Radioimmunoassay"

SRIA-P : "Sandwich Radioimmunoassay" sur plaques

SRIA-B : "Sandwich Radioimmunoassay" sur billes

SAB : Sérum albumine bovine

ACO : Antigène circulant de l'Onchocercose

SHN : Sérum humain normal

CIC : Complexes immuns circulants

Page

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : L'Onchocercose : données générales

I - RAPPEL PARASITOLOGIQUE 5

1 - Cycle évolutif du parasite 5

2 - Description des différents stades évolutifs 8

3 - Cycle évolutif du vecteur 9

II - MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION PAR ONCHOCERCA VOLVULUS 9

1 - Diagnostic clinique 9

a) Les signes cutanés 9

b) Les signes sous-cutanés 10

c) Les signes oculaires 10

2 - Diagnostic parasitologique 13

a) La biopsie cutanée exsangue 14

b) La scarification 14

c) L'examen direct de la chambre antérieure de l'oeil 15

d) La biopsie conjonctivale 15

e) La recherche dans les urines 15

f) Le test de Mazzotti 16

3 - Diagnostic immunologique 16

a) La réaction de fixation du complément 16

b) Les réactions d'hémagglutination 17

c) Les techniques de précipitation en gel 17

d) Le test d'immunofluorescence indirecte 18

e) Les techniques immunoenzymologiques 19

f) L'intradermoréaction 19

g) Les techniques radioimmunologiques 20

III - CONCLUSION 20

Page

CHAPITRE II

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES ANTIGENES PARASITAIRES CIRCULANTS

I - Données générales 23

II - Etude des antigènes circulants dans les parasitoses 25

1 - Les protozoaires..... 25

2 - Les trématodes..... 26

3 - Les nématodes 28

CHAPITRE III

PRINCIPE DE L'HYBRIDATION CELLULAIRE POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

I - Définition et introduction..... 33

II - La fusion cellulaire..... 34

1 - Les cellules..... 34

a) Les cellules immunes..... 34

b) Les cellules myélomateuses..... 36

2 - Les agents fusogènes..... 36

a) Le virus de Sendai..... 36

b) Les agents chimiques..... 37

3 - Le mécanisme..... 38

4 - La sélection des hybrides..... 40

5 - La stabilité des hybrides 42

III - La production d'anticorps monoclonaux..... 43

1 - Le clonage..... 43

2 - La production massive..... 44

a) La culture massive *in vitro*..... 44

b) La production d'ascite *in vivo*..... 45

IV - Conclusion..... 45

Page

CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODES

I - Origine des sérums étudiés 52

II - Le matériel parasitaire 54

1 - Les nodules 54

2 - Les vers adultes 54

3 - Préparation de l'antigène 54

III - La production d'anticorps monoclonaux 56

1 - Les milieux de culture 56

2 - Les cellules nourricières 56

3 - Les cellules immunes 59

a) Protocole d'immunisation 59

b) Préparation des cellules immunes 59

4 - Les cellules myélomateuses 60

5 - La fusion cellulaire 61

6 - La sélection des hybrides 61

7 - La mise en évidence d'anticorps monoclonaux anti-O. volvulus 62

a) L'immunofluorescence 62

b) L'ELISA 64

8 - La caractérisation isotypique des anticorps anti-O. volvulus 65

9 - Le clonage des hybrides sélectionnés 66

10 - La production massive d'anticorps monoclonaux 67

IV - La filtration sur gel 68

V - La précipitation en gel 69

VI - La migration en gel 70

1 - L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS 70

2 - L'électrophorèse en agarose 71

VII - Le marquage d'immunoglobulines à l'Iode ^{125} 72

VIII - Le "Radioimmunoprecipitation-PEG Assay" (RIPEGA) 72

Page

IX - Dosage des complexes immuns par le Clq-^{125}I 74

X - Les techniques directes de dosages d'antigènes circulants .. 77

1 - Le "SRIA" sur plaques (SRIA-P)..... 77

2 - Le "SRIA" sur billes (SRIA-B) 79

XI - Analyse statistique des résultats..... 80

CHAPITRE V : RESULTATS

I - Immunisation pour la production d'anticorps monoclonaux 83

II - L'hybridation 83

III - Détection d'anticorps monoclonaux anti-O. volvulus 83

1 - L'immunofluorescence..... 86

2 - L'"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)..... 86

a) Utilisation de l'antigène O. volvulus en ELISA 86

b) Utilisation de l'antigène TCAs en ELISA 92

IV - Caractérisation isotypique 94

V - Production de liquide d'Ascite 98

VI - Purification de l'IgM monoclonale anti-Ag TCAs 98

VII - Détection d'ACO dans le sérum par RIPEGA 102

1 - Mise au point 102

2 - Etude de sérums de patients onchocerquiens 104

3 - Corrélation entre l'ACO et les données parasitologiques .. 108

4 - Spécificité du RIPEGA utilisant l'IgM Mn pour la détection d'ACO 112

VIII - Détection de complexes immuns circulants dans le sérum 114

1 - Etude de sérums onchocerquiens 114

2 - Corrélation entre l'ACO et les CIC 116

IX - Spécificité de l'anticorps monoclonal IA2-23 116

1 - En immunodiffusion (DDG)..... 116

2 - En ELISA 120

3 - En RIPEGA 123

Page

X - Essai de mise en évidence d'ACO dans les urines par RIPEGA... 123

1 - Mise au point 123

2 - Urines de patients onchocerquiens 126

XI - Détection d'ACO par des techniques directes (SRIA) 126

1 - Choix du support 126

2 - Etude de sérums de patients onchocerquiens 127

XII - Données biochimiques sur l'antigène circulant 127

1 - Analyse par immunoprécipitation 127

2 - Analyse par filtration sur gel 130

3 - Analyse par migration en gel 133

CHAPITRE VI : DISCUSSION

I - L'hybridation et le dépistage d'anticorps anti-antigène circulant 136

II - La détection d'antigène circulant dans le sérum par un anticorps monoclonal 139

III - Absence de l'antigène circulant étudié dans les urines de patients onchocerquiens 145

IV - Spécificité de l'anticorps monoclonal IA2-23 146

V - Mise au point de techniques indirectes pour la détection d' ACO 147

VI - Caractéristiques de l'antigène circulant détecté 148

CONCLUSION 151

Appendices techniques 156

Références bibliographiques 159

INTRODUCTION

Les filarioses sont des maladies très répandues dans les régions tropicales, et on peut estimer à 300 millions le nombre de personnes qui en sont atteintes dans le monde (Fain A., 1981). Bien qu'elles ne mettent que rarement la vie du malade en danger, elles constituent une des causes importantes de morbidité et d'invalidité grave. Les longues souffrances physiques et morales endurées par les malades, ainsi que les complications telles que la cécité ou l'éléphantiasis ont amené les experts de l'Organisation Mondiale de la Santé à reconnaître, en 1976, l'importance des filarioses sur le plan de la santé publique. La conséquence des filarioses sur le plan économique a également été attirée par la désertion massive de régions endémiques parfois fertiles comme c'est le cas pour le bassin de la Haute Volta.

En effet, l'onchocercose entraîne un déséquilibre économique : les manifestation invalidantes les plus graves de la maladie affectent essentiellement les tranches d'âge les plus productives qui se retrouvent alors à la charge du reste de la population, lui-même physiquement diminué par les conséquences des signes secondaires de la maladie. L'onchocercose a également un impact psychologique considérable qui conduit souvent à un déséquilibre social au sein des foyers soumis aux plus fortes transmissions. La superposition du déséquilibre social au déséquilibre économique entraîne très souvent l'abandon de villages pourtant situés dans des zones fertiles.

Sous le nom de filarioses sont groupées des helminthiases dont les tableaux cliniques sont extrêmement variés. Les filarioses humaines les plus importantes sont les suivantes :

- les filarioses lymphatiques causées par *Wuchereria bancrofti* et *Brugia malayi* sont rencontrées en Asie, en Océanie, en Afrique et en Amérique du Sud. Les insectes vecteurs sont des moustiques du genre

Anopheles ou Aedes. Les troubles pathologiques sont essentiellement en rapport avec la présence de vers adultes dans les organes lymphatiques. Ces troubles varient de l'inflammation aiguë des vaisseaux et des ganglions lymphatiques jusqu'à l'éléphantiasis ;

- La Loase causée par la filaire Loa loa est endémique dans les zones forestières d'Afrique Centrale. Elle est transmise par des tabanides du genre Chrysops. La loase se manifeste par des oedèmes de Calabar et par des accidents oculaires bénins. Cependant, des complications au niveau de certaines viscères, et en particulier le cerveau, les reins et le coeur, sont observées lors du traitement par la diéthylcarbamazine. Celles-ci peuvent conduire à l'encéphalite, généralement fatale ;

- La dracunculose est causée par Dracunculus medinensis, plus connue sous le nom de filaire de Médine. On la rencontre en Afrique (côte Ouest), au Soudan, en Inde, en Arabie, aux Caraïbes et en Amérique du Sud. Les larves se développent dans des crustacés microscopiques du genre Cyclops, et l'homme s'infecte en buvant de l'eau contenant ces crustacés infectés. Seule, la femelle est pathogène de par sa migration dans les tissus conjonctifs. La dracunculose revêt une grande importance sur le plan socio-économique à cause de la longue invalidité qu'elle occasionne ;

- L'onchocercose, causée par Onchocerca volvulus, est transmise par des petits diptères du genre Simulium, c'est la deuxième maladie filarienne par ordre d'importance après les filarioses lymphatiques. Sa description sera détaillée dans le chapitre I.

La lutte contre les filarioses est très difficile. En effet, les médicaments existant sont toxiques ou inutilisables en campagne de masse, de par la durée du protocole thérapeutique. De plus, la fréquence de réactions secondaires d'ordre allergique, parfois dangereuses, limite leur utilisation. Dans le domaine de la prophylaxie, il n'existe aucun

vaccin contre les différentes filarioses. Actuellement, la meilleure prophylaxie consiste à lutter contre le vecteur. C'est une méthode difficile et très onéreuse. De plus, dans le cas de l'onchocercose, la longévité des vers adultes étant de 15 à 20 ans, il est nécessaire de poursuivre la lutte pendant cette période. Quelle que soit la prophylaxie employée, un diagnostic précoce et spécifique de la maladie est essentiel pour une bonne surveillance des moyens mis en oeuvre. Ce travail a pour but la mise au point d'un tel diagnostic par des techniques immunologiques sensibles et reproductibles qui, dans un proche avenir, pourraient être utilisées sur le terrain pour un dépistage de masse.

CHAPITRE I

L'ONCHOCERCOSE : DONNÉES GÉNÉRALES

I - RAPPEL PARASITOLOGIQUE

L'étude scientifique de l'Onchocercose débute à la fin du XIXème siècle avec la découverte par Leuckart, en 1893, de vers dans des nodules. Cependant, le cycle évolutif complet ne sera décrit qu'en 1926 par Blacklock.

L'aire d'extension de l'Onchocercose en Afrique est importante. Les pays limitrophes sont au Nord le Sénégal, le Mali et le Soudan et au Sud l'Angola et le Tanganyka. En Amérique du Sud, son étendue est concise au versant Pacifique du Guatémala et à quelques districts du Mexique et du Vénézuéla. Au sein de ces territoires, sa répartition est liée au régime des cours d'eau qui conditionne la présence de l'insecte vecteur. En effet, les larves aquatiques du vecteur ne se développent que dans des eaux relativement froides à courant rapide, pourvues par conséquent d'une forte teneur en oxygène.

1 - Cycle évolutif du parasite

Le cycle évolutif du parasite est représenté Figure 1.

Les filaires adultes vivent dans les espaces lymphatiques sous-cutanés. Dans un premier temps, les couples vivent libres puis sont emprisonnés dans des tuméfactions qu'envahit la fibrose, formant ainsi les nodules onchocerquiens (Photo 1). On observe en général deux femelles et un mâle par nodule. Les femelles sont vivipares et produisent des microfilaires (L1) qui quittent les nodules et se disséminent dans la couche dermique de la peau. Lors d'un repas sanguin, l'insecte vecteur ingère les larves avec la lymphe dermique. Quelques rares microfilaires

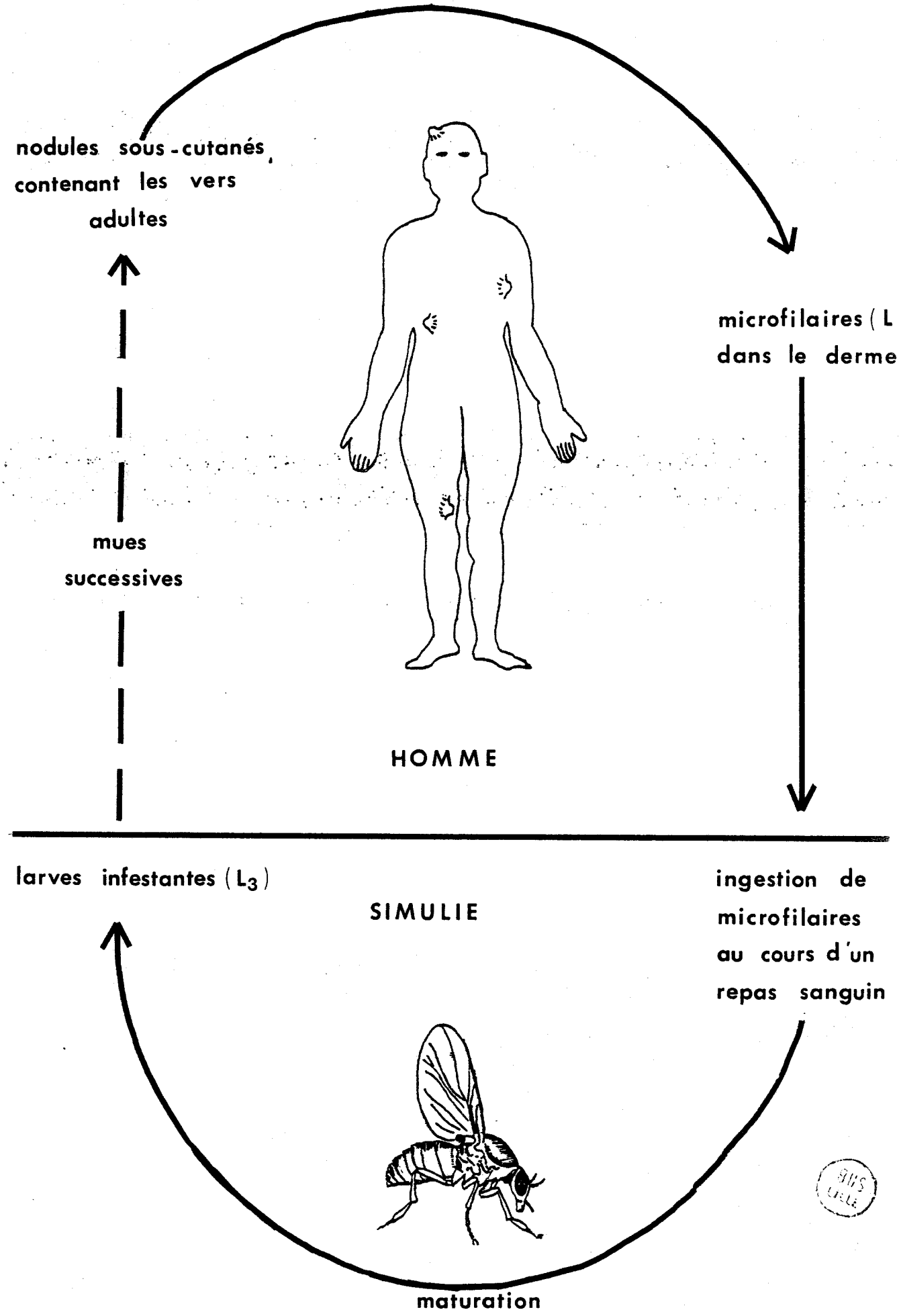
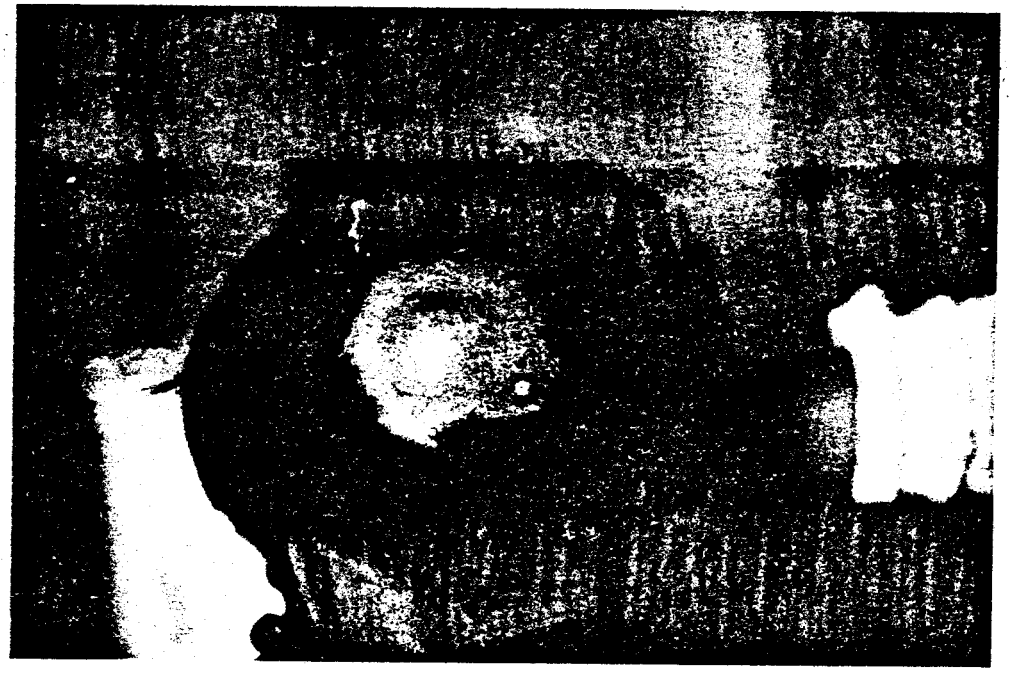


Figure 1 : Cycle évolutif d'*Onchocerca volvulus*



BUS LILLE

Photo 1 : Nodule onchocerquien ou onchocercomata

parviennent à passer la muqueuse gastrique et, par voie sanguine, se localisent dans les muscles thoraciques. Les microfilaires s'allongent, subissent plusieurs mues et évoluent environ en sept jours jusqu'au stade de larves infestantes (L3). Elles gagnent alors la tête et les trompes de l'insecte d'où elles sortiront pour pénétrer la peau de l'homme au moment de la piqûre. Ces larves sont sexuées et donneront soit des filaires mâles, soit des filaires femelles. Le développement jusqu'au stade adulte dure de 3 à 10 mois.

2 - Description des différents stades évolutifs

Les vers adultes vivent dans les nodules ou onchocercomes. Leur longévité varie de 10 à 15 ans. Le mâle mesure de 2 à 3 cm de long sur 130 µm de large. Il possède un corps blanc à cuticule épaisse, striée transversalement, munie d'une extrémité caudale recourbée.

La femelle mesure 5 cm de long sur 360 µm de large. Elle a un utérus bicorne rempli d'oeufs et d'embryons. Les oeufs mesurent de 30 à 50 µ.

Les embryons que l'on appelle dans ce cas microfilaires sont dépourvus de gaine, ce qui leur permet de glisser à travers les fibres conjonctives du nodule et de se répandre dans le derme ; ils ne présentent en outre pas de périodicité. Ils mesurent environ 250 µm de long sur 6 à 7 µm de large. Leur durée de vie semble se situer entre 1 à 3 années. Les larves infestantes (stade L3) sont obtenues après plusieurs mues chez l'insecte. Elles mesurent 500 µm de long et ont une forme plus trapue que les microfilaires.

3 - Cycle évolutif du vecteur

Le vecteur est une simulie, diptère, nématocère. Les principales espèces sont :

- Simulium damnosum et Simulium neavei en Afrique
- Simulium ochraceum, Simulium metallicum et Simulium callidum en Amérique. Il s'agit d'un moucheron noir mesurant 1 à 3 cm de long et possédant un dimorphisme sexuel oculaire.

Les simulies peuvent voler jusqu'à 70 km du gite larvaire. Seules les simulies femelles sont hématophages, les mâles ne se nourrissant que du suc des fleurs. Les femelles pondent de 100 à 500 oeufs qui mesurent 0,1 à 0,3 mm. Ceux-ci évoluent en larves pouvant atteindre au maximum 1 cm. Ces larves se fixent à un support par une couronne de crochets située à leur extrémité postérieure. Ces supports sont généralement des pierres immergées à faible profondeur ou des feuilles en contact avec la surface de l'eau. Les larves ne vivent que dans les eaux courantes bien oxygénées. Après sept mues, elles atteignent le stade de nymphe, entourée d'un cocon et toujours attachée à un support. Deux jours après son éclosion, la simulie femelle prend un repas sanguin chez l'homme, absorbant des microfilaires du derme ; trois à quatre jours plus tard, intervient la ponte.

II - MISE EN EVIDENCE DE L'INFECTION PAR ONCHOCERCA VOLVULUS

1 - Diagnostic clinique

a) Les signes cutanés : ce sont les plus fréquents (60 % des cas)

- Le prurit : il peut entraîner des lésions de prurigo, et paraît être le point de départ des autres lésions cutanées. Le fait qu'il s'accompagne parfois d'éruptions urticariennes conduit à penser à une origine allergique ;

- La gale filarienne : cette gale consiste essentiellement en une éruption de papules planes, prurigineuses, à contours bien définis et non squameuses (Photo 2) ;

- L'épaississement de la peau : prurit et prurigo s'accompagnent souvent d'une surinfection bactérienne ou fungique finissant par provoquer une lichénification accompagnée d'une hyperkératose et d'une ichtyose donnant l'aspect d'une "peau d'éléphant" ou "peau de lézard" (Photo 3) ;

- L'atrophie de la peau : dans certains cas, le revêtement cutané est aminci, atrophié et vernissé ;

- La dépigmentation : il peut se produire une dépigmentation de la peau, souvent localisée aux membres inférieurs, donnant l'aspect de la "peau de léopard".

b) Les signes sous-cutanés : il s'agit des nodules onchocerquiens ou onchocercomata (Photo 1). On les met en évidence par une palpation minutieuse des zones d'élection, c'est-à-dire des points où les plans osseux sont directement sous-cutanés et vers lesquels convergent les lymphatiques. Ils ne sont douloureux ni spontanément, ni lorsqu'on les palpe. Les jeunes nodules sont mous et non adhérents. Du tissu fibreux les envahit progressivement ; ils deviennent durs, libres par rapport à la peau, mais peuvent adhérer aux plans profonds. Cette évolution se poursuit pendant 10 ou 15 ans. Il est toutefois exceptionnel qu'ils suppurent ou s'ulcèrent. Leur taille est variable, pouvant atteindre 5 à 6 cm ; leur nombre peut atteindre 15 ou 20 mais est plus fréquemment de 2 ou 3.

c) Les signes oculaires : ce sont eux qui constituent la gravité de l'onchocercose ; ils sont d'une extrême fréquence et souvent très précoces. On estime que, tant en Amérique qu'en Afrique, 50 % des malades sont atteints de troubles oculaires ; dans certains villages, le tiers de la population est totalement aveugle.

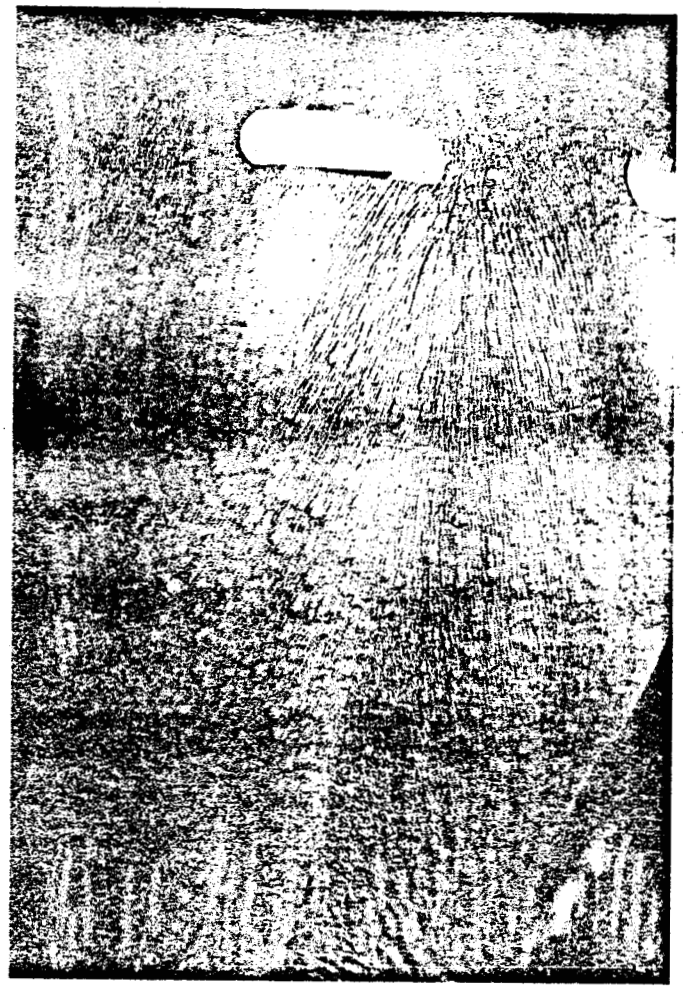


Photo 2 : Cas de gale filarienne chez un Indien du Vénézuela atteint d'onchocercose.

BUS LILLE

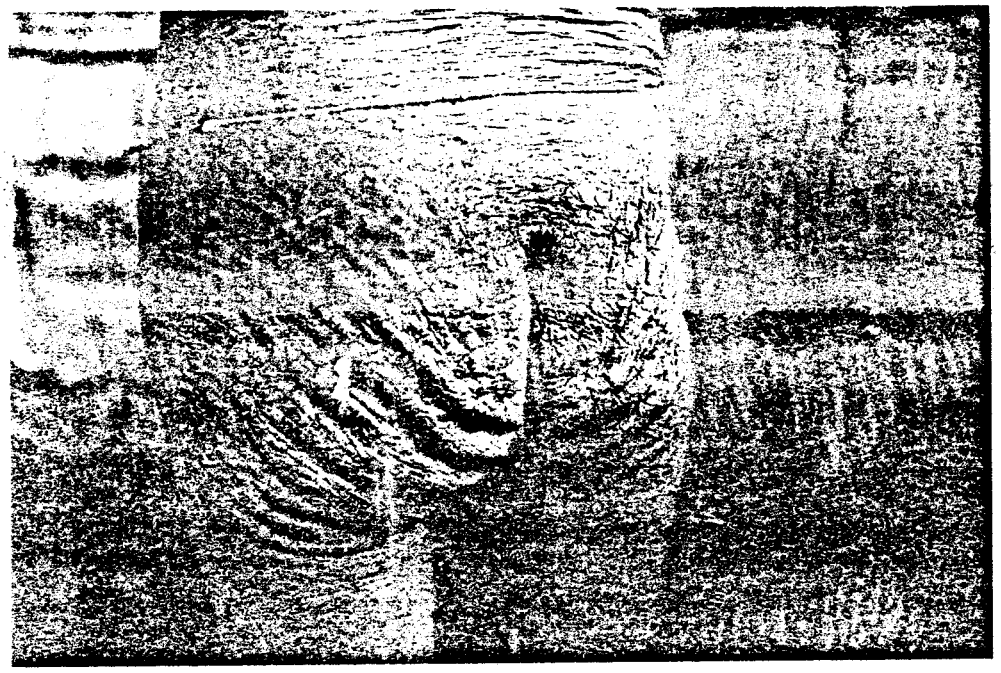


Photo 3 : Aspect en "peau d'éléphant" ou "peau de lézard" dû à un épaississement de la peau, conséquence de l'onchocercose.

BUS LILLE

Les premiers signes sont extrêmement insidieux et il est fréquent de trouver des microfilaires dans l'oeil de sujets ne se plaignant d'aucun trouble. L'atteinte du segment antérieur se traduit essentiellement par un picotement et un larmoiement discret. Les localisations irido-ciliaires entraînent une photophobie intense avec larmoiement abondant. Plus caractéristiques sont les congestions conjonctivales comportant parfois de petits nodules blanchâtres, les opacifications semi-lunaires du tiers découvert de la cornée, les chorio-rétinites ou encore les atrophies optiques. Les lésions du segment postérieur (Chovet et al., 1976) se traduisent par une baisse progressive de l'activité visuelle dont les malades ne prennent bien souvent conscience que tardivement.

d) Les signes lymphatiques : bien que plus rares, ils peuvent aller jusqu'à l'éléphantiasis. Cependant, les cas d'éléphantiasis causés par l'Onchocercose sont beaucoup moins monstrueux que ceux dus à la filaire de Bancroft ou à celle de Malaisie.

Tous ces signes cliniques, observés en zone endémique, doivent faire penser à l'Onchocercose ; néanmoins, aucun pris individuellement ne peut apporter un diagnostic de certitude. De plus, les manifestations cliniques n'apparaissent souvent qu'après une longue période de réinfestations quasi-quotidiennes, et les cas asymptomatiques sont fréquents. Par conséquent, le diagnostic clinique seul n'est nullement représentatif de l'indice d'infestation.

2 - Diagnostic parasitologique

Il consiste à mettre en évidence et à identifier le parasite au stade adulte ou larvaire.

La découverte d'Onchocercomes dans lesquels sont pelotonnés les vers adultes est la plus ancienne des méthodes de diagnostic et reste de

nos jours une pratique routinière dans la plupart des enquêtes. Cependant, les ganglions et les rares nodules d'étiologie différente peuvent constituer une cause d'erreur. De plus, la palpation d'un kyste ne donne pas l'assurance d'un signe d'Onchocercose active car les vers adultes peuvent être morts, dégénérés ou calcifiés.

La mise en évidence de microfilaires est plus couramment employée. Les techniques disponibles sont les suivantes :

a) La biopsie cutanée exsangue : cette technique est directement dérivée des travaux de Montpellier et Lacroix (1920). Elle consiste à prélever,sans faire saigner,un copeau de peau à l'aide de ciseaux courbes, ou de pinces spécifiquement conçues à cet effet. Ce copeau est placé dans un petit volume de sérum physiologique. La présence de microfilaires dans le milieu peut être observée au microscope après un court temps d'incubation. La distribution des microfilaires à la surface du corps varie et il est nécessaire de prélever plusieurs biopsies par patient. Les résultats peuvent s'exprimer d'une manière quantitative en nombre de microfilaires par milligramme de peau. Cette technique est couramment employée pour les enquêtes épidémiologiques. Elle est décrite et analysée en détails par Prost et Prod'hon (1978). Il faut souligner que la répartition des microfilaires n'étant pas homogène et que la totalité des microfilaires n'émergeant pas d'une biopsie, le côté quantitatif de ce test n'est pas absolu. Il est également fort probable que les cas de faible parasitose ne peuvent être ainsi détectés.

b) La scarification : préconisée pour la première fois par d'Hooghe en 1934, son efficacité a été depuis appréciée par de nombreux auteurs (Van den Berghe et al., 1951 ; Miller, 1958 et Basset et al., 1962).

Elle consiste à pratiquer 4 ou 5 scarifications cutanées superficielles et à presser la peau de façon à recueillir le suc dermique. Celui-ci est séché sur une lame et peut être coloré. La présence de microfilaires est examinée au microscope. Cette technique, d'utilisation facile, présente l'avantage d'un diagnostic différentiel sur lame colorée. Cependant, elle se prête mal à la quantification, les scarifications sont de plus douloureuses et mal acceptées, et enfin la sensibilité de la biopsie est plus grande (Kale et al., 1974).

c) L'examen direct de la chambre antérieure de l'oeil : il s'effectue à l'aide d'une lampe à fente. Il existe quelques cas où le parasite est présent dans l'oeil, sans qu'il soit possible de le mettre en évidence dans la peau par les méthodes les plus sensibles. La mise en évidence de microfilaires dans l'oeil permet un diagnostic spécifique de l'Onchocercose car c'est la seule filariose au cours de laquelle existent de telles localisations des embryons.

d) La biopsie conjonctivale : cette technique de réalisation délicate ne peut pas être recommandée comme diagnostic de routine.

e) La recherche dans les urines : l'observation de microfilaires dans les urines a été réalisée depuis longtemps (Mazzotti et al., 1949 ; Price, 1961) mais n'a acquis une valeur épidémiologique que plus tardivement (Buck et al., 1971 ; Buck, 1973 ; Picq et al., 1973 ; Anderson et al., 1975 a et b). Cependant, cette observation a toujours été associée à un fort degré de parasitisme cutané et n'a jamais été observée isolément. De plus, son association significative avec la présence d'autres complications graves de l'Onchocercose en fait plutôt un témoin de la gravité de la maladie.

f) Le test de Mazzotti : c'est une méthode de mise en évidence indirecte des microfilaires (Mazzotti, 1948). Elle consiste à administrer un microfilaricide, en l'occurence le diéthylcarbamazine (DEC) ou Notézine. Si des microfilaires sont présentes, leur lyse massive provoque une réaction allergique très importante présentant comme signes principaux le prurit, l'urticaire et l'hyperthermie. Ce phénomène a été utilisé comme moyen de diagnostic (Burch, 1951 ; Monjusiau et al., 1964 ; Lagraulet, 1971 ; Bourree et al., 1976). D'une part, ce test peut donner lieu à des erreurs par défaut car certaines personnes ne réagissent pas au DEC, d'autre part il est clair qu'en cas de microfilarodermie élevée ce test est fort désagréable et peut même se révéler dangereux.

Quelle que soit la technique employée, la mise en évidence du parasite apporte un diagnostic de certitude. Cependant, le diagnostic parasitologique en général n'est pas à l'abri de résultats incorrectement négatifs et possède également l'inconvénient de ne pas détecter les infections prépatentes.

3 - Diagnostic immunologique

De nombreuses techniques immunologiques ont été utilisées pour la détection d'anticorps dans l'Onchocercose. Les différents travaux concernant ce sujet ont été décrits et analysés dans des revues générales (Kagan, 1963, 1979 : Ambroise-Thomas, 1974, 1975, 1980).

Les techniques de diagnostic immunologique sont les suivantes :

a) La réaction de fixation du complément : c'est le test le plus ancien. Il a fait l'objet de la première publication concernant le diagnostic immunologique des Filarioses (Rodhain et Van Den Dranden, 1916). Il consiste à mélanger une préparation antigénique connue et titrée avec

le sérum de malade décomplémenté et avec du complément. Dans un deuxième temps, on ajoute des hématies de mouton et un sérum hémolytique anti-hématies de mouton. Dans le cas où il n'y a pas d'anticorps, le complément reste libre et peut participer à l'hémolyse. Si des anticorps sont présents dans le sérum, le complément se fixe au complexe antigène/anticorps et n'est plus disponible pour l'hémolyse.

Cette technique ne donne pas de résultat satisfaisant pour l'Onchocercose ; elle est de plus en plus délaissée au profit de techniques plus sensibles.

b) Les réactions d' agglutination : elles utilisent des hématies ou des particules de latex sur lesquelles est fixé l'antigène. Les anticorps du sérum de malade vont s'unir aux molécules d'antigène, entraînant une agglutination passive. On peut alors titrer les anticorps en diluant le sérum étudié.

Ces techniques ont pour inconvénient majeur le manque de spécificité. En effet, des réactions croisées ont été observées avec certains états fébriles ou certains cas de syphilis (Rosé et al., 1966), pour environ 10 % des maladies parasitaires et pratiquement 35 % des trichines (Kagan et al., 1963).

c) Les techniques de précipitation en gel : contrairement aux techniques en milieu liquide, les réactions en gélose sur plaque, double diffusion en gel (DDG) et immunoélectrophorèse (IEP) sont encore couramment utilisées. La DDG consiste à faire simultanément migrer dans le gel l'antigène et l'anticorps. Cela donne lieu à la formation de lignes de précipitation. Le principe de l'IEP est le même, mais l'antigène est préalablement séparé sous l'influence d'un champ électrique. La DDG est généralement utilisée comme méthode de dépistage préalablement

à l'IEP, technique plus lourde. Des arcs de précipitation permettant d'identifier les différentes Filarioses sont obtenus non seulement avec un antigène homologue, mais également avec des antigènes hétérologues tels que Dipetalonema viteae (Capron et al., 1968) ou Ascaris suum (Niel et al., 1968, 1972 ; Gentilini et al., 1972 ; Petithory et al., 1973).

Les études épidémiologiques de d'Haussy et al. (1972) révèlent que les réactions immunoélectrophorétiques reflètent bien le niveau endémique de l'Onchocercose. L'atout majeur de cette technique est sa spécificité qui permet même une différenciation parmi les Filarioses. On peut cependant critiquer la consommation importante en temps et en matériel (antigène et sérum). Une technique d'immunoélectrophorèse à contre-courant (Gentilini et al., 1972 ; Desowitz et Una, 1976) permet de réduire le temps de la réaction. Le principe de ce test réalisé sur membrane d'acétate de cellulose est le même que celui de la DDG, mais la vitesse de migration des antigènes et des anticorps est amplifiée par l'application d'une différence de potentiel aux extrémités des plaques.

d) Le test d'immunofluorescence indirecte : le principe de la méthode consiste à mettre en contact le sérum de malade et l'antigène figuré puis à révéler les complexes immuns par des anti-immunoglobulines humaines marquées par un produit fluorescent. Les résultats s'observent au microscope en lumière ultra-violette. Plusieurs types d'antigènes peuvent être employés (antigène soluble fixé sur disques, microfilaires...) mais la technique la plus fréquente utilise des coupes à congélation de parasite ; celle-ci nécessitant peu de matériel permet l'utilisation d'antigènes homologues. Elle nécessite l'emploi de peu de sérum et peut, par conséquent, être réalisée à partir de microprélèvements sanguins réalisés sur le terrain.

Pour le diagnostic, ce test semble être le plus fiable mais est également sujet aux problèmes de réactions croisées, même lors d'utilisation d'antigène homologue (Woodruff et Wiseman, 1968 ; Ambroise-Thomas, 1969 et 1975 ; Terreno, 1970 ; Le Bras et al., 1977).

e) Les techniques immunoenzymologiques : il s'agit de l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Dans ce test, l'antigène est fixé à un support de polystyrène (plaque de microtitration), puis mis en contact avec le sérum du patient. Après lavage, les anticorps complexés à l'antigène sont révélés par des anti-immunoglobulines humaines conjuguées à un marqueur enzymatique. Ces complexes sont ensuite incubés avec le substrat approprié et la réaction enzymatique peut être visualisée ou mesurée au spectrophotomètre.

Cette technique, relativement récente mais déjà largement utilisée dans le domaine parasitologique, présente encore des difficultés de diagnostic pour l'Onchocercose. Bartlett et al. (1975) , Ambroise-Thomas et al. (1980) et Speiser (1980) soulignent la nécessité de travailler avec des antigènes homologues purifiés, débarrassés en particulier des protéines d'origine humaine. Cependant, même en utilisant des antigènes somatiques dans ce test d'une grande sensibilité, on n'élimine pas le problème des réactions croisées.

f) L'intradermoréaction : elle consiste à introduire l'antigène directement dans la peau du patient. Si des anticorps réagissent avec cet antigène, on assiste après 15 minutes à une manifestation clinique locale (réaction d'hypersensibilité) au point d'inoculation de l'antigène. Etant de réalisation facile, ce test se prête très bien

aux études épidémiologiques et a été de loin le plus utilisé. Il présente pourtant quelques failles et de nombreux auteurs critiquent son manque de sensibilité et de spécificité (Gidel et al., 1969 ; Vernes A., 1975).

g) Les techniques radioimmunologiques : il s'agit en particulier du RAST (radioallergosorbent test). Ce test consiste à détecter les anticorps de classe IgE dirigés contre un antigène que l'on couple à la Sépharose activée au CNBr. Ce n'est que très récemment que ce test a été appliqué à l'Onchocercose (Somorin et Heiner, 1976 ; Weiss et al., 1981 et 1982) avec des antigènes homologues et hétérologues. Les résultats montrent que les réactions croisées sont significativement moins importantes lorsque l'on dose les IgE comparativement aux IgG.

III. CONCLUSION

Le diagnostic de l'Onhocercose nécessite dans l'absolu, une technique sensible, reproductible, utilisable en pratique de masse, spécifique des Filarioses - et si possible de l'Onchocercose - et indicative de la charge parasitaire active. De plus, les vastes programmes entrepris par l'Organisation Mondiale de la Santé pour la Lutte contre le vecteur réclament un diagnostic de l'Onchocercose dans sa période pré-patente, de manière à empêcher la réinfection ses simulies. Compte-tenu du manque de spécificité, de sensibilité et/ou de la difficulté d'obtention de l'antigène homologue, il est apparent qu'aucune des techniques décrites précédemment ne satisfait totalement ces exigences. Certes, la découverte et l'identification de microfilaires constitue toujours une preuve de diagnostic absolu mais les risques de faux négatifs sont trop importants, d'où la nécessité de compléter cette identification par un diagnostic immunologique. L'immunologie en général est un domaine qui progresse beaucoup

et où les tests de sérodiagnostic sont constamment améliorés. Il est regrettable de constater que malgré cette avance technologique importante, le diagnostic immunologique des Filarioses est lourdement hypothéqué par l'impossibilité d'un diagnostic précoce et par l'existence de nombreuses réactions croisées non spécifiques. Deux faits sont à la base de ces problèmes : d'une part, l'importante communauté antigénique existant au sein des Nématodes, et d'autre part le fait que tous les tests de sérodiagnostic appliqués jusqu'alors à l'Onchocercose soient basés sur la détection d'anticorps en circulation. En effet, les conditions d'apparition et de persistance des anticorps spécifiques sont loin d'être univoques et varient très largement d'un sujet à l'autre. Dans l'ensemble, ces anticorps n'apparaissent qu'après un certain délai et, inversement, peuvent persister pendant plusieurs mois, voire même plusieurs années, dans les Filarioses guéries. De plus, la formation d'anticorps circulants est par ailleurs la résultante d'un double phénomène d'immunisation et d'immunodépression. Enfin, seules sont dosables par les méthodes disponibles, les immunoglobulines spécifiques qui restent en excès dans le sérum. Cependant, une proportion vraisemblablement importante des anticorps sériques est fixée in vivo sur les filaires adultes ou sur les microfilaires, une autre partie étant masquée au moins partiellement dans les complexes immuns circulants.

Ces observations ont donc orienté nos recherches en sérodiagnostic, non plus vers la détection d'anticorps, mais vers celle d'antigènes circulants.

CHAPITRE II

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE SUR

LES ANTIGÈNES PARASITAIRES CIRCULANTS

I - DONNEES GENERALES

Un antigène est une substance capable de réactions spécifiques avec les cellules lymphoïdes ou les anticorps. Il est immunogène lorsqu'il induit une hypersensibilité et/ou une production d'anticorps. On le dit tolérogène lorsqu'il induit une tolérance spécifique.

On peut donc définir un antigène circulant comme une substance soluble, libérée dans la circulation et possédant les propriétés d'antigénicité.

Pendant les différents stades de son développement, le parasite (L_3, adultes, L_1) libère des substances solubles susceptibles d'être des antigènes circulants. On peut citer par exemples :

- des enzymes, qui pourraient notamment permettre la migration du parasite dans les tissus
- des métabolites, résultant de la respiration et de la nutrition du parasite
- des substances d'excrétion
- des "hormones"; leur sécrétion peut être invoquée pour expliquer le tropisme sexuel rapprochant *in vivo* les vers mâles des vers femelles
- des produits de l'ovogénèse. Il semblerait, en effet, que lors de la libération des microfilaires, le liquide contenu dans l'utérus soit également libéré. Ce liquide contient probablement les débris des cuticules d'oeufs, ainsi que toutes les substances liées à la maturation et à l'éclosion de l'oeuf *in utero*
- du matériel libéré par la lyse parasitaire.

Ces substances solubles métaboliques qui, pour la plupart, sont continuellement libérées par le parasite, semblent refléter la présence d'une infection active ; elles peuvent en outre donner une indication de la charge parasitaire, ou de la destruction in vivo.

Il existe également des substances solubles d'origine somatique qui résultent de la lyse du parasite. Ceci est surtout le cas des larves infestantes (L_3) et les microfilaires (L_1) qui peuvent être bloquées dans les tissus et tuées in situ. Le cas est plus rare pour les vers adultes qui ont une durée de vie de 10 à 15 ans et sont dans les onchocercomes. La présence de ces antigènes somatiques dans la circulation est considérablement agumentée après un traitement thérapeutique, ainsi que l'ont montré Dodin et al. (1965) dans la schistosomiase et Greene et al. (1980) dans l'Onchocercose, par le biais de l'identification des complexes immuns circulants.

Le nombre de substances d'origine parasitaire que l'on peut retrouver en circulation est considérable. Cependant, elles ne sont peut-être pas toutes antigéniques, immunogènes ou tolérogènes. De surcroît, il est probable qu'une grande partie de ces substances s'associe à d'autres molécules du milieu biologique où sont complexés les anticorps.

On peut envisager que ces substances en circulation dans le sérum des hôtes infectés se retrouvent également dans les urines et dans le lait.

Jusqu'à présent, on a porté un grand intérêt à l'étude de ces antigènes solubles qui peuvent être isolés à partir de culture in vitro de parasites en vue de les utiliser pour la détection d'anticorps circulants dans le sérodiagnostic. De nombreux travaux réalisés dans ce domaine ont été analysés par de Savigny (1979). Cependant, la détection in vivo de ces antigènes circulants, leur intérêt pour le diagnostic, leur rôle dans la pathologie et dans la réponse immune reste pour l'instant un domaine peu

étudié et mal connu.

II - ETUDES DES ANTIGENES CIRCULANTS DANS LES PARASITOSES

Des études ont été réalisées sur différentes parasitoses pour tenter d'identifier l'origine, la nature et les effets possibles de ces antigènes sur la réponse immune. Divers tests ont été mis au point pour détecter ces antigènes circulants.

Bien qu'il existe des différences très importantes entre les protozoaires et les helminthes, les ouvrages les plus représentatifs réalisés au sujet des antigènes circulants sur les diverses parasitoses seront examinés dans les paragraphes suivants.

1 - Les Protozoaires

Dans la malaria, les parasites au stade intraérythrocytaire, lors de leur libération dans le sérum, constituent un matériel potentiellement antigénique. Wilson et al. (1975) ont démontré la présence de telles substances antigéniques dans le sérum. Ils classent ces différentes substances selon leur thermostabilité et constatent que lors d'une étude épidémiologique réalisée sur des enfants, seul l'antigène-S (thermostable à 100°C) peut être mis en évidence. Comme des anticorps contre l'antigène L (thermolabile) sont présents chez de tels enfants, il est probable que l'antigène est complexé et ne peut plus être détecté dans la circulation. Il n'existe, à notre connaissance, aucune publication précisant l'origine et la localisation de ces antigènes. De plus, aucune étude n'a été réalisée dans le but de comparer ces antigènes entre différentes espèces de Plasmodium.

Les travaux de Mackey et al. (1980) ont permis la mise au point d'un test d'inhibition d'un dosage radioimmunologique pour la détection de l'antigène de Plasmodium berghei. Ce test est très sensible mais il détecte les parasites intraérythrocytaires après la lyse des globules rouges.

Dans les leishmanioses, un facteur EF ("excreted factor") a été isolé à partir de cultures in vitro de parasite. Ce facteur EF se retrouve sur des tissus infectés par des amastigotes (Hommel, 1977) et sur des macrophages en co-culture in vitro avec les parasites Leishmania ou Trypanosoma (Baker et Green, 1977). Cependant, ce facteur EF n'a pas encore été mis en évidence dans la circulation de patients atteints de leismaniose ou de trypanosomiase.

Dans la toxoplasmose, la démonstration d'antigènes circulants a été réalisée chez la souris et le lapin par électrophorèse à contre-courant et par diffusion en gel d'agarose (Raizman et Neva, 1975). Deux ans plus tard, van Knapen et Panggabean (1977) exploitaient ces résultats en mettant au point un test de diagnostic de la toxoplasmose par la détection d'antigènes circulants en utilisant une technique d'immunoenzymologie (ELISA). Il est intéressant de noter que les antigènes ainsi détectés ne sont présents que pendant une courte période (la phase active) qu'il s'agisse d'une infection ou d'une réinfection.

2 - Les Trématodes

C'est dans le domaine de la schistosomiase que la bibliographie sur les antigènes circulants est la plus fournie et que les études les plus approfondies ont été réalisées. La présence d'antigènes circulants a été démontrée dans le sérum (Gold et al., 1969 ; Nash et al., 1974 et Deelder et al., 1976) dans les urines (Okabe et Tanaka, 1961 ; Carlier et al., 1975

et Deelder et al., 1976) et également dans le lait (Santoro et al., 1977b) de patients atteints de schistosomiase. L'origine de cet antigène reste incertaine bien que plusieurs auteurs (Nash et al., 1974 ; Deelder et al., 1976 et Santoro et al., 1977b) le mettent en évidence au niveau du caecum du ver adulte. Ceci concorde avec les nombreux travaux (voir de Savigny, 1979) relatant l'antigénicité et même parfois l'immunogénicité des antigènes d'excrétion et de sécrétion obtenus à partir de culture in vitro.

Les différents auteurs s'accordent sur la nature polysaccharidique de l'antigène circulant qu'ils décrivent, mais il existe cependant des différences au niveau du poids moléculaire, de la vitesse de migration électrophorétique et de la stabilité à la chaleur. Cette discordance peut indiquer la présence, non pas d'une seule entité antigénique, mais d'un mélange complexe de substances d'origine parasitaire. Ainsi, les antigènes circulants décrits par les différents auteurs mentionnés plus haut seraient des molécules différentes, ce qui expliquerait pourquoi certains les détectent dans le sérum mais pas dans les urines, et vice-versa. Une étude plus récente de Deelder et al. (1980) met d'ailleurs en évidence et caractérise deux antigènes circulants de nature polysaccharidique ; tous deux semblent être des produits de sécrétion et d'excrétion du vers adulte mais on ne retrouve qu'un seul de ces antigènes dans les urines de hamsters infestés.

Santoro et al. (1978) mettent au point un dosage radioimmunologique (RIPEGA) qui leur permet de quantifier les antigènes circulants dans la schistosomiase à l'aide d'un sérum de lapin anti-S. mansoni. Dans la schistosomiase humaine, Santoro et al. (1980) mettent en évidence une corrélation entre le nombre d'oeufs passés dans les selles et le taux d'antigènes circulants et de complexes immuns. Ils suggèrent qu'il y a

une relation directe entre les antigènes circulants détectés par le RIPEGA et la charge parasitaire. Une telle corrélation avait déjà été faite entre l'antigène "M" détecté dans l'urine de patients et le nombre d'oeufs de S. mansoni dans les selles (Carlier et al., 1975). Ces travaux et ceux de Bout et al. (1977) montrent que ces antigènes circulants sont immunogènes et entraînent la formation de complexes immuns. Il est également possible que les antigènes circulants ou les complexes immuns entraînent une tolérance immunitaire (Hang et al., 1974 et revue générale, WHO, 1977).

3 - Les Nématodes

La présence d'antigènes circulants dans le sérum a été mis en évidence dans le cas d'infections par Haemonchus contortus et par Trichinella spiralis (voir Wilson, 1974). D'importants travaux ont également été réalisés par Jenkins et Wakelin (1977) sur Trichuris muris montrant l'antigénicité et l'immunogénicité de substances histolytiques sécrétées lors de la pénétration dans la muqueuse du parasite.

Dans le cas des filarioses, la majorité des travaux portent sur la détection et l'étude des complexes immuns. On peut ainsi citer les travaux de Karavodin et Ash (1980 et 1981) démontrant la présence de complexes immuns chez le mérion (Meriones unguiculatus) infecté avec Brugia pahangi, le modèle expérimental le plus proche des filarioses lymphatiques humaines (W. bancrofti et B. malayi). Ils n'observent aucune corrélation entre les taux de complexes immuns et le nombre de microfilaires dans la circulation. Une étude longitudinale montre que les taux de complexes immuns passent par deux maximum au cours de l'infection. Le premier pourrait être lié à une augmentation des antigènes circulants

tels que des substances métaboliques et somatiques de L_3 suivant leur évolution dans les tissus, leurs mues ou leur mort. Le second reflèterait plutôt une réaction de l'hôte contre l'augmentation de produits provenant des adultes et des microfilaires. Bien que ces observations soient faites dans le cas d'une filariose expérimentale et que les organismes ne soient pas, comme dans la nature, constamment confrontés aux antigènes de L_3, ces études montrent qu'il y a formation d'anticorps contre des antigènes solubles différents.

Pour ce qui concerne l'Onchocercose, des complexes immuns ont été mis en évidence dans le sérum par plusieurs auteurs (Lambert et al., 1978 ; Paganelli et al., 1980 ; Guerra-Caceres et al., 1980 ; Green et al., 1980 et Steward et al., 1982) mais une certaine discordance règne quant à l'identification de la classe d'immunoglobuline impliquée. Par exemple, les travaux très récents de Steward et al. (1982) montrent l'implication des IgM, des IgG et plus rarement des IgE dans les complexes. Par contre, Paganelli et al. (1980) ne démontrent la présence que d'IgM. Cette discordance s'explique d'une part par la diversité des réactifs utilisés (anti IgG, anti IgM ou anti IgE) et d'autre part par le fait que les techniques de dosages de complexes immuns utilisées ne mesurent pas uniquement les complexes immuns spécifiques de l'Onchocercose. Ces remarques sont renforcées par les observations de Stewart et al. (1982) qui indiquent que le taux de complexes immuns est significativement plus élevé chez les sujets sains originaires du Soudan que chez ceux de sujets britanniques.

Parallèlement à ces travaux réalisés sur les complexes immuns, quelques études sont consacrées à la mise en évidence et au dosage d'antigènes circulants dans les filarioses. Cette voie de recherche a été ouverte par la suggestion de Franks en 1946 que des antigènes en

circulation dans le sérum pouvaient interférer avec le dosage des anticorps. Ce n'est malheureusement que beaucoup plus tardivement que les travaux de Ngu et Blackett en 1976 confirmèrent cette hypothèse indirectement par le biais des complexes immuns. Dasgupta et Shukal Bala (1978) démontrèrent la présence d'antigènes filariens dans le sérum de patients en utilisant un anti-sérum contre la filaire expérimentale Litomosoides carinii. Les travaux de Kaliraj et al. (1979) permettent la détection d'antigènes circulants dans quelques cas de Wuchereriose à microfilaraemie positive à l'aide d'un sérum de lapin anti-microfilaires. C'est finalement en utilisant les immunoglobulines d'un sérum humain infecté par Wuchereria bancrofti que Kaliraj et al. (1981) obtiennent la meilleure détection d'antigènes circulants dans les sérums de patients. Ils utilisent l'immunoélectrophorèse à contre courant et obtiennent des résultats positifs dans 23 des 30 cas à microfilaraemie positive, mais dans un seul des 30 cas de filariose clinique. L'immunoglobuline active de ce sérum est de classe IgG.

Les seuls travaux concernant la détection d'antigènes circulants dans l'Onchocercose ont été réalisés dans notre laboratoire par Ouaissi et al. (1981). Pour cela, un anti-sérum de lapin immunisé avec un antigène soluble d'O. volvulus a été utilisé. L'immunoélectrophorèse permet de détecter l'antigène circulant dans 31 % des cas. Cependant, avec une technique radioimmunologique plus sensible, on le détecte dans 75 % des patients onchocerquiens. Cette technique très sensible manque cependant de spécificité car des réactions croisées importantes sont obtenues avec d'autres filarioses humaines. L'outil particulier que représentent les anticorps monoclonaux semble être un bon candidat pour pallier à ces problèmes de réaction croisée. De plus, par leur homogénéité, les anticorps monoclonaux s'avèrent être un outil de choix pour le

sérodiagnostic, comme le montrent les travaux de Araujo et al. (1980) sur la détection d'antigènes circulants de Toxoplasma gondii par un anticorps monoclonal.

Ce travail a donc pour but la production d'anticorps monoclonaux anti-O. volvulus et leur utilisation pour la détection des antigènes circulants dans les sérums de patients onchocerquiens. La valeur d'un tel test pour un éventuel diagnostic immunologique de l'Onchocercose est discutée.

CHAPITRE III

L'HYBRIDATION CELLULAIRE POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

I - DEFINITION ET INTRODUCTION

L'hybridation cellulaire consiste à fusionner deux cellules différentes pour former une entité cellulaire possédant la totalité ou une partie du matériel génétique des deux cellules d'origine. La cellule hybride ainsi formée, ou hybridome peut exprimer simultanément les propriétés biologiques des deux cellules "parentales".

On peut donc, par cette technique, envisager la fusion entre un plasmocyte, cellule productrice d'anticorps, et une cellule myélomateuse possédant la propriété de se multiplier *in vitro* de façon exponentielle. Dans les cas favorables, l'hybridome formé conservera ces deux propriétés et donnera lieu à une population cellulaire croissante produisant des anticorps monoclonaux. Ces anticorps monoclonaux qui, par définition, sont synthétisés par un seul clone cellulaire, sont dirigés contre un même déterminant antigénique et forment par conséquent une population d'immunoglobulinique homogène.

Des anticorps monoclonaux peuvent également être obtenus suite à la transformation en lignées continues de lymphocytes B par le virus Epstein-Barr (Steinitz *et al.*, 1977). Cette technique qui conserve les caractéristiques des cellules B ainsi immortalisées, permet de travailler à partir de cellules humaines. Cependant, le rendement est faible, les anticorps sécrétés sont bien souvent de faible affinité et la production massive d'anticorps monoclonaux est moins fructueuse que par le biais de l'hybridation cellulaire.

En fait il existe, tant chez l'homme que chez l'animal, une très grande hétérogénéité moléculaire des immunoglobulines. Lorsqu'on injecte un agent immunogène à un animal, celui-ci répond en fabriquant différents anticorps dirigés contre les différentes molécules antigéniques de la substance injectée. Il est pratiquement impossible de séparer ces différents anticorps de sorte que les antisérums conventionnels contiennent un mélange d'anticorps variant d'un animal à l'autre. Ceci présente un très grand handicap pour le sérodiagnostic surtout au niveau de la standardisation des tests, et il est probable que les anticorps monoclonaux vont révolutionner ce domaine dans un futur proche.

II - LA FUSION CELLULAIRE

La découverte de l'hybride cellulaire remonte à 1960 avec les travaux de Barski, mais ce n'est qu'en 1975 qu'elle fut appliquée à l'immunologie par Köhler et Milstein.

1 - Les cellules

a) les cellules immunes

Elles proviennent de la rate, des ganglions ou du sang. Le choix dépend principalement du modèle expérimental, de la localisation particulière de certaines populations lymphocytaires, ou encore de la facilité d'obtention d'une grande quantité de cellules immunes. Anderson et Melchers (1978) ont montré, en stimulant les cellules par du LPS, que les cellules blastiques sont plus sensibles à la fusion que les petits lymphocytes (cellules au terme de leur évolution).

TABLEAU 1

Principales souches myélomateuses utilisées pour la fusion

Lignée cellulaire	Origine	Production immunoglobulinique chaîne lourde	chaîne légère	Référence
P_3-X63-Ag 8	Souris	+	+	KOHLER et al. (1975)
MSI/1-Ag. 4.1	Souris	-	+ (*)	KOHLER et al. (1976)
SP2/0-Ag. 1.4	Souris	-	-	SHULMAN et al. (1978)
Y_3 Ag. 1.2.3	Rat	-	+	GALFRE et al. (1979)
IR 983 F	Rat	-	-	BAZIN et al. (1980)
U 266 AR_1	Homme	+	+	OLSSON et al. (1980)

(*) Produite mais non sécrétée.

b) les cellules myélomateuses

Depuis les travaux de Köhler et Milstein (1975) de nombreuses souches myélomateuses ont été exploitées pour leur capacité de fusion. L'origine et les caractéristiques de ces cellules sont résumées dans le Tableau 1.

2 - Les agents fusogènes

La fusion spontanée entre cellules est très rare d'où la nécessité d'utiliser des agents fusogènes.

a) Le virus de Sendai inactivé

Les premiers travaux montrant le rôle fusogène du virus de Sendai inactivé sont ceux de Harris et Watkins (1965). Ils n'obtiennent pas de cellules hybrides viables mais cet échec s'explique par le choix des cellules et non pas par l'utilisation du virus.

Les premiers hybrides viables induits par le virus de Sendai inactivé sont décrits par Yerganian et Nell (1966), puis Coon et Weiss(1969) qui définissent les conditions optimales d'obtention d'un rendement de fusion élevé. Dans leurs expériences, le taux d'hybridation est multiplié par un facteur de 100 par rapport au taux de fusion spontanée.

Cependant, l'utilisation du virus de Sendai comme agent fusogène présente plusieurs inconvénients :

- la préparation et le maintien de la souche virale sont délicats.
- l'activité des différentes préparations virales est très variable.
- le traitement par le virus est infectant pour certains types cellulaires.
- l'introduction d'une information dans le génome cellulaire n'est pas exclue.

b) Les agents chimiques

Les problèmes posés par l'utilisation du virus de Sendai ont poussé les recherches vers l'obtention d'un agent fusogène chimique. Ahkong et al. (1975) ont étudié notamment l'effet fusogène du diméthyl sulphoxide (DMSO) et du glycérol. Pontecorvo (1975) montre que l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG) comme agent de la fusion cellulaire permet l'obtention de nombreux hybrides cellulaires. Peu après, Davidson et Gerald (1976) définissaient les paramètres de la fusion cellulaire par le PEG.

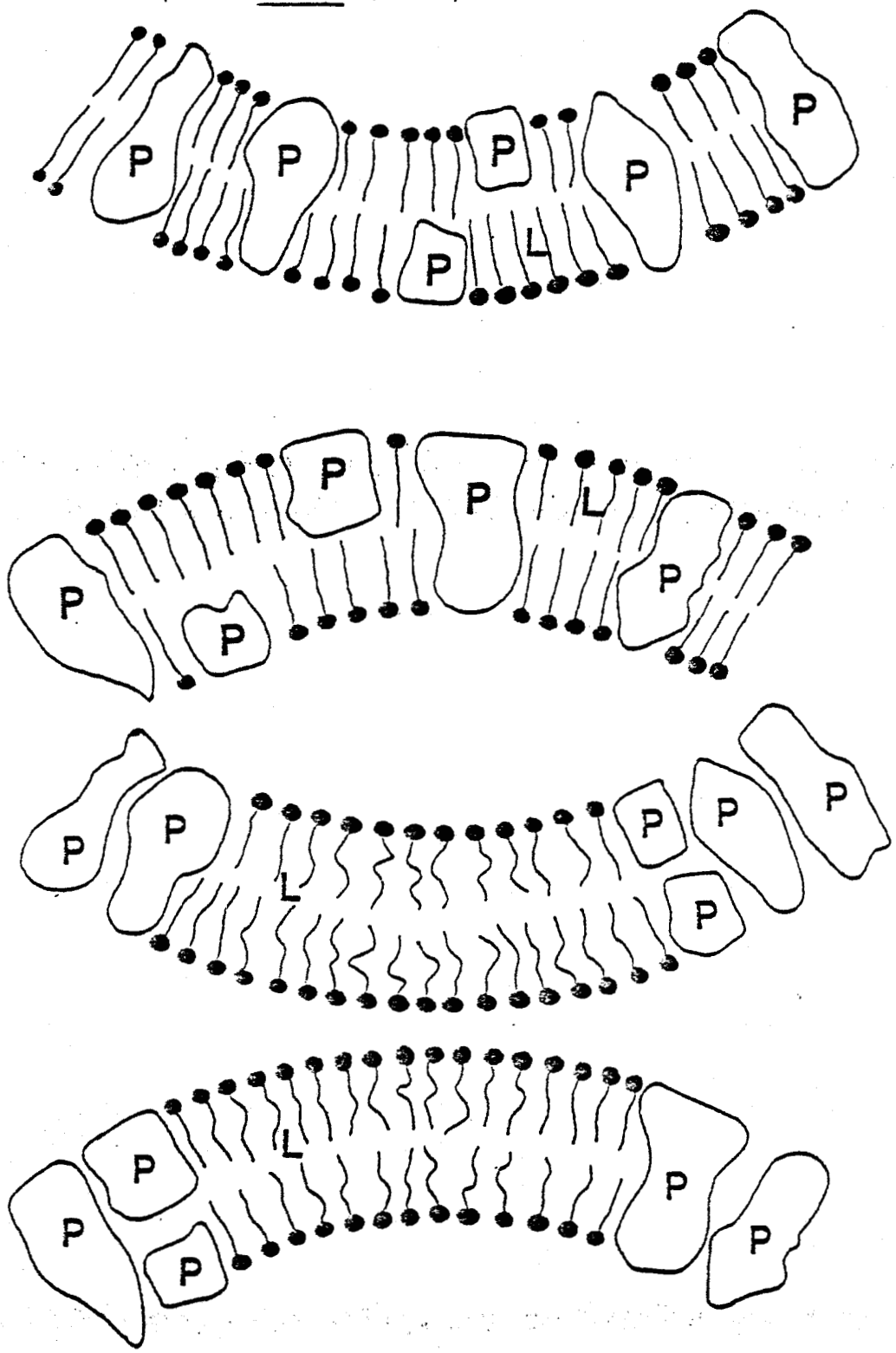
3 - Le mécanisme

Le mécanisme de fusion cellulaire est encore mal connu. Les principales observations ont été faites au niveau membranaire. Ahkong et al. (1975) proposent le schéma suivant pour expliquer l'action fusogène de substances chimiques telles que le PEG (Fig. 2).

Dans un premier temps, les agents de fusion chimiques entraînent une fluidification des deux couches lipidiques membranaires. Ceci est suivi par une agglutination des protéines de membrane. Lorsque deux cellules présentant ce même phénomène sont en contact, la fusion membranaire s'amorce. Un réarrangement des feuillets lipidiques des deux cellules s'opère, conduisant à une fusion localisée. La généralisation de la fusion se fait par l'intermédiaire du gradient osmotique intracellulaire.

Des fusions localisées induites par le virus de Sendai ont été observées au microscope électronique par Toister et Loyter (1973). Les travaux de Sekiguchi et al. (1981) apportent des renseignements plus précis sur cette fusion. Ils montrent que l'activité du virus est associée à 2 glycoprotéines virales : la glycoprotéine HANA portant une activité neuraminidasique qui permet l'agglutination cellulaire, et la glycoprotéine F qui est responsable de la fusion cellulaire localisée. La phase suivante de généralisation de la fusion qui dépend essentiellement du gradient osmotique intracellulaire est inhibée par des concentrations extracellulaires élevées en sérumalbumine.

FIGURE 2 : FUSION CELLULAIRE INDUITE PAR LES AGENTS FUSOGENES CHIMIQUES (AKONG et al. ., 1975)



BUS LILLE

Les agents fusogènes chimiques entrainent une désorganisation des feuillets lipidiques membranaires (L) qui favorise l'agglutination des protéines de membrane (P).

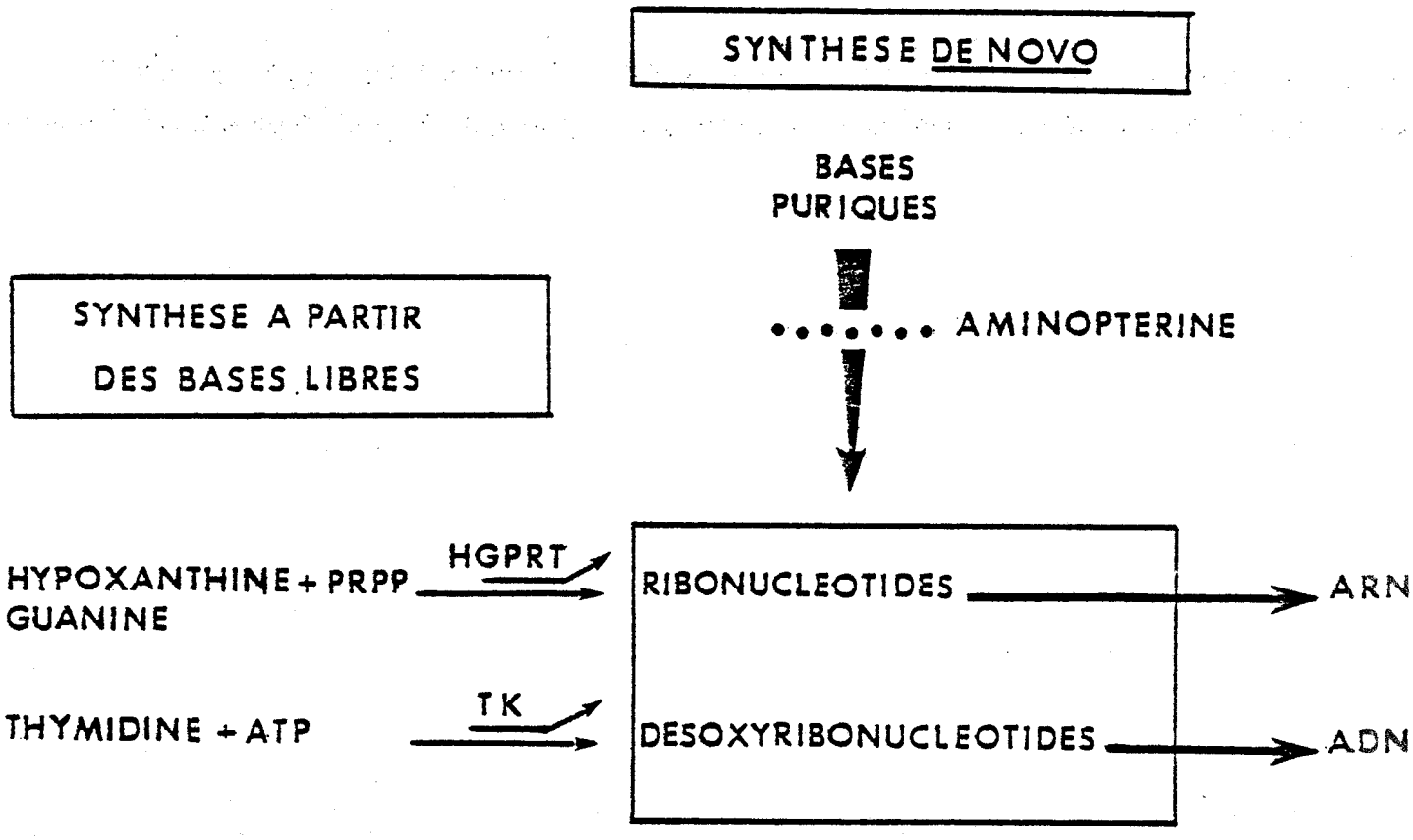
Les membranes ainsi désorganisées deviennent plus fluides et permettent une fusion locale des deux cellules voisines par réarrangement intermembranaire des feuillets lipidiques perturbés.

4 - La sélection des hybrides

Aucune sélection n'est à envisager vis-à-vis des cellules immunes du fait de leur inaptitude à proliférer *in vitro*. Il faut cependant empêcher la multiplication des cellules de myélomes de telle manière que seuls les hybrides cellulaires se développent. Ce sont les travaux de Littlefield (1964) qui ont permis d'obtenir un tel système de sélection.

Le système de Littlefield repose sur le fait que les cellules de mammifères possèdent deux voies de synthèse des nucléotides (Fig. 3) : soit une synthèse de novo à partir de sucres et d'acides aminés, soit une voie de synthèse utilisant des nucléotides préformés, l'hypoxanthine et la thymidine. La synthèse de novo est bloquée par la présence d'aminopterine ; l'autre voie de synthèse nécessite quant à elle la présence des enzymes hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) et Thymidine kinase (TK). Or, Littlefield a isolé, à partir d'une souche hétéroploïde de souris, deux sous-lignées cellulaires respectivement déficientes en HGPRT et en TK. Ces déficiences mettent en corrélation respectivement une résistance à la 8-Azaguanine et la 5-bromodésoxyuridine. En fusionnant ces deux sous-lignées cellulaires, seuls les hybrides possédant par complémentation des deux génomes parentaux la TK et la HGPRT, peuvent se développer dans un milieu sélectif HAT (Hypoxanthine - Aminopterine - Thymidine). En résumé, il suffit donc

FIGURE 3 : BIOSYNTHESE DES ACIDES NUCLEIQUES, ROLE DE L'AMINOPTERINE (LITTLEFIELD, 1964)



BUS LILLE

que la lignée cellulaire myélomateuse utilisée soit déficiente en HGPRT ou en TK pour que la sélection des hybrides s'effectue en milieu HAT.

5 - La stabilité des hybrides

Au premier stade de leur prolifération, les cellules hybrides perdent une partie de leurs chromosomes. La stabilité des hybrides dépend essentiellement de l'homogénéité du système d'hybridation. Dans le système souris x souris, la perte chromosomique est très lente ; après 100 générations, on constate généralement une perte de 10 à 20 m des chromosomes initiaux, puis le caryotype cellulaire se stabilise (Ephrussi et Sorieul, 1962 ; Ephrussi, 1964 ; Ephrussi et al., 1964). La perte de chromosomes ne s'effectue pas d'une manière aléatoire et dans les hybrides interspécifiques on observe une perte préférentielle de chromosomes d'une des deux espèces. C'est le cas pour les chromosomes de rat dans les hybrides rat x souris (Weiss et Ephru-si, 1966) et pour ceux de souris dans les hybrides souris x hamster (Scaletta et Ephrussi, 1965). Cette perte chromosomique se limite en général à 10 - 20 % du total des chromosome. Une exception cependant, les hybrides homme x souris, particulièrement instables. En effet, Weiss et Green (1967) signalent qu'après 20 générations, il ne reste que de 2 à 15 chromosomes humains et qu'à la suite de la stabilisation des hybrides, 100 générations plus tard, les hybrides ne contiennent plus que 1 à 3 chromosomes humains. Ce sont généralement les mêmes chromosomes humains qui sont conservés.

Ce mécanisme de déstabilisation des hybrides est encore mal connu. Il pourrait résulter d'un manque de coordination dans la transmission des génomes parentaux aux cellules filles lors de la mitose.

III - LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les premières expériences conduisant à la production d'anticorps monoclonaux sont celles de Kölher et Milstein (1975). Ils hybrident des B lymphocytes de souris immunisées par une suspension de globules rouges de mouton et des cellules de la lignée myélomateuse P3 x 63 Ag 8. Ils obtiennent des cellules hybrides dont certaines synthétisent des anticorps spécifiques du globule rouge de mouton, démontrant ainsi que le génome lymphocytaire s'exprime dans les cellules hybrides néoformées. De plus, ces cellules hybrides possédant la capacité de multiplication *in vitro* des cellules myélomateuses, représentent une source abondante d'anticorps monoclonaux.

La lignée myélomateuse P3 x 63 Ag 8 sécrète une immunoglobuline (chaines légères et chaines lourdes). Par conséquent, les cellules hybrides vont sécréter des hybrides moléculaires, mélangeant les chaînes lourdes et les chaînes légères du myélome et du B lymphocyte. Pour augmenter les chances d'obtenir des hybrides exprimant le génome des B lymphocytes il est donc préférable d'utiliser une lignée cellulaire n'exprimant aucune immunoglobuline.

1 - Le clonage

Le clonage des cellules hybrides permet l'établissement d'un véritable clone d'hybride. En effet, dans la majorité des cas, les populations cellulaires hybrides sélectionnées par le milieu HAT sont issues de plusieurs hybrides initiaux possédant des potentialités synthétiques diverses. Pour assurer la monoclonalité des anticorps produits il est nécessaire de cloner les hybrides de façon à obtenir une population cellulaire issue d'un seul hybride. Les clones produisant des anticorps de la spécificité

recherchée peuvent avoir un pouvoir de multiplication moins important que les clones négatifs. Par conséquent, pour éviter la perte de ces clones positifs parmi les négatifs, il est important de réaliser le clonage rapidement après la sélection.

Le clonage peut être réalisé sur agarose si le test de dépistage des anticorps spécifiques peut se faire in situ. Si, par contre, ce test nécessite le surnageant de culture il est préférable d'utiliser la technique de dilution limite.

2 - La production massive d'anticorps monoclonaux

La production massive d'anticorps monoclonaux peut être envisagée sous deux aspects :

- la culture massive in vitro
- la production d'ascite in vivo

a) La culture massive in vitro

Les hybrides cellulaires gardent la propriété du myélome de se multiplier rapidement in vitro. Cela permet la culture massive des hybridomes qui synthétisent des anticorps monoclonaux et les sécrètent dans le milieu de culture. Dans les conditions idéales de culture, certaines lignées cellulaires peuvent produire jusqu'à 50 ou même 100 µg de protéines monoclonales par millilitre. Cependant, la production d'anticorps varie suivant les lignées cellulaires et on observe beaucoup plus souvent des concentrations de l'ordre du microgramme par millilitre.

Le surnageant de telles cultures de masse constitue un matériel abondant à partir duquel les anticorps monoclonaux peuvent être isolés.

Cette technique de culture de masse est utilisée surtout pour les hybrides hétérologues qui ne peuvent être injectés à l'animal.

b) La production d'ascite in vivo

La production d'ascite in vivo se base sur le fait que les cellules hybrides acquièrent la propriété tumorigénique des cellules myélomateuses. Les cellules hybrides injectées par voie intrapéritonéale à un animal histocompatible ou incapable de rejeter les hybrides (athymique ou nu/nu) entrainent le développement d'une tumeur intrapéritonéale. Cette tumeur conduit à la production d'un liquide d'ascite riche en anticorps monoclonaux.

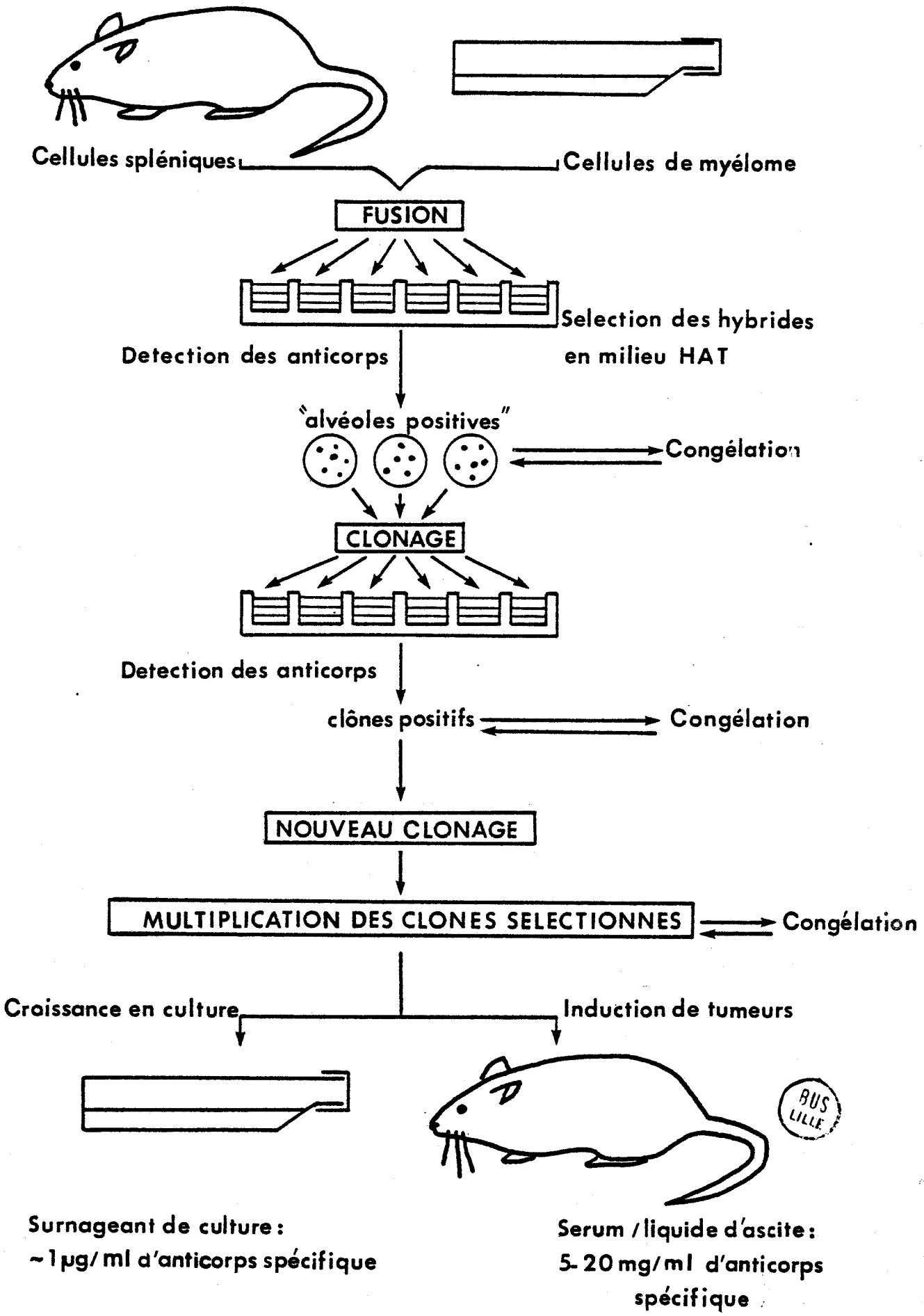
Cette technique est plus fructueuse que la précédente : en effet les concentrations en anticorps monoclonaux sont 10 à 1000 fois supérieures à celles observées dans les surnageants de culture cellulaire.

IV - CONCLUSION

Pour conclure ce chapitre, résumons schématiquement les différentes étapes présidant à la production d'un clone cellulaire hybride producteur d'anticorps monoclonaux (Figure 4).

L'utilisation d'anticorps polyclonaux pour le diagnostic est depuis des années d'une grande utilité. Cependant, au fur et à mesure de l'évolution des techniques et de l'amélioration des réactifs, les limitations des anticorps polyclonaux se font sentir :

FIGURE 4 : PROTOCOLE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX



BUS LILLE

. les antigènes non purifiés entrainent une grande hétérogénéité au niveau des anticorps produits ce qui nécessite une purification des antisérums

. les résultats des immunisations sont imprévisibles car ils varient d'un animal à l'autre, et par conséquent difficilement reproductibles

. les antisérums ou les hyperimmunsérums sont très hétérogènes au niveau de leurs avidités , des réactions croisées et de leurs fonctions effectrices

. il est difficile de produire de grandes quantités d'un antisérum donné.

Les anticorps monoclonaux semblent pouvoir pallier à certaines de ces limitations :

. on peut produire des anticorps monoclonaux en immunisant avec seulement quelques microgrammes d'un antigène non purifié

. on peut obtenir des quantités pratiquement illimitées

. on obtient un réactif homogène et stable qui peut ainsi donner des résultats identiques à des moments différents et dans des lieux variés.

La technique d'obtention et de sélection d'hybrides cellulaires produisant des anticorps monoclonaux de spécificité donnée est relativement lourde et onéreuse. Cependant, une fois l'hybride obtenu, le maintien de la souche et la production proprement dite d'anticorps monoclonaux est simple et peu coûteuse.

Quelques problèmes subsistent néanmoins dans cette nouvelle technologie. On peut noter, par exemple, la grande part laissée au hasard au niveau de la fusion cellulaire et de la stabilité des hybrides.

Ceci entraîne un manque total de reproductibilité dans les expériences d'hybridation. Des améliorations restent à faire pour augmenter la fréquence de fusion cellulaire, ou encore pour obtenir une population initiale plus riche en cellules productrices d'anticorps.

Les anticorps monoclonaux représentent un outil d'une puissance remarquable. L'industrie pharmaceutique et les fabriquants de produits scientifiques ne s'y sont pas trompés en investissant des sommes considérables dans ce domaine (Wade, 1980). De nombreux laboratoires de recherche y travaillent et la bibliographie sur ce sujet est très volumineuse. L'outil monoclonal a été utilisé dans de très nombreux domaines, cités dans des revues générales par Rowe (1980), McMichael et Bastin (1980) et Lipinski et Herzenberg (1981).

La pureté, la spécificité, la stabilité et la possibilité d'obtenir d'importantes quantités permettant une standardisation mondiale font des anticorps monoclonaux un outil de choix pour le diagnostic. Ils sont utilisés avec succès pour diagnostiquer la présence de métastases cancéreuses (Goldenberg, 1982). Un agent radioactif est fixé aux anticorps anti-cellules tumorales qui sont alors injectés au patient. Le site de fixation peut être visualisé grâce au traceur radioactif. L'anticorps monoclonal en tant que réactif biologique spécifique a été utilisé pour la caractérisation de certaines leucémies (Reinherz et al., 1980) et pour la détection prénatale du mongolisme par le biais du typage HLA (Lipinski et Herzenberg, 1981).

Des travaux sont également effectués en vue d'utiliser les anticorps monoclonaux pour l'immunodiagnostic des infections parasitaires. Un dosage radioimmunologique par méthode compétitive a été mis au point pour la mise en évidence d'infection par le Cestode Mesocestoides corti (Mitchell et al., 1979). Ces résultats montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux permet d'obtenir une bonne sensibilité et une grande spécificité

Par contre, Araujo et al. (1980) concluent que pour la détection d'antigènes de Toxoplasma gondii dans le sérum, les anticorps polyclonaux offrent des résultats plus satisfaisants que les monoclonaux. Un anticorps monoclonal dirigé contre le stade adulte de Schistosoma japonicum s'est montré d'une grande efficacité immunodiagnostique aux Philippines (Mitchel et al., 1981 ; Cruise et al., 1981). Le test utilisé se base sur une compétition entre l'anticorps monoclonal et les anticorps présents dans le sérum de patient.

Une autre approche pour l'immunodiagnostic consiste à utiliser les propriétés de réactions croisées de certains anticorps monoclonaux pour dépléter un antigène brut des déterminants antigéniques communs aux autres parasites. Ceci a été utilisé avec succès pour le parasite de l'hydatidose, Echinococcus granulosus (Craig et al., 1981). Ce genre d'approche n'en est qu'aux premiers balbutiements mais pourrait être utile dans certaines situations où les réactions croisées sont limitées et connues.

Le développement de la technique de production d'anticorps monoclonaux étant relativement récente, son application à l'immunodiagnostic n'est qu'au stade de la mise au point. L'intérêt de ces anticorps, en technique de routine et pour les études épidémiologiques sur le terrain, reste à prouver. Cependant, les quelques exemples cités plus haut laissent entrevoir le rôle fondamental que peut jouer l'outil monoclonal dans le diagnostic.

CHAPITRE IV

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - ORIGINE DES SERUMES ETUDIES

Cette étude a été réalisée sur deux populations vivant dans des régions endémiques pour l'Onchocercose.

Pour la première, il s'agit de patients Africains vivant en République du Mali et sélectionnés à l'Institut Marchoux de Bamako pour la présence de nodules. Le sérum de ces patients nous a été expédié congelé mais nous ne possédons pas de données cliniques plus précises sur ces malades.

Le deuxième population étudiée vit dans le Territoire Fédéral Amazonien du Vénézuéla. Elle est constituée uniquement d'Indiens appartenant l'éthnie Yanomamo. Cette population, vivant dans des territoires très retirés de la forêt Amazonienne, permet la réalisation d'études très importantes sur l'Onchocercose. En effet, ces indiens totalement écartés de la civilisation n'ont subi aucun traitement par des anthelminthiques. De plus, cette zone fortement endémique pour l'Onchocercose ne l'est pas pour les autres filarioses, ni pour les autres helminthiases mises à part les infections intestinales courantes (Ascaridiose, Ankylostomose). Une mission biomédicale préliminaire (Yarzabal et al., 1981) a montré que 95 % de cette population est infectée par O. volvulus que des lésions oculaires sont présentes dans 49 % des cas, des nodules dans 35 % des cas et avec la charge parasitaire moyenne est de 77 microfilaires par milligramme de peau. Des échantillons de sérums de ces indiens ont été obtenus par ponction veineuse. Une fois séparés par décantation, ils ont été filtrés sur place, stockés à +4°C pendant 3 jours avant d'être congelés à -20°C à Caracas et rapportés congelés jusqu'au CIBP (Lille).

Des échantillons d'urines fraîches ont également été obtenues. Stockés à 4°C, ils ont été transportés le jour-même au laboratoire de Caracas où ils ont été filtrés, dyalisés et lyophilisés. Deux biopsies cutanées exsangues (1 scapulaire et 1 illiaque) ont été prises sur chauqe sujet pour le diagnostic parasitologique et la détermination de la charge parasitaire. L'âge, le sexe et le nombre de nodules présents a été noté pour chaque individu étudié.

Pour l'étude des réactions croisées des sérums de sujets infectés par d'autres parasitoses ont été testés. Il s'agit de patients présentant des infections patentes confirmées par un diagnostic parasitologique et/ou immunologique.

Les sérums de patients infectés par Brugia malayi proviennent de Malaisie et ceux par Wuchereria bancrofti du Brésil. Les autes ont été obtenus dans la sérothèque du Service de Diagnostic. Les sérums d bovidés infectés par Onchocerca gutturosa, O. gibsoni et O. lienalis ont été grâcieusement envoyés d'Australie par le Docteur G.F. Mitchel.

Comme contrôles, des sérums d'Européens ont été utilisés, ainsi que ceux d'Africains montrant des tests de diagnostic parasitologique et immunologique négatifs. Il faut cependant garder à l'esprit que ces derniers ont vécu de nombreuses années dans des régions endémiques pour l'Onchocerocse.

II - LE MATERIEL PARASITAIRE

1 - Les nodules

Les nodules onchocerquiens (Photo 4) sont extraits chirurgicalement des patients, congelés sur le terrain et expédiés au laboratoire en coffrets isothermes contenant de la carboglace. Ils proviennent d'Afrique (Mali et Haute-Volta) et du Vénézuéla (Territoire Fédéral Amazonien).

2 - Les vers adultes

Les vers adultes sont obtenus par dissection des nodules et sont soigneusement lavés dans du sérum physiologique. Lors de la dissection et en grattant les parois des nodules, il est possible de recueillir des oeufs et des microfilaires qui peuvent également être utilisées pour la préparation d'antigène.

Alternativement, les nodules peuvent être digérés à la collagénase (de Clostridium histolytica, Grade II, Boehringer Mannheim) selon la méthode de Schulz-Key et al., 1977). Les vers adultes sont alors recueillis entiers (Photo 5) et lavés abondamment dans du sérum physiologique.

3 - Préparation de l'Antigène

Après lavages, les vers recueillis sont transférés dans une solution de NaCl 1 ‰. Ils sont découpés grossièrement à l'aide d'un scalpel puis broyés par 5 passages successifs à l'X-press (Bio-LKB) sous une pression de 2000 kg/cm^2). La suspension obtenue est passée aux

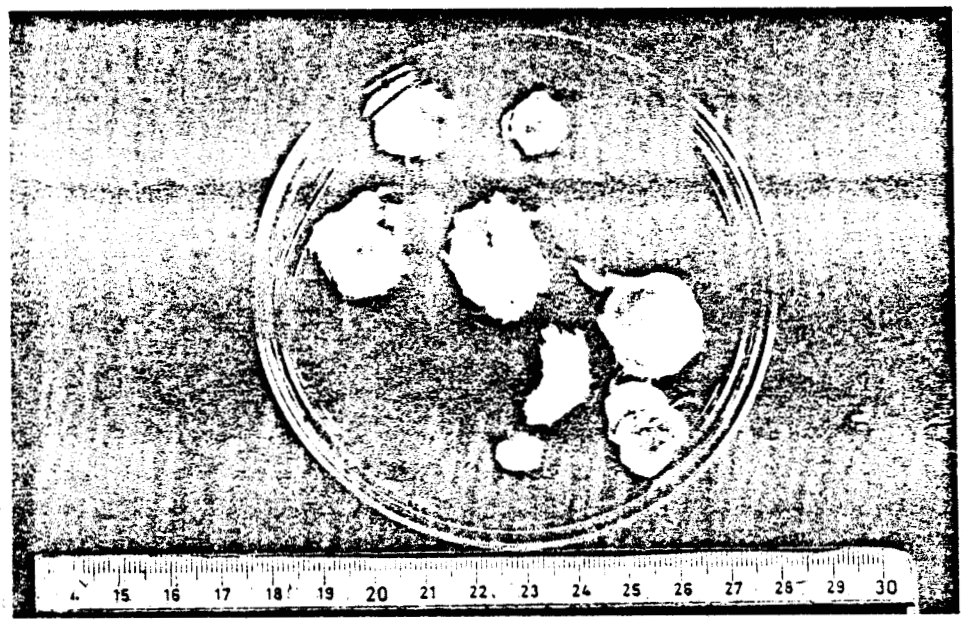


Photo 4 : Nodules onchocerquiens après leurs ablations.

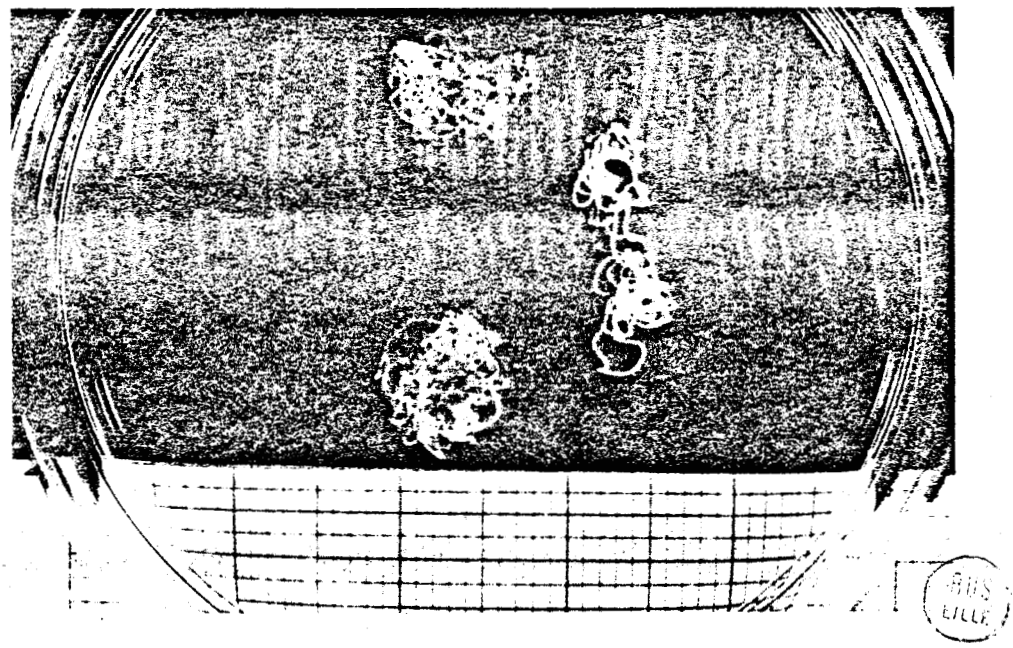


Photo 5 : Vers adultes d'Onchocerca volvulus après la digestion des nodules par la collagénase. A gauche des trois femelles entortillées sur elles-mêmes, un mâle, plus petit et raide, est représenté.

ultrasons (Braun-Sonic 125-TC4C) et centrifugée à 10,000 g pendant 1 h à 4°C. Le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 heures, puis lyophilisé. On obtient ainsi un antigène soluble que l'on désigne (Ag Ov). Cet antigène peut être débarrassé des contaminants humains par immunoabsorbtion sur billes de Sépharose activée auxquelles est couplé un sérum de cheval anti-sérum humain normal. La technique utilisée est décrite en détails par Axen et al. (1967).

A partir de cet Ag Ov, un antigène soluble dans l'acide trichloroacétique (Ag TCA) est préparé selon la technique décrite par Carlier et al. (1980). En bref, on réalise deux précipitations sur de la glace avec une concentration finale en TCA de 10 %. Après centrifugation, le surnageant et le culot sont dialysés pendant 48 heures contre de l'eau distillée, puis lyophilisés.

III - LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

1 - Les milieux de cultures

Le choix et la qualité des milieux de cultures sont des facteurs déterminants pour l'hybridation et la production d'anticorps monoclonaux qui repose essentiellement sur des techniques de culture cellulaire. La composition et l'utilisation des différents milieux de cultures employés dans notre travail sont résumés dans le Tableau 2.

2 - Les cellules nourricières

Certaines étapes délicates dans la production d'anticorps monoclonaux requièrent la présence d'un tapis de cellules nourricières. Ces étapes sont notamment la phase de sélection des hybrides après

TABLEAU 2

COMPOSITION ET UTILISATION DES MILIEUX DE CULTURE CELLULAIRE

Nature	Composition	Utilisation
Milieu A	Milieu DMEM [a] 4×10^{-3} M $NaHCO_3$ 3,5 % AANE [b] 15 % SVF [c] 100 UI/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,2 - 7,3	culture des cellules myélomateuses et hybrides
Milieu B	Milieu DMEM [d] 4×10^{-3} M $NaHCO_3$ 25 mM HEPES 100 UI/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,3	Fusion cellulaire
Milieu HAT	Milieu A contenant : 1×10^{-4} M hypoxanthine 4×10^{-4} M aminoptérine $1,6 \times 10^{-5}$ M thymidine	Sélection des hybrides cellulaires
Milieu HT	Milieu HAT sans aminoptérine	Culture des cellules hybrides (transition entre le milieu HAT et le milieu A)

a) DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 4,5 g/l de glucose (GIBCO, U.S.A.)
b) AANE : acide aminé non essentiel (GIBCO, USA)
c) SVF : sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage 1 h à 56°C
d) DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 1 g/l de glucose (GIBCO, USA)

BIUS LILLE

hybridation, et la phase de clonage. Ce tapis cellulaire présente deux avantages. D'une part, les cellules libèrent dans le milieu de nombreux métabolites, favorisant la multiplication des hybrides isolés et participant également au maintien d'un pH physiologique favorable au développement de ces cellules. D'autre part, la présence de macrophages dans le tapis cellulaire nourricier permet l'élimination rapide des débris cellulaires issus de la nécrose de certaines cellules.

Les étapes de la préparation des cellules nourricières sont les suivantes :

- 5 ml de milieu A sont injectés par voie intrapéritonéale à des souris balb/c de 2 à 3 mois
- les cellules nourricières sont récupérées après un lavage de la cavité péritonéale
- le volume total récolté de la cavité péritonéale ($\simeq$ 4 ml) est complété à 12 ml par du milieu A
- des fractions aliquotes de 0,5 ml de cette suspension cellulaire sont réparties dans les 24 alvéoles d'une plaque de culture cellulaire (Nunclon). Alternativement, dans le cas d'un clonage, les 12 ml de suspension cellulaire sont distribuées à raison de 50 µl (une goutte) par alvéole dans deux plaques de culture cellulaire de type Nunclon à 96 alvéoles
- les plaques de culture sont incubées à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO_2
- après 48 heures d'incubation, les cellules non adhérentes sont éliminées par aspiration du surnageant, laissant au fond des alvéoles un tapis cellulaire essentiellement composé de cellules fibroblastiques et de macrophages.

3 - Les cellules immunes

Les cellules immunes sont isolées de la rate d'animaux immunisés.

a) Protocole d'immunisation

Quatre expériences d'hybridation ont été réalisées avec des cellules de rats Lou/C immunisés avec de l'Ag Ov. Deux autres ont utilisé des cellules de rats immunisés avec des complexes immuns. Ces derniers ont été préparés à partir de sérums d'onchocerquiens, soit par ultracentrifugation (40,000 tr/min - 2 h 15), soit par précipitation par le polyéthylène-glycol (PEG) à 6 %.

Quel que soit l'antigène, le protocole d'immunisation est le suivant :

- 1ère injection : 100 µg d'antigène dans 100 µl de sérum physiologique émulsionné avec 100 µl d'adjuvant complet de Freund (ACF), injecté dans les coussinets plantaires d'un rat Lou/c (6 à 8 semaines)
- 2ème injection : la même préparation injectée par voie sous-cutanée, un mois après la première
- 3ème injection : 100 µg d'antigène mais sans ACF injecté par voie intraveineuse 3 à 4 jours avant la manipulation de fusion cellulaire.

Un délai de 2 à 3 mois est respecté entre la 2ème et la 3ème injection d'antigène et la bonne immunité des rats est vérifiée avant l'injection finale. Si nécessaire, un rappel peut être effectué selon le protocole décrit pour la 2ème injection.

b) Préparation des cellules immunes

La rate des animaux immunisés est prélevée stérilement. Une suspension cellulaire est obtenue par homogénéisation de la rate en milieu B dans un homogénéisateur en verre muni d'un piston lâche. Les

cellules spléniques sont ensuite lavées deux fois en milieu B. La séparation des hématies et des lymphocytes spléniques s'opère dans un tube stérile en plastique de 25 ml (STERILIN, Teddington Middlesex, England) sur un gradient de Ficoll/métrizoate de sodium. Celui-ci est constitué de 8 ml d'une solution à 9,6 % (p/v) de métrizoate de sodium et à 5,6 % (p/v) de Ficoll sur lesquels est superposée une couche de 2 ml d'une solution à 7,7 % (p/v) de métrizoate de sodium et à 4,5 % (p/v) de Ficoll.

Les cellules spléniques reprises dans 8 ml de milieu B sont déposées délicatement à la surface du gradient. Après 10 minutes de centrifugation à 800 g, les hématies et débris tissulaires sédimentent au fond du tube alors que les lymphocytes peuvent être récupérés au niveau de la couche intermédiaire du gradient. Ils sont alors lavés deux fois dans 50 ml de milieu B par centrifugation.

4 - Les cellules myélomateuses

L'hybridation homologue a pu être réalisée grâce à l'apport par le Professeur H. Bazin de cellules myélomateuses de rats. Il s'agit de la souche IR 983 F (Bazin et al., 1980) isolée d'un immunocytome de rat LOU/C. Ces cellules myélomateuses sont non sécrétantes, non productrices, résistantes à 20 µg/ml de 8 azaguanine et présentent une déficience en Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (réf. Figure 3).

Préalablement à la fusion cellulaire, les cellules myélomateuses sont lavées deux fois dans 50 ml de milieu B afin d'éliminer le sérum de veau foetal qui inhibe la fusion cellulaire.

5 - La fusion cellulaire

La technique de fusion cellulaire utilisée s'inspire des travaux de Howard et al. (1978), Mc Kearn et al. (1978) et Clevinger et al. (1978).

L'agent de fusion utilisé est le polyéthylèneglycol (PEG) dimethylsulfoxide (DMSO). 30 g de PEG 1500 sont dissouts dans 42 ml de tampon phosphate 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,2, et 0,2 ml de DMSO. La solution est stérilisée à l'autoclave 15 mn à 121°C.

La fusion est réalisée dans un tube à centrifugation conique de 50 ml (Corning, USA). Les cellules myélomateuses sont ajoutées aux cellules spléniques dans un rapport de 1 pour 5. Un culot cellulaire mixte est obtenu après une centrifugation de 5 mn à 400 g, on y ajoute 1 ml de la solution de PEG/DMSO en 1 minute sous agitation douce, puis successivement 1 ml et 20 ml de milieu B en 1 mn et 4 mn respectivement, toujours sous agitation douce. Les cellules sont ensuite lavées en milieu B pour éliminer l'excès de PEG/DMSO. A partir du culot cellulaire obtenu, une suspension cellulaire contenant 5×10^6 cellules par ml est réalisée en milieu A. Des fractions aliquotes de 1 ml sont réparties par alvéole de plaque de culture cellulaire (Nunclon, 24 alvéoles) contenant un tapis de cellules nourricières. Les plaques sont incubées en atmosphère humide à 5 % de CO_2 et à 37°C.

6 - Sélection des hybrides

La sélection s'opère par l'aminoptérine (Littlefield, 1964) et consiste à inhiber la prolifération des cellules myélomateuses n'ayant pas fusionné. Le principe de cette sélection a été préalablement décrit page 39.

Le protocole est le suivant : après 24 heures de culture en milieu A, 1 ml de milieu HAT est ajouté. Pendant les 3 jours suivants, 1 ml du milieu de culture est remplacé par 1 ml de milieu HAT. Ceci permet un changement progressif du milieu A au milieu HAT et une élimination des substances toxiques relarguées par les nombreuses cellules qui meurent pendant cette phase. Les cellules sont généralement cultivées pendant 15 à 21 jours en milieu HAT avec renouvellement du milieu en moyenne tous les 5 jours. Après cette période, la culture peut se faire en milieu HT.

7 - Mise en évidence d'anticorps monoclonaux anti-*O. volvulus*

La mise en évidence dans les surnageants de culture cellulaire d'anticorps présentant une spécificité anti-*O. volvulus* a été réalisée par deux techniques menées en parallèle. Il s'agit de l'immunofluorescence (IF) et d'une technique immunoenzymatique, l'ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay").

Les sites antigéniques présents à la surface de coupes de parasites et les molécules d'Ag Ov fixées à un support solide sont différentes, cecisignifie que pour un dépistage complet des anticorps produits, les deux tests (IF et ELISA) doivent être utilisés.

a) L'Immunofluorescence

Le principe de la réaction consiste à obtenir la fixation spécifique d'anticorps sur les motifs antigéniques du parasite, puis à les révéler par un sérum anti-immunoglobulines de rat marqué à la fluorescéine.

Le test est réalisé sur coupe à congélation. Le matériel parasitaire utilisé est de deux types. D'une part, on peut utiliser des vers

adultes d'O. volvulus recouverts de TISSUTECK (LABTECK Product, Miles, USA) et enroulés dans une paroi péritonéale de hamster sain de façon à maintenir leurs structures lors de la coupe (Ambroise-Thomas et al., 1974). D'autre part, il est possible de réaliser les coupes dans des nodules jeunes. Si les nodules sont de petite taille, ils peuvent être inclus entiers dans du TISSUTECK, sinon il est nécessaire de les couper. Les blocs sont conservés à -20°C.

Des coupes de 6 µm sont réalisées au microtome à congélation (-30°) et sont placées sur des lames de verre préalablement traitées par une solution à 0,75 % (p/v) de gélatine de façon à favoriser l'adhérence. Les coupes peuvent être conservées à -20°C.

La réaction d'immunofluorescence se déroule de la façon suivante :

- fixation des coupes dans l'acétone - 10 mn à -20°C
- dépôt de 50 µl de surnageant de culture de cellules hybrides, concentré 4 fois par lyophilisation,ou 50 µl d'ascite diluée dans du tampon phosphate de sodium (Appendice 1) 10 mM - 30 mn.
- 3 lavages de 5 mn en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,2
- dépôt de 50 µl de sérum de lapin anti-immunoglobulines de rat marqué à la fluorescéine (Miles - Ltd - Israël) dilué au 1/40e - 30 mn dans l'obscurité
- 2 lavages de 10 mn en tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,2
- Contre-coloration au Bleu Evans au 1/10 000 dans du tampon phosphate 10 mM
- dépôt d'une goutte de glycérol à 50 % (v/v) en tampon phosphate de sodium 10 mM
- dépôt d'une lamelle et observation au microscope photonique avec équipement à fluorescence pour lumière réfléchie (Reichert Fluovar) avec brûleur à vapeur de mercure HBO 50 W

Lors de chaque réaction, les témoins suivants sont incorporés :

- témoins négatifs :
  - témoin tampon phosphate de sodium
  - témoin surnageant de culture ou liquide d'ascite des cellules myélomateuses utilisées
- témoins positifs :
  - sérum de rat immunisé ou surnageant positif connu.

Un test d'absorption par antigène soluble n'a pas pu être réalisé car la quantité d'antigène nécessaire à une absorption total est trop importante.

b) L'ELISA

Le principe de la réaction consiste à faire réagir l'anticorps à déceler, avec un antigène fixé sur un support solide, puis à la révéler par un sérum anti-immunoglobuline de rat marqué à la péroxidase.

Deux types de support ont été utilisés :

. des plaques rigides en polystyrène (Dynatech Lab, inc., réf. 15 018 M29A)

. des plaques en polyvinylechloride flexible (Dynatech Lab, inc., réf. 15 288 M24).

Le test a été réalisé avec de l'Ag Ov débarrassé des contaminants humains et de l'Ag TCAs. La mise au point du test pour le dépistage d'anticorps monoclonaux anti-*O. volvulus* a été réalisée à partir de surnageants testés en IF en combinant différentes concentrations d'antigène, de surnageants et d'anticorps marqués.

Le protocole utilisé est le suivant :

- fixation de l'antigène sur les plaques (100 µl par puits) à une concentration de 1 µg/ml dans du Tampon phosphate azide (Appendice 2). Incubation pendant 3 heures à 37°C puis pendant une nuit à 4°C.

- 3 lavages en Tampon phosphate-Tween (Appendice 3)
- 1 lavage en eau distillée.

Les plaques peuvent ainsi se conserver pendant 10 jours.

- Incubation des surnageants dilués au 1/100e ou des ascites dilués au 1/100e et 1/500e dans du Tampon phosphate Tween (100 µl par puits) pendant 4 heures à 37°C
- 3 lavages en Tampon phosphate Tween
- 1 lavage en eau distillée
- Révélation par des anticorps anti-immunoglobulines (Ig) de rat marqués à la péroxidase (Cappel Lab., Inc) dilués au 1/2500e (100 µl par puits). Le contact se fait pendant 1 heure à 37°C
- 3 lavages en Tampon phosphate Tween
- Dépôt de 100 µl de substrat O-phenyl-diamine (OPD) (36 mg OPD et 0,5 ml H_2O_2 0,3 % pour 100 ml de tampon phosphate) préparé extemporanément
- Après 1/2 heure dans l'obscurité, la réaction est arrêtée par l'addition de 100 µl de H_2SO_4 2N.

La lecture de la densité optique est faite en automatique à 492 nm par un appareil Titertek Multiskan (Flow Lab).

8 - Caractérisation isotypique des anticorps anti-*O. volvulus*

La caractérisation isotypique des anticorps montrant une spécificité anti-*O. volvulus* a été réalisée par la technique d'Ouchterlony (1958). Il s'agit d'une double diffusion en gel d'agarose à 0,9 % (Indubiose A 37, Industrie Biologique Française) de 2 mm d'épaisseur préparé en tampon barbital sodique pH 8,2. On découpe à l'emporte-pièce

un puits central dans lequel on place 125 µl de surnageant de culture et des puits périphériques contenant 20 µl d'antisérum monospécifique anti-IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgM, IgA, et IgE de rat. Ce matériel a été mis à notre disposition par le Professeur Hervé BAZIN et a été préparé selon les techniques décrites par Bazin et al. (1974). Après une diffusion de 48 heures les lames sont lavées, déminéralisées et colorées selon la technique décrite par Ouchterlony (1958).

9 - Clonage des hybrides sélectionnés

Les populations cellulaires hybrides présentes dans les différentes alvéoles résultent en général de la multiplication de plusieurs cellules hybrides. Il est donc nécessaire de réaliser un clonage qui consiste à isoler une cellule hybride de façon à obtenir une population cellulaire homogène car monoclonale.

Nous avons choisi la technique de dilution limite : on fait une numération de la population cellulaire hybride de départ puis on réalise une dilution pour avoir une cellule par 50 µl. Cette suspension cellulaire est alors répartie à raison de 1 goutte (50 µl) par puits d'une plaque de culture cellulaire du type Nunclon 96 trous. Pour pallier les erreurs de numération cellulaire des plaques sont également préparées qui contiennent respectivement 2 et 3 gouttes. Les plaques sont préalablement recouvertes d'un tapis de cellules péritonéales adhérentes de souris Balb/c (Réf. Chap. IV - III - 2, Page 55).

Après 24 heures de culture à 37°C, 5 % CO_2, 100 µl de milieu sont ajoutés dans chaque alvéole. Le milieu est renouvelé tous les 5 jours. Les plaques sont observées au microscope de manière à vérifier la monoclonalité des cultures. Les premiers clones apparaissent 8 à 15 jours plus tard.

La sélection des clones producteurs d'anticorps de spécificité anti-O. volvulus se fait sur le surnageant des alvéoles. Les populations cellulaires positives des alvéoles ne contenant qu'un clone sont multipliées, congelées et clonées de nouveau pour assurer la monoclonalité des anticorps produits.

10 - Production massive d'anticorps monoclonaux

Ne disposant pas d'unité de culture continue, la production massive d'anticorps monoclonaux se fait in vivo par la production de liquide d'ascite. Pour cela les cellules hybrides sont d'abord multipliées in vitro.

Des flacons de culture de 75 cm^2 de surface (FALCON) contenant 40 à 50 ml de milieu A sont ensemencés par approximativement 10^7 cellules hybrides et incubés à 37°C 5 % CO_2 pendant 48 heures. Les cellules hybrides sont concentrées par centrifugation (400 g - 5 mn) et injectées dans un petit volume (2 à 5 ml de milieu DMEM) par voie sous-cutanée chez un rat LOU/C.

Après 3 à 6 semaines, le rat développe une tumeur sous-cutanée. L'homogénéisation de cette tumeur en milieu DMEM à l'aide d'un homogénéisateur muni d'un piston lâche, permet l'obtention d'une grande quantité de cellules hybrides (5×10^8 à 8×10^8 cellules).

Ces cellules hybrides sont alors injectées dans la cavité péritonéale de rats LOU/C (5×10^7 cellules par inoculum). Cela entraîne dans les 7 à 15 jours la formation de tumeurs d'ascite donnant lieu à l'accumulation de liquide d'ascite dans la cavité péritonéale. Ce liquide d'ascite peut

alors être ponctionné à l'aide d'une seringue à raison de 30 à 50 ml tous les 3 à 5 jours. Cette opération ne peut être répétée que 2 à 3 fois au maximum pour le même animal. Cependant, les cellules hybrides obtenues après centrifugation du liquide d'ascite peuvent être réinjectées directement par voie péritonéale de façon à entretenir le cycle de production massive d'anticorps monoclonaux.

IV - LA FILTRATION SUR GEL

La filtration sur gel a été utilisée pour la purification d'un anticorps de classe IgM contenu dans le liquide d'Ascite.

Le principe de la gel filtration est basé sur les capacités différentes des molécules à pénétrer dans les pores de la phase stationnaire. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans le gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites entrent dans les pores du gel et se déplacent plus lentement. Les molécules sont donc éluées dans l'ordre des masses moléculaires décroissantes.

La préparation des immunoglobulines pour la gel filtration a été réalisée par une précipitation au sulfate d'ammonium telle qu'elle a été décrite par Bazin et al. (1974).

Cette préparation est filtrée sur gel Sephacryl S.300 superfine (Pharmacia Fine Chemicals) (Domaine de fractionnement = poids moléculaire 10^4 à 10^6) et le premier pic d'exclusion est considéré comme étant l'IgM purifiée.

La technique de filtration sur gel a également été utilisée pour le fractionnement de l'Ag Ov sur gel ACA 44 (IBF-France) (Domaine de fractionnement : poids moléculaire 10^4 à 10^5). La technique de filtration sur gel est détaillée par Fahey et Terry (1973).

V - LA PRECIPITATION EN GEL

La technique utilisée est celle de double diffusion en gel (DDG) initialement décrite par Ouchterlony (1958) et modifiée par Abelev (1960).

Le principe consiste à faire diffuser l'antigène et l'antisérum l'un vers l'autre dans un gel d'agarose. Au point d'équivalence (d'équilibre) antigène-anticorps, chaque composant antigénique se complexant avec l'anticorps précipitant correspondant va provoquer la formation d'un précipité. Le gel d'agarose se prépare extemporanément en dissolvant 1 g d'agarose (Indubiose - A37 - IBF) dans 100 ml d'une solution tamponnée de véronal sodé à pH 8,2. Le mélange est porté à 85 - 90°C dans un bain-marie pendant 20 mn puis le gel d'agarose est coulé sur des lames dégraissées. Les puits dans lesquels sont déposés les sérums et les antigènes sont faits à l'emporte-pièce lorsque le gel est refroidi. La diffusion se fait pendant 24 heures à température ambiante suivie de 24 heures à 4°C. Les lames sont plongées dans du tampon phosphate citraté (Appendice 4) à 5 % pendant 2 à 3 heures, afin de dissoudre les arcs non spécifiques. Elles sont ensuite lavées pendant 3 jours dans du sérum physiologique tamponné, déminéralisées à l'aide de papier Whatman n°1, séchées et colorées au bleu de Coomassie.

VI - LA MIGRATION EN GEL

1 - L'électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate) a été utilisée pour étudier le poids moléculaire de l'antigène étudié.

Cette technique associe une séparation électrophorétique à l'effet filtrant du gel de polyacrylamide. Deux gels de concentrations différentes en acrylamide sont employés. Le premier gel, de degré de réticulation faible (5 %) permet la concentration de l'échantillon. Ses composants migrent ensuite dans le gel de séparation (13 %) en fonction de leurs poids moléculaires. La technique utilisée est la technique classique décrite par Laemmli (1970). Après la migration, les protéines et les sucres sont visualisées respectivement par le bleu de Coomassie et le réactif de Schiff.

La coloration au Bleu de Coomassie (500 ml Methanol, 500 ml H_2O, 100 ml Acide Acétique, 0.85 g Coomassie) se fait pendant 2 heures avec un changement de bain. Le gel est ensuite décoloré (80 ml Acide Acétique, 200 ml Méthanol, qsp 1 litre) jusqu'à l'obtention d'une bonne visualisation des bandes.

Pour la coloration des polysaccharides par le Schiff, le gel est d'abord immergé dans le TCA 12,5 % 30 mn, puis rincé rapidement à

l'eau, et enfin, placé dans l'acide périodique (1 % dans CH_3COOH 3 %) pendant 50 mn. Il est lavé pendant 6 fois 1 heure dans de l'eau distillée. Le gel est alors immergé dans le réactif de Schiff (Merck) et gardé pendant 50 mn dans l'obscurité. Trois lavages de 10 minutes sont réalisés en métabisulfite (MBS) suivis d'un lavage en eau distillée. On peut conserver le gel dans du CH_3COOH 3 à 7,5 % avant de le sécher.

2 - L'électrophorèse en agarose

L'électrophorèse en agarose consiste à faire migrer les protéines dans un champ électrique. On obtient donc une séparation des protéines en fonction de leurs charges.

On coule un gel d'agarose (Indubiose - IBF) 1 % en tampon véronal sur lame de verre. On laisse refroidir 5 mn à température ambiante, puis 30 mn à 4°C. Des fentes de 1 cm sont tracées dans l'agarose à l'aide d'une lame de scalpel. L'intérieur des fentes est séché avec du papier Whatman n°1. Le bord des fentes est délicatement espacé pour placer 6 µl du produit à étudier (Ascites ou Ig purifiées), puis rapproché dès que le dépôt est effectué.

La migration électrophorétique s'effectue du pôle négatif vers le pôle positif sous une différence de potentiel de 30 volts pendant 2 heures. Après la migration, la lame est placée pendant 20 mn dans l'acide picrique, déshydratée à l'aide de papier Whatman N°1 pendant 1 nuit et lavée à l'eau. La coloration finale se fait dans l'amino-schwartz pendant 30 mn.

VII - MARQUAGE D'IMMUNOGLOBULINES A L'IODE 125

Le radiomarquage à l'Iode 125 (^{125}I) des immunoglobulines purifiées par gel filtration est réalisé à l'aide de la chloramine T. La technique utilisée est celle de Greenwood et al. (1963) modifiée par Mc Conahey et Dixon (1966).

En bref, 200 µcurie d'^{125}I (Amersham - Buckinghamshire, U.K.) sont mélangés à 200 µg de protéine à marquer, ainsi que 100 µl de chloramine T (1 mg/ml de PO_4^{3-} - 0,25 M - pH 7.4). Après 3 minutes d'agitation douce, la réaction est arrêtée par addition de 100 µl de métabisulfite de sodium (1 mg/ml de PO_4^{3-}). On ajoute alors 50 µl d'iodure de sodium (10 mg/ml PO_4^{3-}) pour capter l'iode libre.

La dialyse se fait par passage sur PD10 (Pharmacia G 25). On récupère l'effluent par échantillon de 0,5 ml. Après comptage, on sélectionne le ou les tube(s) contenant le produit marqué. L'activité spécifique est de 0,37 µCu/µg. Les immunoglobulines marquées sont conservées en tampon BSA/VBS à -70°C par quantités aliquotes de 100 µl.

VIII - LE "RADIOIMMUNOPRECIPITATION-PEG ASSAY" (RIPEGA)

Cette technique a été mise au point dans ce laboratoire par Santoro et al. (1977a). C'est une modification du "Polyéthylèneglycol test" proposé par Creighton et al. (1973) et par Lambert et al. (1974). Cette technique peut être utilisée pour détecter des antigènes ou des anticorps présents dans le sérum.

Dans cette étude, la technique du RIPEGA a été adaptée pour l'utilisation d'un anticorps monoclonal, et non plus d'un sérum polyclonal dans la détection d'antigène circulant.

Le principe de la réaction est d'obtenir la formation de complexes entre l'anticorps marqué à l'^{125}I et l'antigène présent dans le sérum. Ces complexes peuvent alors être précipités par le PEG, et la radioactivité présente dans ce précipité est proportionnelle à la quantité d'antigènes circulants dans le sérum.

La concentration en PEG (P.M. 6000) utilisée est critique car il faut définir le seuil où seuls les complexes seront précipités et non les anticorps marqués. Pour cela, on établit une courbe de précipitation de l'anticorps monoclonal (Ac Mn) marqué à l'^{125}I ajouté à du sérum humain normal (SHN) dilué au 1/5e, en présence de différentes concentrations de PEG. On laisse agir le PEG pendant 1 heure à froid sur le mélange Ac Mn ^{125}I et SHN avant de centrifuger (1500 g - 20 mn - 4°C). Après décantation, on mesure la radioactivité du culot.

La technique du RIPEGA utilisée est la suivante (Fig. 5) :

- 200 µl de chaque sérum à étudier dilué au 1/5e dans du tampon borate (voir annexe 5)
- Addition de 200 µl d'Ac Mn ^{125}I à raison de 10 000 coups par minute (cpm)/200 µl. Avant utilisation, l'Ac Mn ^{125}I est centrifugé à 24 000 g pendant 40 mn dans 1 ml de tampon Véronal (voir annexe 6) 1 % SAB pour éliminer d'éventuels complexes. La dilution du surnageant est faite dans du tampon borate.
- Incubation 1 heure à 37°C puis 3 heures à température ambiante
- Addition de 3 ml de PEG au pourcentage préalablement déterminé
- Précipitation pendant une nuit à température ambiante
- Centrifugation à 1500 g pendant 20 mn à 4°C
- Aspiration du surnageant
- Lavage avec 3 ml de PEG à la même concentration

- Centrifugation (idem)
- Mesure de la radioactivité du culot

Le test est réalisé en triple

Pour chaque expérience, on réalise un témoin de radioactivité totale en précipitant toutes les protéines à l'aide d'acide trichloroacétique à 20 % (Témoin TCA). Les résultats sont exprimés en pourcentage de précipitation de l'anticorps marqué calculé par rapport au témoin TCA.

IX - DOSAGE DES COMPLEXES IMMUNS PAR LE $C1q\ ^{125}I$

Ce test est basé à la fois sur la grande taille moléculaire des complexes immuns et sur leur propriété de liaison au C1q. La technique utilisée est celle de Zubler et Lambert (1976) (Fig. 6). Elle consiste dans un premier temps à décomplémenter 50 µl du sérum à étudier à l'aide de 100 µl d'une solution d'EDTA 0,2 M. Ce mélange est incubé au bain-marie à 37°C pendant 30 minutes. Après incubation, les tubes sont placés dans de la glace.

Dans un deuxième temps, on ajoute 50 µl de $C1q\text{-}^{125}I$ (10.000 cpm) et 1 ml de PEG à 3 %. Après une légère agitation, les tubes sont placés dans la glace pendant 1 heure. Ils sont ensuite centrifugés à 1500 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé par aspiration et la radioactivité du culot est déterminée.

Les tests sont réalisés en triple . Les résultats sont exprimés par rapport à un témoin TCA (cf. RIPEGA).

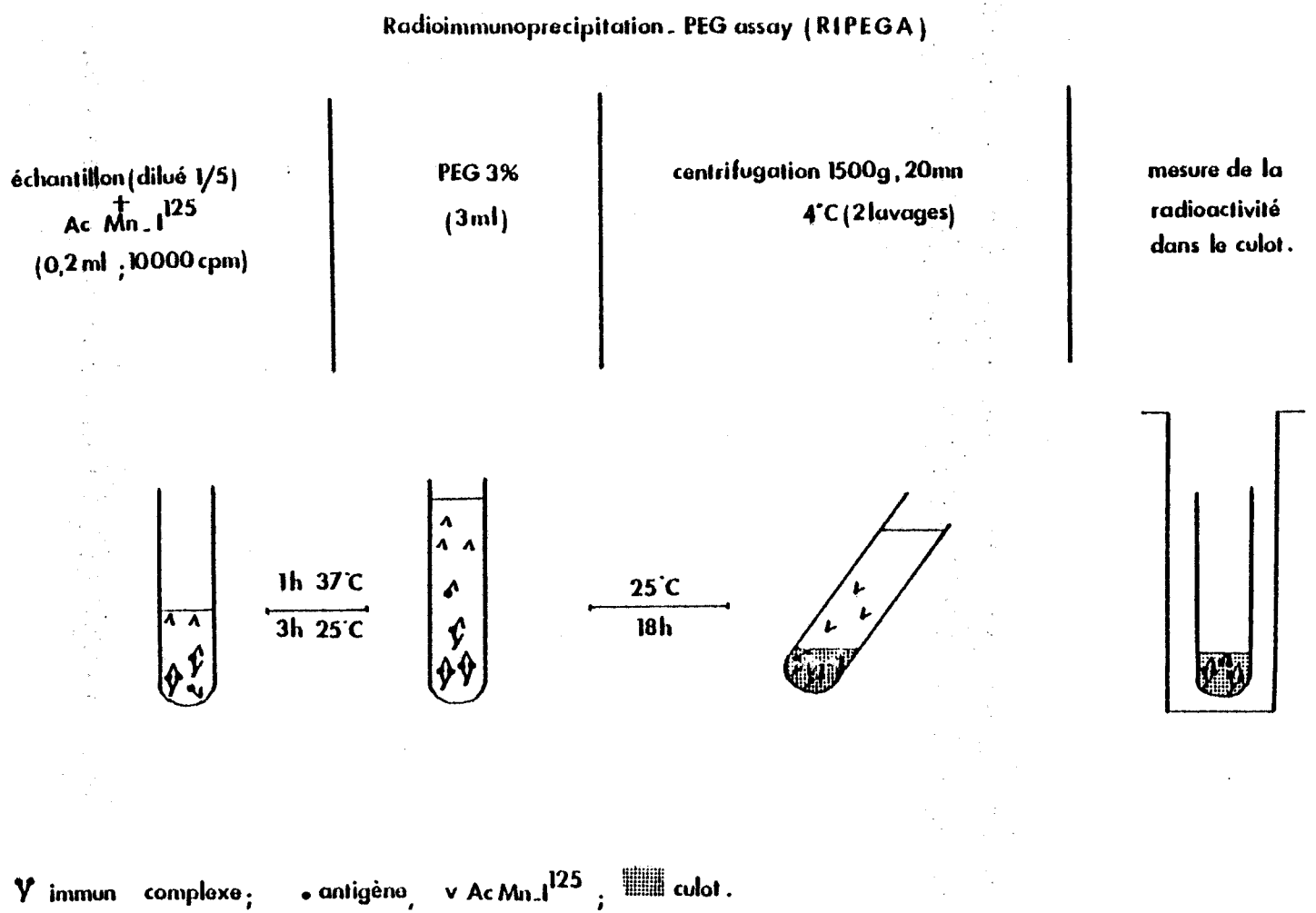
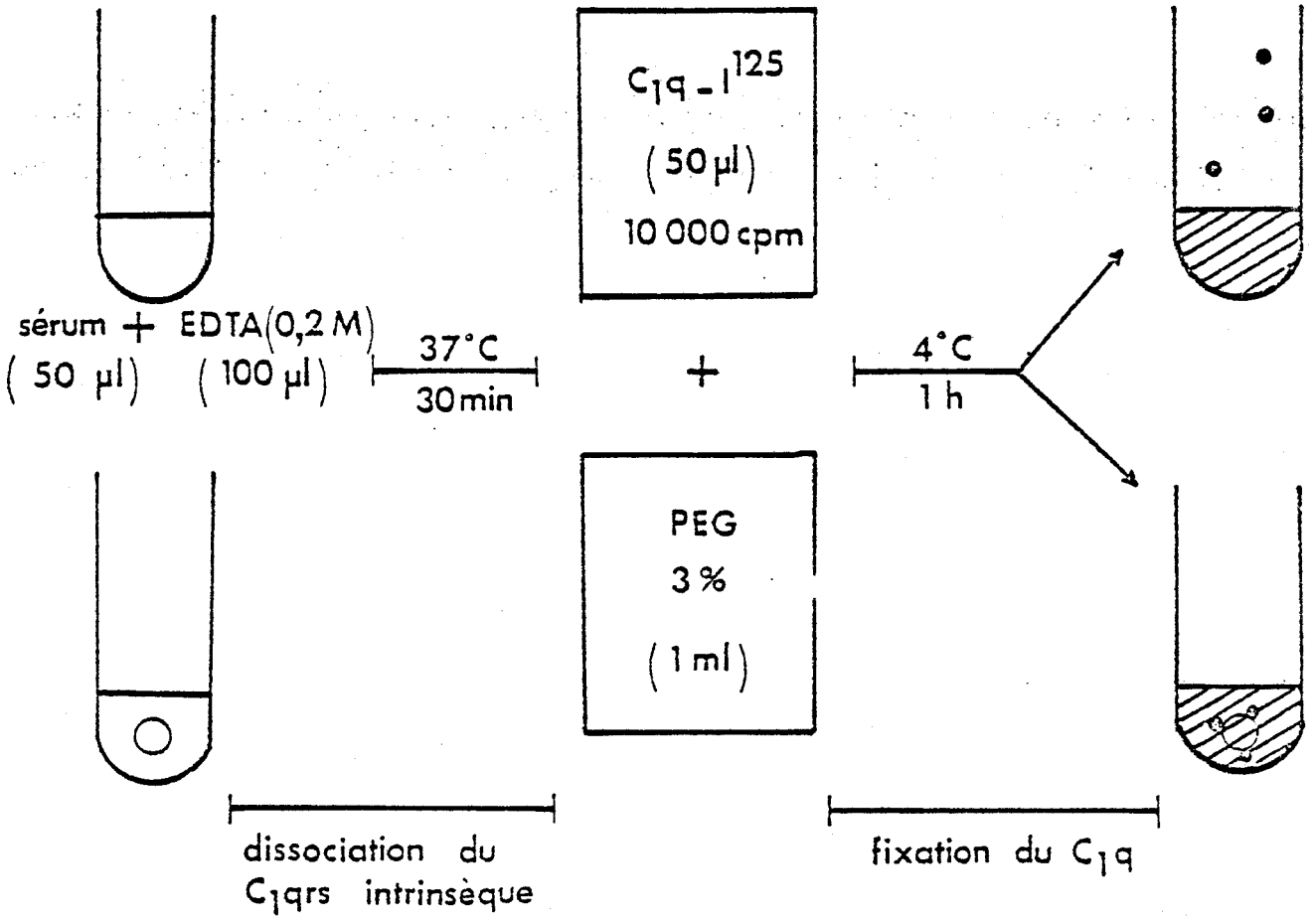


Figure 5 : Description schématique de la technique du "Radioimmunoprecipitation-PEG Assay" (RIPEGA)



○ immuns complexes

• C_1q-^{125}I

Figure 6 : Test de liaison au C1q-^{125}I (d'après ZUBLER et LAMBERT, 1976)

BUS LILLE

X - LES TECHNIQUES DIRECTES DE DOSAGE D'ANTIGENES CIRCULANTS

Ces techniques consistent à complexer l'antigène circulant à l'Ac Mn fixé à un support solide et à le révéler par l'Ac Mn marqué (Fig. 7). La condition "sine qua non" à la réalisation de ce sandwich entre deux anticorps monoclonaux identiques est la répétitivité du déterminant antigénique sur la molécule d'antigène.

Plusieurs supports peuvent être utilisés : des plaques rigides en polystyrène, des plaques flexibles en polyvinyl, ou des billes de polystyrène. L'autre choix qui se présente est celui du marqueur de l'anticorps révélateur. Dans cette étude, un radioélément, l'^{125}I a été utilisé pour le "SRIA" (Sandwich Radioimmunoassay).

1 - Le "SRIA" sur plaque (SRIA-P)

Ce test est réalisé sur plaques en polyvinyl flexible (Dynatech Lab, Inc., réf. 15 288 M24). La concentration optimale pour la fixation est déterminée : la solution initiale d'IgM Mn purifiée à une concentration de 0,4 mg/ml est diluée dans du tampon phosphate pH 7,2 et déposée dans les plaques à raison de 100 µl par alvéole. Après la fixation des anticorps au support et la saturation des sites libres, les anticorps fixés sont révélés par des anticorps anti-immunoglobulines de rat marqués à l'^{125}I (50,000 cpm - 1 h à température ambiante).

Le protocole utilisé pour le SRIA-P est le suivant :

- Fixation de l'Ac Mn froid pendant 3 heures à 37°C, puis une nuit à 4°C

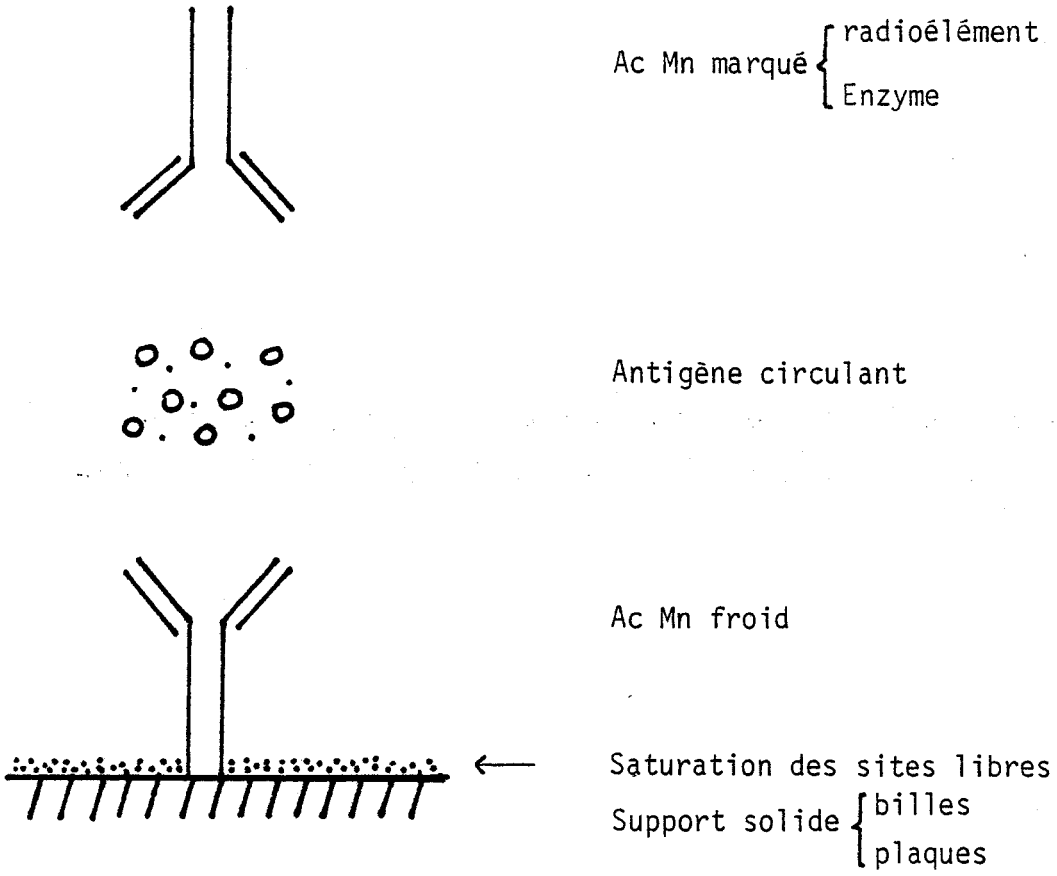


Figure 7 : Techniques directes de dosage d'antigène circulant par l'anticorps monoclonal

- Lavage en tampon phosphate 2 % SAB
- Saturation des sites libres dans ce même tampon pendant 1 heure à température ambiante
- Fixation de l'antigène présent dans du sérum pendant 4 heures à 37°C
- 3 lavages en tampon phosphate
- révélation par l'Ac Mn ^{125}I (50,000 cpm) 1 heure à température ambiante
- 4 lavages en tampon phosphate.

La plaque est séchée. Les alvéoles sont découpées à l'aide d'un scalpel chauffé à la flamme puis déposées dans des tubes propres afin d'être passées au compteur . Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité fixée.

2 - Le "SRIA" sur billes (SRIA-B)

Dans ce cas, le support est représenté par des billes de polystyrène de 6,5 mm de diamètre (SEROA - rue de l'Industrie - Monaco). La fixation et la saturation se font dans un Bécher. Dans la suite des manipulations, les billes sont traitées individuellement, la réaction se faisant dans des tubes à hémolyse. Pour mesurer la radioactivité fixée aux billes uniquement, il est nécessaire de transférer celles-ci dans des tubes propres pour ne pas prendre en compte la radioactivité accrochée non spécifiquement au plastique des tubes. La réaction en tube se fait avec un volume de 200 µl, minimum nécessaire pour recouvrir la bille. Comme pour le SRIA-P, il est nécessaire de définir la concentration optimale d'Ac Mn à utiliser pour une fixation maximale.

Le protocole du SRIA-B est le suivant :

- Fixation de l'Ac Mn IgM dilué dans du tampon Carbonate/Bicarbonate (voir Annexe 7) pendant une nuit à température ambiante
- Lavage en tampon Carbonate/Bicarbonate 4 % SAB
- Saturation dans cette même solution pendant 2 heures à température ambiante.
- Transfert des billes dans des tubes.
- Fixation de l'antigène pendant 4 heures à 37°C
- 3 lavages en tampon NaCl Tween (voir Annexe 8)
- Révélation pendant 1 heure à 37°C par l'Ac Mn ^{125}I dilué dans du tampon phosphate 0,1 % SAB, 3 % PEG pour obtenir 50 000 cpm/200 µl
- 4 lavages en tampon NaCl Tween
- Transfert des billes dans des tubes propres puis mesure de la radioactivité fixée. Comme précédemment, les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité fixée.

XI - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

L'analyse statistique des résultats a été réalisée grâce au micro-ordinateur du laboratoire doté de programmes de traitement statistiques.

Pour chaque population étudiée, on définit un paramètre de position, la moyenne, et un paramètre de dispersion, l'écart-type (E.T.).

Après avoir vérifié que la distribution des deux populations était peu différente de la normale et que les variances n'étaient pas significativement différentes, les moyennes ont été comparées par le test de Fischer Student (test bilatéral au seuil de signification $P \leqslant 0,05$).

Un test de corrélation par régression linéaire a été effectué, avec un p calculé selon la distribution normale du t de Student et un seuil de signification $p \leqslant 0,05$.

CHAPITRE V

RÉSULTATS

I - IMMUNISATION POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Avant de réaliser l'hybridation cellulaire, il est nécessaire de vérifier la bonne immunisation des rats et de sélectionner ceux présentant la meilleure réponse immunitaire. Ceci peut être effectué par les techniques d'IF et de DDG. Cette dernière est réalisée en microméthode avec de l'Ag Ov débarrassé des contaminants humains (Photo 6). Par cette technique de DDG, la sélection des rats ayant développé la meilleure réponse immunitaire est plus facile.

II - L'HYBRIDATION

Les résultats obtenus lors des différentes expériences d'hybridation cellulaire réalisées sont représentés dans le Tableau 3. Ainsi qu'on peut le constater, les résultats sont très variables tant au niveau des pourcentages d'alvéoles présentant une multiplication cellulaire qu'au niveau des contaminations. Le nombre de clones positifs obtenus dans chaque expérience reste très faible. De plus, certains de ces clones ont perdu leur activité anti-*O. volvulus* après quelques divisions cellulaires.

III - DETECTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-*O. VOLVULUS*

Lorsque la population cellulaire d'une alvéole est dense et que le milieu de culture est métabolisé, celui-ci est analysé en vue de détecter la présence d'anticorps anti-*O. volvulus*. Pour assurer des conditions idéales, il faut que le milieu ait été en contact avec les cellules pendant 24 à 48 heures. Si le contact est plus long, la libération d'enzyme qui suit la nécrose cellulaire peut entraîner une altération de la structure des immunoglobulines.

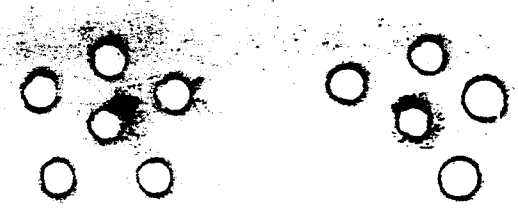


Photo 6 : Double diffusion en gel (microméthode) opposant l'Ag Ov (au centre) à des sérums de rats LOU immunisés avec de l'Ag Ov.

BUS LILLE

	Immunisation	Multiplication cellulaire	Contamination	Surnageants positifs
Expérience 2	Ag Ov	67 %	0 %	3 %
" 3	Ag Ov	51 %	2 %	4 %
" 4	Ag Ov	66 %	5 %	2 %
" 5	culot d'ultra centrifugation*	17 %	38 %	9 %
" 6	précipitation au PEG *	50 %	7 %	0 %
Moyennes et écarts types		50.2 ± 20	10.4 ± 15	3.6 ± 3

Tableau 3 : Résultats de différentes expériences d'hybridation cellulaire (les pourcentages sont calculés par rapport au nombre total d'alvéoles)

* Préparés à partir de sérum onchocerquien.

BUS LILLE

1 - L'immunofluorescence (IF)

Les résultats de fluorescence ont toujours été jugés par rapport au témoin tampon et à celui utilisant le surnageant de culture des cellules de myélomes. Il est probable que des immunoglobulines humaines soient fixées à la surface des vers adultes. Pour cette raison, toute fluorescence à la surface des vers n'est pas prise en considération. Par contre, la fluorescence de la partie interne du vers adulte est provoquée par des anticorps anti-*O. volvulus* et non pas par des anticorps anti-immunoglobuline humaine.

La Photo 7 montre les résultats obtenus avec l'anticorps monoclonal IA2-23. Les coupes réalisées sur nodules apportent de meilleurs résultats, la structure des vers étant mieux conservée que lors de coupes de vers adultes. Elles permettent d'observer que l'anticorps monoclonal IA2-23 reconnaît la cuticule des microfilaires d'*O. volvulus*. Ceci a également été confirmé par les résultats obtenus sur coupes de microfilaires (Photo 7d).

2 - L'"Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

L'ELISA a d'abord été réalisé pour détecter les anticorps monoclonaux reconnaissant l'Ag Ov. Les anticorps ainsi sélectionnés ont alors été testés vis-à-vis de l'Ag TCAs. Toutes les expériences d'ELISA sont réalisées en triple et les valeurs expérimées représentent la moyenne de ces trois réactions réalisées dans les mêmes conditions.

a) Utilisation de l'Ag Ov en ELISA

De nombreuses expériences ont été effectuées pour déterminer les concentrations optimales d'antigène, de surnageant et de conjugué à

Photo 7 : Réaction d'immunofluorescence avec l'anticorps monoclonal $IA_2 23$ sur :

a) coupe de ver adulte d'*O. volvulus*

b et c) coupe de nodule onchocerquien

d) coupe de microfilaire d'*O. volvulus*

BUS
LILLE

utiliser. L'expérience ayant apporté les réponses souhaitées est résumée dans le Tableau 4. Le substrat utilisé est l'OPD et le test est réalisé sur plaques en polyvinyle chloride. On constate qu'il faut une concentration d'antigène de 1 µg/ml pour avoir une différence entre les positifs et les négatifs. Cette différence n'est pas significative lorsqu'on utilise le conjugué au 1/1000e ou 1/25000e. Nous avons choisi la dilution la plus forte (1/2500e) car elle permet d'obtenir des négatifs très faibles. La dilution du surnageant constitue un point critique. En effet, la concentration en anticorps de chaque prélèvement est différente. Nous avons choisi la dilution au 1/100e car elle donne une valeur très faible pour le négatif. Cependant, il est important que les surnageants testés soient bien métabolisés.

Des essais de saturation avec la SAB ont montré que cette opération n'est pas nécessaire.

Deux substrats peuvent être employés avec un conjugué marqué à la péroxidase. Ce sont l'O-phényl-diamine (OPD) et de l'O-dianisidine (O.D.) (Sigma). Une comparaison des deux substrats (Tableau 5) montre que l'OPD donne de meilleurs résultats.

Le support le plus utilisé en ELISA consiste en plaques de polystyrène rigide. Cependant, des essais effectués préalablement en radioimmunologie avaient montré une bonne capacité de fixation de l'Ag Ov sur des plaques flexibles en chlorure de polyvinyle. Une comparaison a été effectuée entre les deux supports (Tableau 6) et montre une différence beaucoup plus importante entre les positifs et les négatifs lorsque les plaques flexibles en chlorure de polyvinyle sont utilisées

Ag Ov

		0,1 µg/ml		1 µg/ml	
		conjugué 1/1000	conjugué 1/2500	conjugué 1/1000	conjugué 1/2500
IA_2-23 +	1/10	0,25	0.19	0.34	0.28
	1/50	0.15	0.13	0.27	0.18
	1/100	0.11	0.1	0.22	0.15 *
IA_2-6 -	1/10	0.19	0.19	0.25	0.16
	1/50	0.16	0.1	0.19	0.07
	1/100	0.1	0.09	0.12	0.06 *
IR983 F -	1/10	0.2	0.17	0.26	0.14
	1/50	0.18	0.16	0.17	0.06
	1/100	0.14	0.05	0.13	0.03
Blanc		0.004	0.005	0,02	0,01 *

Tableau 4 : Mise au point de l'ELISA avec l'Ag Ov

* Combinaisons choisies

Les valeurs représentent les moyennes des densités optiques obtenues.

		OPD			OD		
Antigène Ov		0,1 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml	0,1 µg/ml	1 µg/ml	5 µg/ml
IA_2-23	1/10	0.43	1.30	2	0.26	0.54	0.82
+	1/100	0.37	1.27 *	1.73	0.18	0.54 *	0.80
	1/500	0.34	0.66	1.4	0.04	0.33	0.61
IR 983F	1/10	0.49	0.66	0.88	0.20	0.39	0.56
-	1/100	0.43	0.44 *	0.67	0.18	0.27 *	0.46
	1/500	0.43	0.40	0.59	0.13	0.21	0.30
Blanc		0.35	0.39 *	0.53	0.11	0.14 *	0.19

Tableau 5 : Comparaison des substrats OPD et OD en ELISA pour la détection d'anticorps monoclonaux

* Combinaisons donnant les meilleurs résultats.

Les valeurs représentent les moyennes des densités optiques obtenues.

BUS Lille

	Plaques en chlorure de polyvinvle	Plaques polystyrène
IR 983 F	0.23	0.16
IA_2-3-AF_8	0.16	0.11
IA_2-23-AD_{10}	0.78	0.42
IA_2-23-BB_4	0.21	0.16
IA_2-23-AA_3	0.73	0.50
IA_2-23-AA_6	0.84	0.46
IA_2-23-AC_8	0.73	0.45
IA_2-23-AC_1	0.69	0.40
IA_2-23-AF_1	0.21	0.12
Blanc	0.12	0.069

Tableau 6 : Comparaison de support en chlorure de polyvinyle et en polystyrène dans la mise au point de l'ELISA pour la détection d'anticorps monoclonaux.
Les valeurs représentent les moyennes des densités optiques obtenues.

Ce test a été réalisé avec une concentration en antigène de 1 µg/ml, des surnageants de différents clones positifs et négatifs dilués au 1/100e, un conjugué au 1/2500e et avec de l'OPD comme substrat.

La reproductibilité de la lecture automatique dans ces plaques flexibles qui ont un fond rond, contrairement aux plaques rigides, a été testée. Pour cela, le conjugué et le substrat ont été mélangés et des dilutions de ce mélange ont été réparties dans les plaques. Les résultats sont les suivants :

	Nombre d'alvéoles	Densité optique moyenne ± écart type
pur	4	1.77 ± 0.19
1/2	8	0.86 ± 0.06
1/4	8	0.34 ± 0.04
1/8	8	0.10 ± 0.03
1/16	8	0.03 ± 0.02

Les écarts types sont très faibles, ce qui montre une bonne reproductibilité au niveau de la lecture des plaques en automatique. On a cependant constaté des différences entre lots de commandes différents.

Les clones reconnaissant l'Ag Ov en ELISA sont mentionnés dans le Tableau 7.

Les difficultés d'obtention de l'Ag Ov ne nous a pas permis de réaliser des tests d'épuisement par antigène soluble qui nécessite des quantités importantes.

b) Utilisation de l'Ag TCAs en ELISA

Les concentrations sont les mêmes que ceux précédemment déterminés Seule, la concentration en antigène peut varier. Différentes concentrations d'antigènes ont donc été testées vis-à-vis de plusieurs surnageants de

Clones	DDG	IF	ELISA (Ag Ov)	ELISA (Ag TCAs)
IA_2-23	IgM	+	+	+
IA_2-3	IgG	+	-	-
IA_3-D20	IgM	+	-	-
I4-59	IgG2c	+	+	-
I4-65	IgG2c	+	+	-
I5-103	IgG2a	-	+	-
I5-177	IgM	-	+	-
I5-194	IgM	-	+	-

Tableau 7 : Résultats du dépistage des clones produisant des anticorps anti-*O. volvulus*

culture. Le Tableau 8 montre que les résultats obtenus avec 1 µg/ml et 5 µg/ml d'antigène ne sont pas significativement différents. La concentration de 1 µg/ml d'Ag TCAs a donc été choisie.

Il apparaît qu'un seul des clones cellulaires obtenus, le IA2-23, produit des anticorps capables de reconnaître l'antigène TCA soluble. La Figure 8 montre les résultats obtenus en ELISA avec les surnageants de différentes alvéoles de culture cellulaire après clonage du IA2-23.

Il a été démontré dans ce laboratoire (des Moutis et al., 1982) qu'il existe une identité partielle entre l'Ag TCAs et l'antigène circulant dans le sérum de patients onchocerquiens. Cette relation a été démontrée en opposant en DDG un hyperimmunsérum de lapin anti-Ag Ov à l'Ag TCAs et à un sérum de patient onchocerquien. Cette identité partielle fait donc du clone IA2-23 un candidat de choix pour la détection d'antigènes circulants dans l'Onchocercose (ACO). La suite de ces travaux se porte donc sur la production, la caractérisation et la purification des anticorps produits par ce clone IA2-23-AA6-AE3 (après 2 clonages).

IV - CARACTERISATION ISOTYPIQUE

La caractérisation isotypique des anticorps produits dans les surnageants se fait en DDG. Elle permet aussi de vérifier qu'il y a un seul type d'Ig dans le surnageant et que l'on est donc bien en présence d'Ig monoclonales. Il faut toutefois noter qu'il existe une réaction croisée entre les IgM et les IgG totales. Ainsi, le clone IA2-23-AA6-AE3 produit des anticorps de classe IgM montrant une réaction croisée avec les IgG totales (Photos 8).

Le Tableau 7 montre la classe des différents anticorps de spécificité anti-O. volvulus obtenus.

surnageants	0,1 µg/ml	1 µg/ml *	5 µg/ml	10 µg/ml
IA2-23-AC1	0.39	0.59	0.57	0.77
IA2-23-AD10	0.43	0.72	0.74	0.99
IA2-23-AA3	0.35	0.47	0.48	0.65
IA2-23-AC8	0.41	0.72	0.67	0.93
IA3-D20	0.15	0.15	0.12	0.21
IA2-3-CE5	0.14	0.15	0.12	0.18
IR 983F	0.12	0.13	0.11	0.18
Blanc	0.21	0.15	0.16	0.18

Tableau 8 : Comparaison de différentes concentrations d'Ag TCAs en ELISA pour la détection d'anticorps monoclonaux.

* Concentration sélectionnée.

Les valeurs représentent les moyennes des densités optiques obtenues.

BUS LILLE

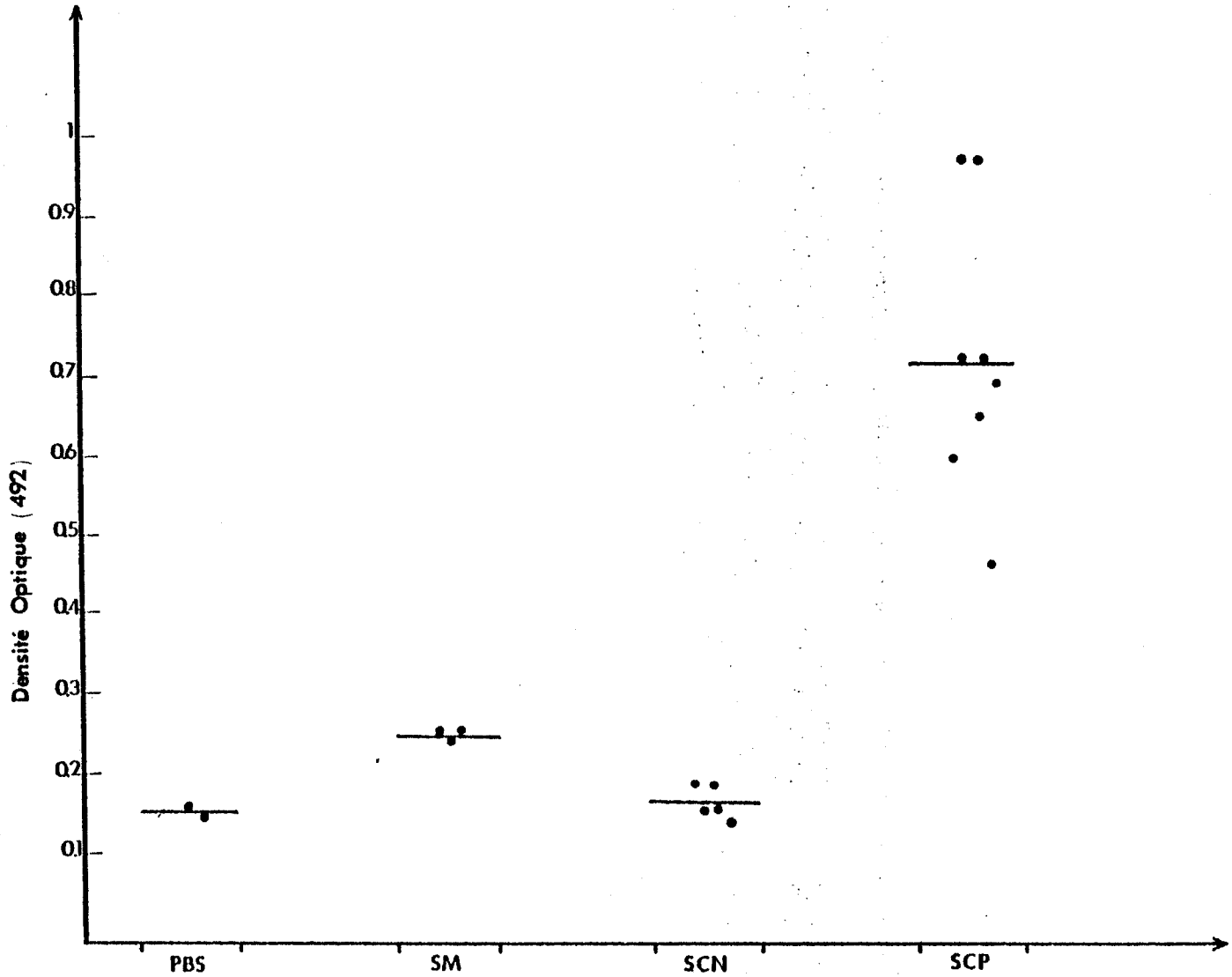
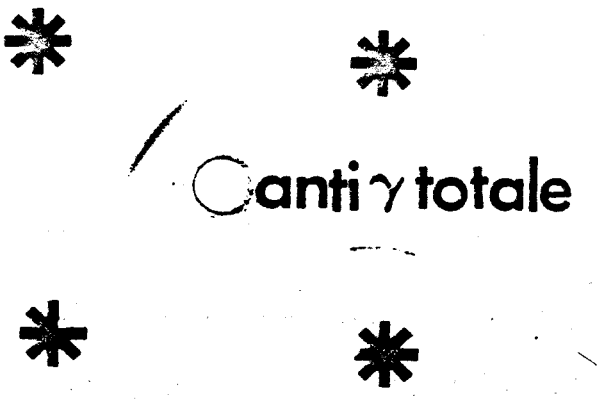
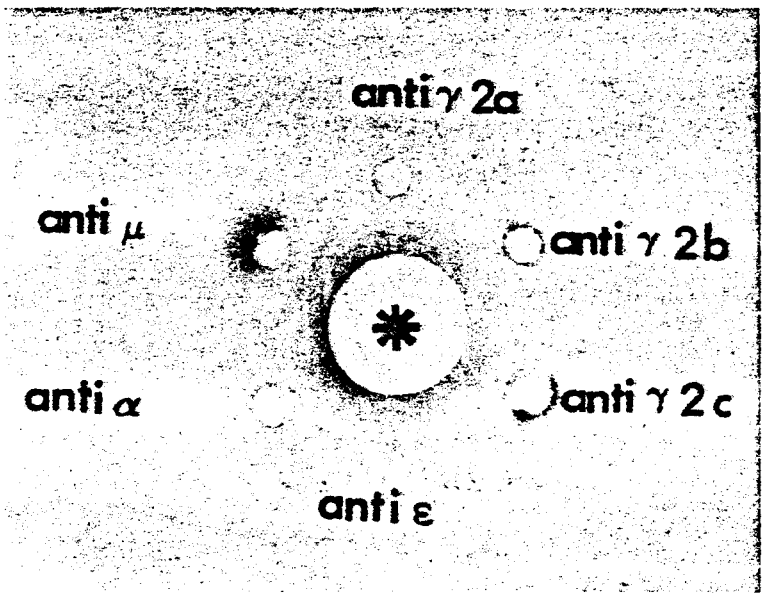


Figure 8 : Reconnaissance de l'Ag TCAs par l'anticorps monoclonal IA2 23 en ELISA.

PBS : Tampon phosphate de sodium ; SM : surnageants de culture de cellules de myélomes ; SCN : Surnageants de culture de clones négatifs ; SCP : surnageants de culture du clone IA2 23.





Photos 8: Caractérisation isotypique des immunoglobulines présentes dans les surnageants de culture (✱)

BNS LILLE

V - PRODUCTION DE LIQUIDE D'ASCITE

Le liquide d'ascite est produit comme décrit dans le Chapitre IV. Il est ensuite nécessaire de tester les différentes ascites obtenues car il existe une grande variation dans la teneur en anticorps spécifiques d'une ascite à l'autre. Le Tableau 9 montre les résultats obtenus en ELISA avec de l'Ag Ov pour des liquides d'ascites provenants de 5 rats différents. La dilution des ascites n'a pas d'effet significatif sur les résultats. Par la suite, les liquides d'ascites ont donc été dilués au 1/100e pour tous les tests.

En IF, il est nécessaire d'analyser deux dilutions pour chaque liquide d'ascite car on a observé qu'une concentration trop forte en anticorps spécifiques pouvait entraîner une fausse réaction négative.

VI - PURIFICATION DE L'IgM MONOCLONALE ANTI-Ag TCAs

La purification a été réalisée par gel filtration sur Séphacryl S300 superfine à partir d'un liquide d'Ascite fortement positif. Le profil d'élution obtenu est représenté Figure 9. Le premier pic représente l'IgM recherchée.

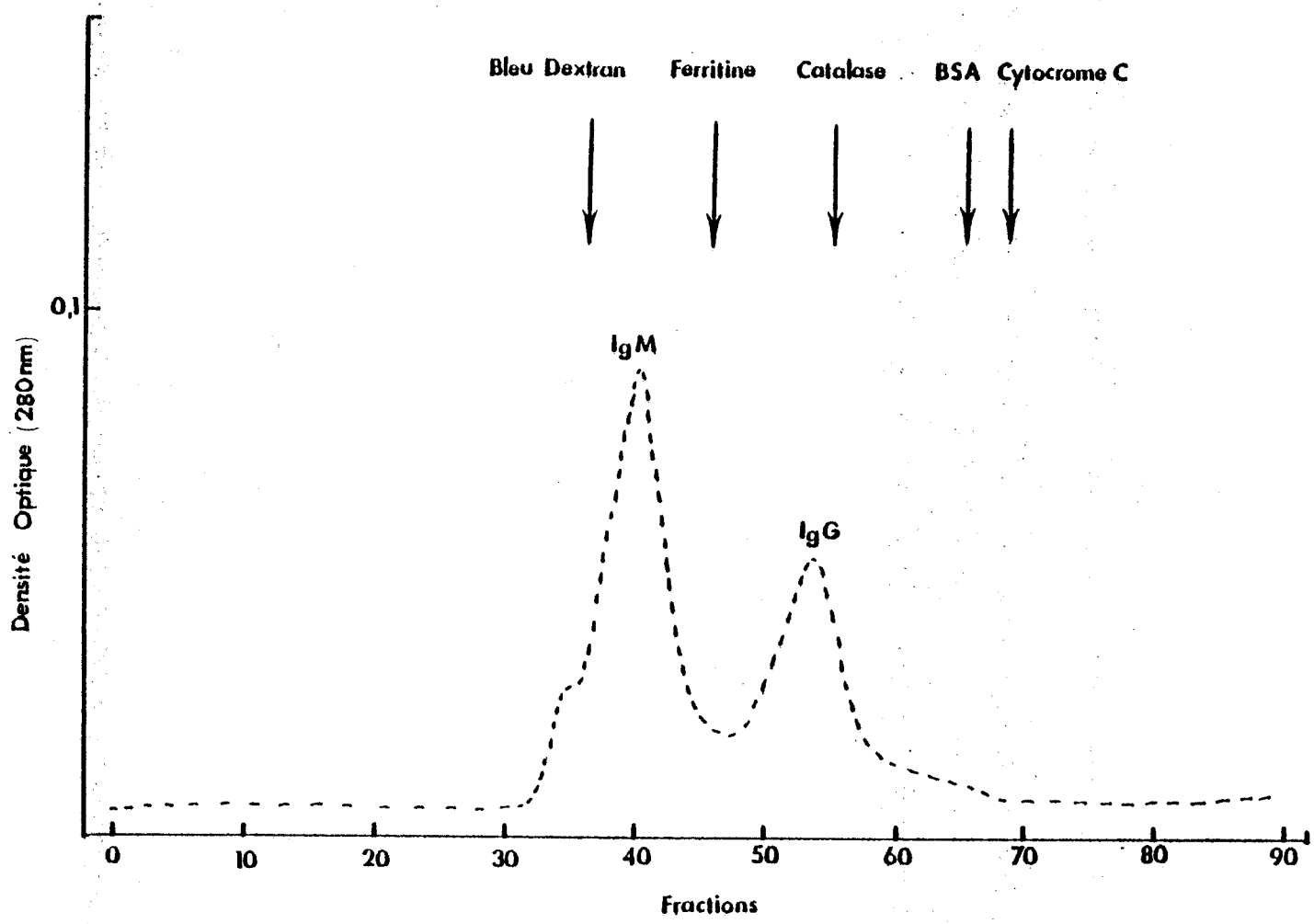
La pureté de cette fraction a été testée en électrophorèse en gel d'agarose (Photo 9). On peut voir que le pic d'IgM n'est représenté que par une seule bande alors que celles-ci sont nombreuses dans l'ascite de départ.

Pour vérifier, d'une part que l'activité anti-*O. volvulus* était bien dans le pic IgM et d'autre part que la purification n'avait pas

Ascites IA2-23 AA6-AE3	1/50	1/100	1/500	1/1000
1	0,73	0,81	0,89	0,94
2	0,71	0,78	0,87	0,82
3	0,87	0,79	0,85	0,87
4	0,58	0,49	0,54	0,52
5	0,59	0,62	0,62	0,70
Ascite IR 983F	0,41	0,31	0,24	0,25

Tableau 9 : ELISA pour la détection d'anticorps anti-Ag Ov dans le liquide d'Ascite

Les valeurs représentent les moyennes des densités optiques obtenues.



BUS LILLE

Figure 9 : Profil d'élution d'une filtration sur gel Sephacryl S300, réalisée à partir des immunoglobulines d'une ascite produisant une IgM monoclonale anti-*O. volvulus*.

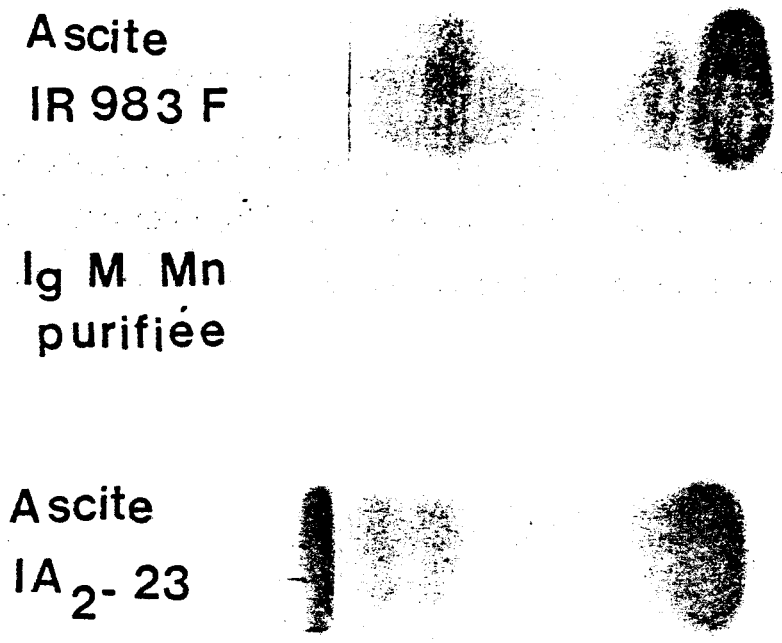


Photo 9 : Electrophorèse mettant en évidence la pureté de la fraction purifiée à partir de l'ascite d'origine (IA_2-23).

BUS LILLE

altéré cette activité, un échantillon des deux pics a été testé en IF et en ELISA. Dans les deux tests, l'activité anti-*O. volvulus* se retrouve uniquement dans le pic d'IgM.

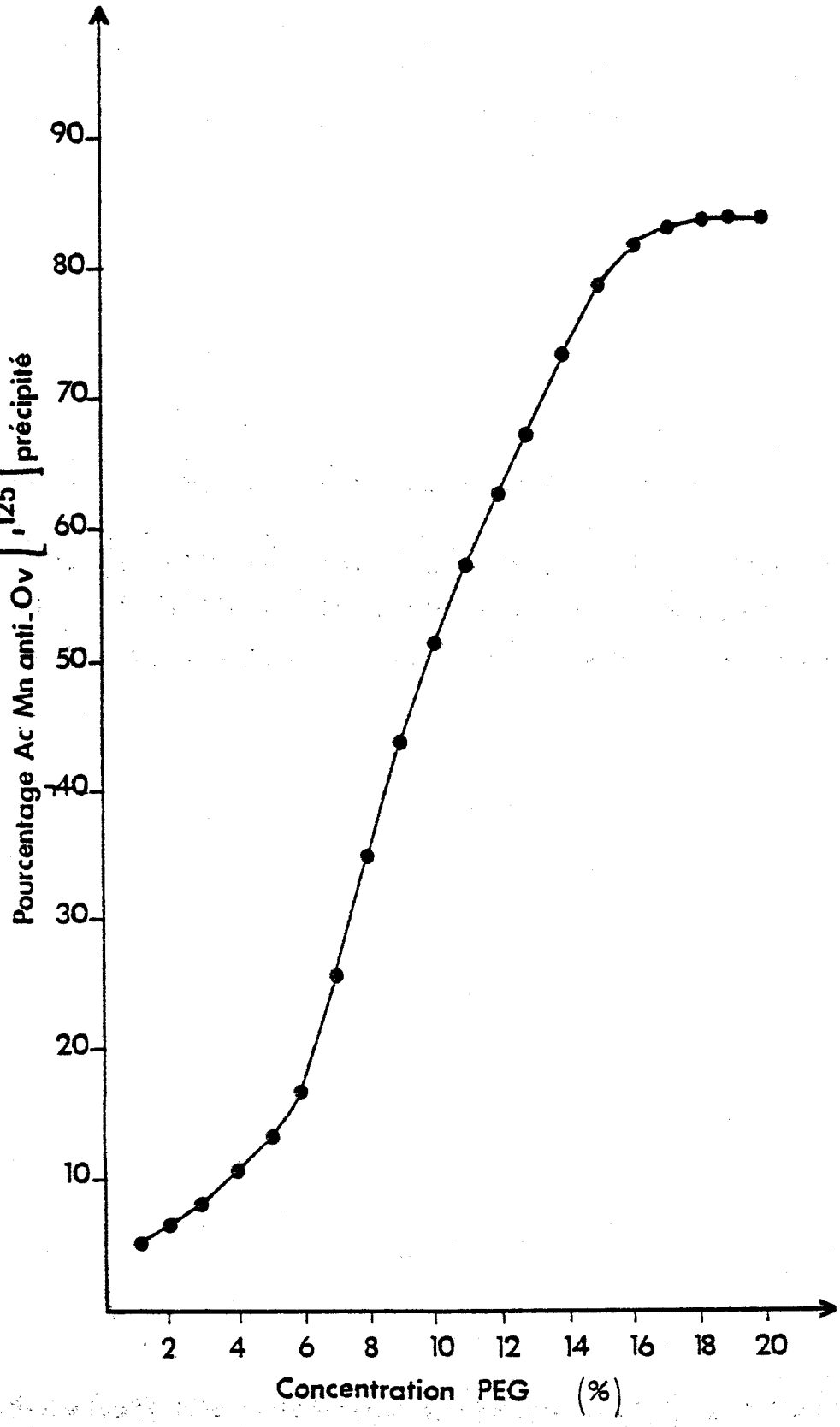
VII - DETECTION D'ACO DANS LE SERUM PAR RIPEGA

1 - Mise au point du test

Santoro *et al.* (1977a) a déterminé qu'il fallait une concentration en PEG de 7 % pour ne précipiter que les complexes immuns lors d'une expérience utilisant des anticorps polyclonaux. Il était nécessaire de déterminer la concentration à utiliser pour l'utilisation de l'IgM monoclonale anti-*O. volvulus*. Une courbe de solubilité de cet anticorps marqué à l'^{125}I, dans différentes concentrations de PEG, a donc été réalisée. Les résultats obtenus (Figure 10) ne nous permettent pas de choisir entre 3 et 5 % de PEG. Une expérience a donc été réalisée utilisant ces deux concentrations sur les mêmes sérums (10 SHN et 20 sérums onchocerquiens (SOv). Les résultats sont les suivants :

PEG 3 %	SHN = 4,7 % $\pm$ 0,67
	SOv = 8,25 % $\pm$ 2
PEG 5 %	SHN = 13 % $\pm$ 3,9
	SOv = 18,25 % $\pm$ 4,31

Les écarts types importants entre les SHN obtenus lors d'une précipitation avec du PEG 5 % indiquent que la radioactivité du culot n'est pas spécifique. De plus, avec de tels écarts-types, la différence entre SHN et SOv est moins significative ($p = 1.6 \times 10^{-3}$ au lieu de $p = 5 \times 10^{-6}$).



BUS LILLE

Figure 10 : Courbe de précipitation de l'anticorps monoclonal anti-O. volvulus (Ac Mn anti-O.v) en sérum humain normal dans différentes concentrations de polyéthylène glycol (PEG).

Le test du RIPEGA utilisant l'IgM monoclonale anti-O. volvulus a donc été réalisé avec une concentration en PEG de 3 %.

Une courbe dose-réponse a été effectuée en diluant de l'Ag Ov dans du SHN qui est ensuite dilué au 1/5e pour réaliser le test. Cette courbe est représentée Figure 11. Elle montre que le seuil de détection est de 0,01 µg/ml soit 10 ng/ml. Il faut noter toutefois que cette valeur varie en fonction du lot d'antigène et de sa pureté.

2 - Etude de sérums de patients onchocerquiens

Deux populations onchocerquiennes ont été étudiées, l'une Africaine, l'autre Vénézuélienne. Quelques sérums d'Africains séjournant en France et montrant un diagnostic négatif pour l'onchocercose ont également pu être étudiés.

La Figure 12 illustre graphiquement les résultats obtenus. Chaque point représente la moyenne de deux ou trois expériences pour un sérum donné. Il est clair que tous les sérums n'ont pas pu être étudiés dans la même expérience. Cependant, la même série de SHN était inclue dans toutes les expériences et lorsque cela a été jugé nécessaire, un facteur de correction a été réalisé de la façon suivante :

La valeur de la moyenne des SHN de chaque nouvelle expérience était divisée par celle des SHN de référence. La valeur obtenue représentait le facteur de correction par lequel les valeurs de tous les sérums étudiés étaient divisées.

Les moyennes et écarts-types sont représentés sur la Figure 12. Les valeurs sont les suivantes :

- SHN Européens : $\bar{x} = 4.72 \pm 0.72$
- SHN Africains : $\bar{x} = 5.35 \pm 1.19$
- Sérums onchocerquiens Africains Sov A : $\bar{x} = 8.06 \pm 2.22$
- Sérums Onchocerquiens Vénézuéliens Sov V : $\bar{x} = 9.13 \pm 4.54$

L'analyse statistique montre que la différence entre les contrôles (Européens et Africains) et les sérums de patients Onchocerquiens est significativement différente avec une probabilité d'erreur inférieure à 0,001.

Si l'on détermine le seuil de positivité comme étant égal à la moyenne des contrôles européens additionnés de deux fois l'écart-type, on peut détecter un antigène onchocerquien circulant dans 63 des 79 sérums Africains étudiés soit 80 % et dans 126 des 164 sérums Vénézuéliens étudiés soit 76 %.

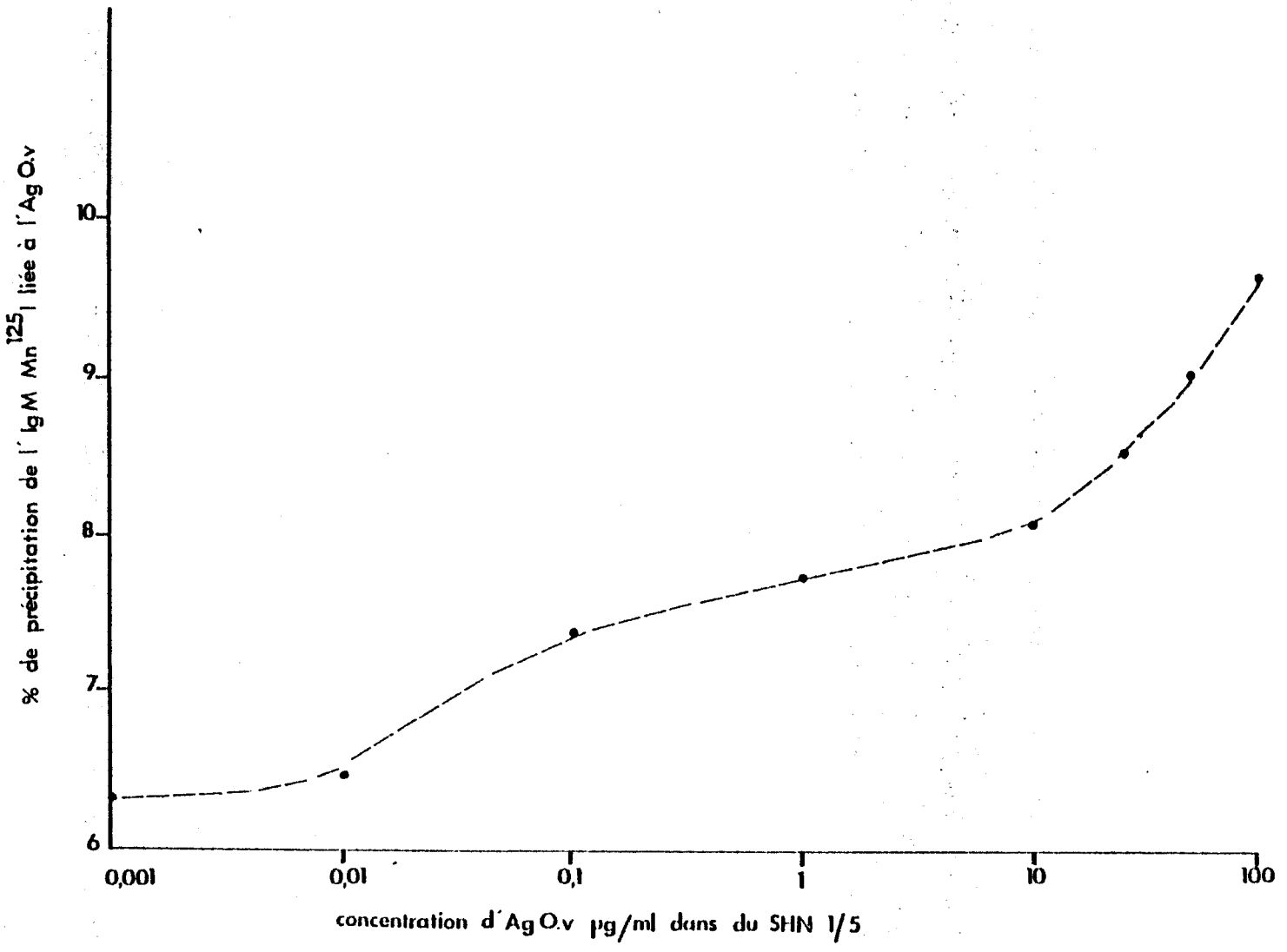
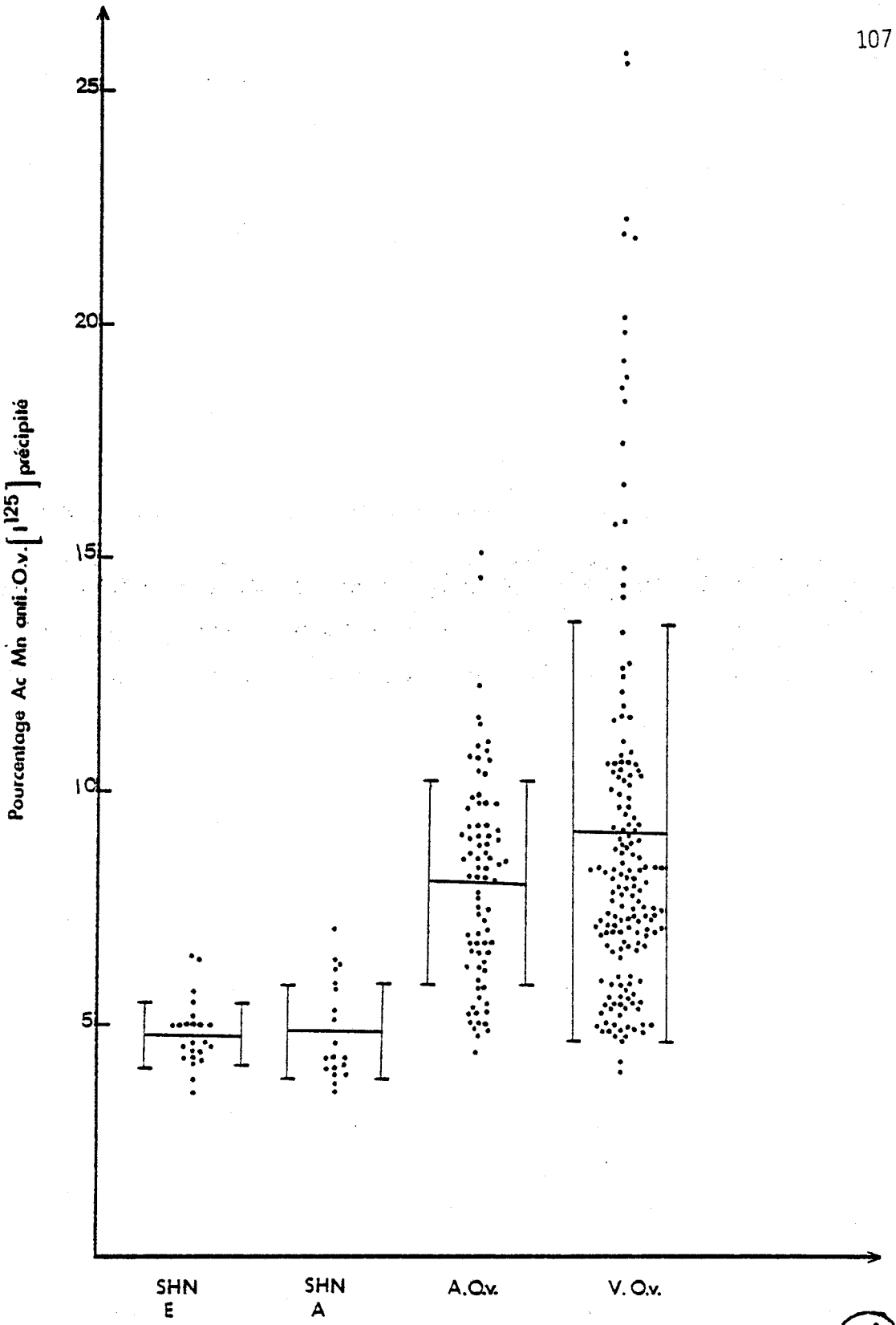


Figure 11 : Courbe dose-réponse de l'Ag Ov dans du sérum humain normal (SHN) en RIPEGA utilisant une IgM monoclonale (Mn) anti-*O. volvulus*.



BUS LILLE

Figure 12 : Détection d'ACO par le RIPEGA utilisant un anticorps monoclonal (Ac Mn) dans le sérum de patients atteints d'onchocercose ;SHN-E : sérums humains normaux d'Européens ; SHN-A : sérums humains normaux de sujets sains Africains ; A Ov : sérums de sujets Africains atteints d'Onchocercose ; V. Ov : sérums d'Indiens du Vénézuéla vivant en zone d'endémie onchocerquienne.

3 - Corrélation entre l'ACO et les données parasitologiques

Cette étude de corrélation a été réalisée sur les sérums rapportés du Vénézuéla. En effet, pour chaque personne étudiée, ont été notés : le sexe, l'âge, le nombre de nodules palpables et la microfilarodermie déterminée par les biopsies cutanées exsangues.

Aucune corrélation directe n'a pu être faite entre le taux d'antigène circulant et la microfilarodermie. Cependant, la séparation par tranches d'âge de 10 en 10 (Tableau 10) permet plusieurs observations intéressantes. Le pourcentage des cas présentant des nodules palpables semble augmenter avec l'âge. Ceci est également le cas pour le pourcentage de cas ayant une microfilarodermie positive. Cette augmentation avec l'âge n'est pas retrouvée pour le pourcentage de patients dans lesquels l'antigène circulant a pu être détecté. L'information la plus importante apportée par ce tableau est le fait que l'on puisse déceler les antigènes circulants à l'aide de l'IgM monoclonale sélectionnée, chez 21 des 23 enfants de moins de 10 ans, soit 91 % des cas alors que le diagnostic parasitologique par la détection de microfilaires n'est positif que chez 12 de ces 23 cas, soit 52 %.

Age	Nombre total de cas	Nombre de cas avec nodules	Nombre de cas avec de l'ACO	Nombre de cas à microfilarodermie positive
< 10	23	4 (17 %)	21 (91 %)	12 (52 %)
10 - 20	48	9 (18 %)	40 (83 %)	37 (77 %)
21 - 30	36	5 (13 %)	23 (64 %)	31 (85 %)
31 - 40	29	14 (48 %)	16 (55 %)	27 (93 %)
> 40	21	12 (57 %)	16 (76 %)	21 (100 %)

Tableau 10 : Corrélation entre la présence d'ACO et les données parasitologiques

BUS LILLE

Le Tableau 11 nous permet une étude plus approfondie des relations entre microfilarodermie, âge et présence d'ACO. Le nombre de microfilaires détectées par milligramme de peau variant de 0 à 3105, il a été jugé nécessaire de diviser la microfilarodermie en quatre groupes selon le nombre de microfilaires par milligramme de peau : a) microfilarodermie négative ; b) faible (<20) ; c) moyenne (20 à 500) ; d) et élevée (>500). Pour chacun de ces quatre groupes, nous est donné le nombre de cas rentrant dans chaque catégorie (avec le pourcentage par rapport au nombre total de cas), puis le nombre de ces cas dans lesquels l'ACO est présent (avec le pourcentage par rapport au nombre de cas de la catégorie). Cette étude est réalisée par rapport aux tranches d'âge précédemment définies et également dans la dernière colonne, sans tenir compte de l'âge (0 - 70 ans). Les résultats exprimés dans ce tableau montrent également le manque de corrélation entre la présence d'ACO et l'âge, ce qui avait été observé dans le tableau précédent. On observe que l'ACO est présent chez quasiment tous les individus (14 sur 15, soit 93 %) présentant une microfilarodermie élevée (>500 microfilaires/mg de peau). L'information importante de ce tableau et qui confirme celle du tableau précédent montre la détection d'ACO. Chez 24 des 29 cas (soit 83 %) présentant une microfilarodermie négative.

Dans les catégories b et c, il faut noter que l'on ne détecte l'ACO que dans 74 et 71 % des cas, respectivement. Par conséquent, il y a 27,5 % (26 et 29 % respectivement) des cas où le diagnostic parasitologique par les biopsies cutanées est positif mais où l'on ne détecte pas d'antigènes circulants dans le sérum.

AGE		< 10	10 - 20	21 - 30	31 - 40	> 40	0 - 70
Nombre total de cas		25	46	38	26	19	154
Microfilarodermie	a Nbre de cas **	13 (52 %)	11 (24 %)	5 (13 %)	0	0	29 (18 %)
	a présence d'ACO ***	12 (92 %)	9 (81 %)	3 (60 %)	-	-	24 (83 %)
	b Nbre de cas	7 (28 %)	16 (35 %)	3 (8 %)	5 (19 %)	0	31 (20 %)
	b présence d'ACO	6 (85 %)	13 (81 %)	2 (67 %)	2 (40 %)	-	23 (74 %)
	c Nbre de cas	5 (20 %)	18 (39 %)	25 (66 %)	19 (73 %)	12 (63 %)	79 (51 %)
	c présence d'ACO	5 (100 %)	16 (89 %)	14 (56 %)	12 (63 %)	9 (75 %)	56 (71 %)
	d Nbre de cas	0	1 (2 %)	5 (13 %)	2 (8 %)	7 (37 %)	15 (10 %)
	d présence d'ACO	-	1 (100 %)	5 (100 %)	2 (100 %)	6 (85 %)	14 (93 %)

BUS LILLE

Tableau 11 : Corrélation entre la présence d'ACO et les taux de la microfilarodermie

* groupes présentant les valeurs de la microfilarodermie suivantes (en nombre de microfilaires/mg de peau) : a = négatif ; b = faible, < 20 ; c = moyen, 20-500 ; d = élevé, > 500

** les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage par rapport au nombre total de cas de la catégorie d'âge

*** Les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage de cas avec de l'ACO par rapport au nombre de cas du groupe

4 - Spécificité du RIPEGA utilisant l'IgM Mn pour la détection de COA

La spécificité du RIPEGA utilisant l'IgM Mn anti-*O. volvulus* pour la détection de COA a été étudiée en testant des sérums de sujets atteints de diverses parasitoses en même temps qu'un certain nombre de SHN et de sérums d'Onchocerquiens connus.

La Figure 13 représente graphiquement les résultats obtenus. Les moyennes et écarts-types représentés sur le graphique sont les suivants : SHN : $\bar{x} = 4.02 \pm 0.53$

SOv : $\bar{x} = 7.06 \pm 2.6$

Sérum d'Onchocercose bovine : $\bar{x} = 3.7 \pm 0.3$
(*O. gutturosa* ; *O. lienalis* ; *O. gibsoni*)

Sérums de patients infectés par

Brugia malayi : $\bar{x} = 4.62 \pm 1.53$

Loa loa : $\bar{x} = 4.33 \pm 0.75$

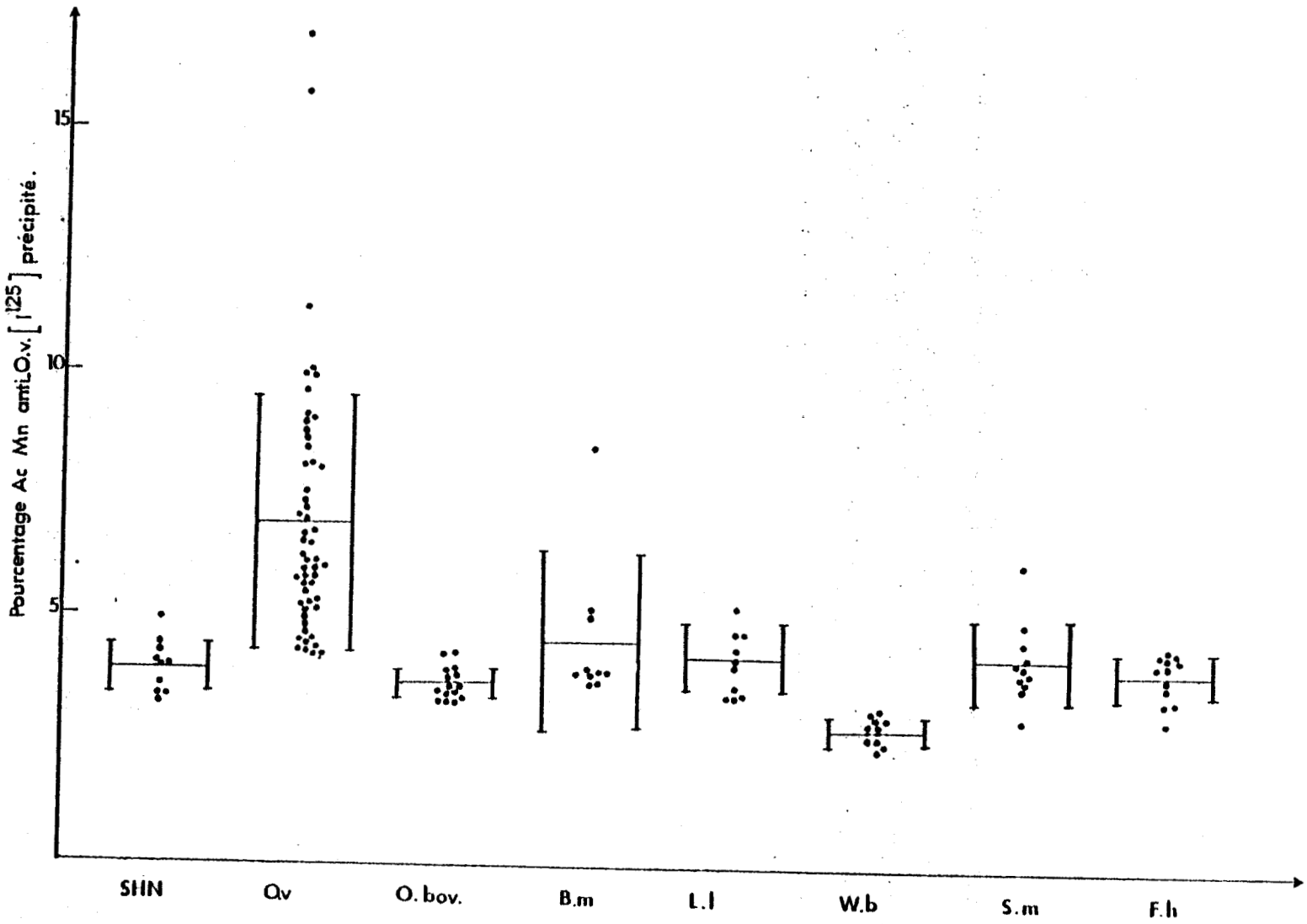
Wuchereria bancrofti : $\bar{x} = 2.86 \pm 0.28$

Schistosoma mansoni : $\bar{x} = 4.28 \pm 0.83$

Fasciola hepatica : $\bar{x} = 4.01 \pm 0.47$

L'analyse statistique de ces résultats nous montre qu'il existait une différence significative ($F = 14.84$; $p < 0.001$) entre les sérums d'Onchocerquiens et ceux des contrôles d'une part, et des diverses parasitoses d'autre part.

Cependant, il faut noter que quelques sérums ont des valeurs plus élevées que le seuil de positivité fixé comme étant égal à la moyenne des SHN additionnés de deux fois l'écart-type. Ces cas sont peu



BUS LILLE

Figure 13 : Etude de la spécificité du dosage radioimmunologique (RIPEGA) pour la détection d'antigène circulant de l'Onchocercose (ACO). SHN : sérums humains normaux ; Ov : Sérums de patients infectés avec O. volvulus ; O. bov : sérum de bovins atteints d'Onchocercose bovine ; ainsi que des sérums de patients infectés respectivement avec Brugia malayi (B.m) ; Loa loa (L.l) ; Wuchereria bancrofti (W.b), Schistosoma mansoni (Sm) et Fasciola hepatica (F.h).

nombreux mais étant donné le petit nombre de sérums étudiés, ils représentent des pourcentages élevés. C'est surtout le cas pour les sérums de patients infectés par B. malayi où 3 cas sur 10 sont au-dessus du seuil de positivité, mais également dans 1 cas sur 10 pour les patients infectés avec L. loa et S. mansoni.

Il aurait été intéressant d'étudier des sérums de patients infectés par des parasitoses intestinales (Ascaridiose, Ankylostomose) car les patients onchocerquiens sont porteurs de ces maladies. Malheureusement, ceci n'a pas été possible. Néanmoins, nous avons pu nous procurer quelques sérums de réfugiés asiatiques parasités par des helminthiases intestinales et dans quelques cas également atteints de paludisme. Sur les 6 cas étudiés, un des sérums (17 %) montrait une réaction croisée, ayant une valeur près de deux fois supérieure à la moyenne des SHN.

Une IgM humaine marquée à l'^{125}I a été utilisée dans les mêmes conditions d'expérience pour vérifier que la radioactivité observée dans les cas de réactions croisées n'était pas dues à la formation d'un complexe entre des auto-anticorps anti-IgM et l'IgM ^{125}I.

VIII - DETECTION DE COMPLEXES IMMUNS CIRCULANTS DANS LES SERUMS

1 - Etude de sérums onchocerquiens

Les sérums onchocerquiens rapportés du Vénézuéla ont également été étudiés pour la présence de complexes immuns circulants (CIC). Les résultats sont représentés graphiquement Figure 14. Les moyennes et écarts-types sont les suivantes :

SHN : $\bar{x} = 29.11 \pm 2.54$

SOv : $\bar{x} = 37.07 \pm 8.82$

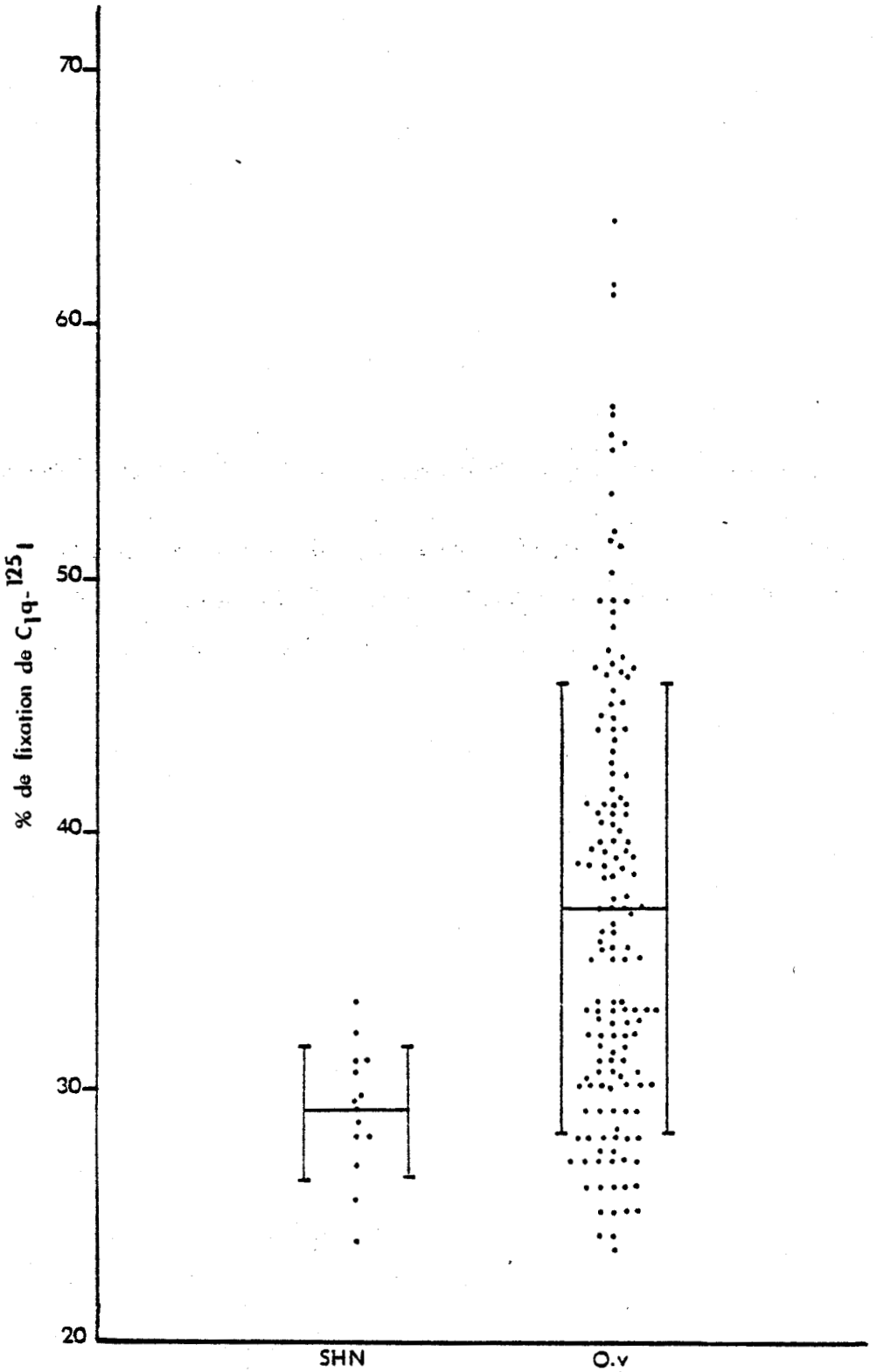


Figure 14 : Détection de complexes immuns circulants (CIC) par la technique du Clq radiomarqué. SHN : sérums humains normaux ; Ov : sérums de patients onchocerquiens.

Le test de Fischer-Student nous permet d'affirmer que le taux de CIC de ces deux population est significativement différent, avec une probabilité d'erreur inferieur à 0.001.

2 - Corrélation entre l'ACO et les CIC

Un test de corrélation par régression linéaire a été effectué pour comparer les Ln des taux de COA à ceux des CIC dans la population vénézuélienne étudiée. La figure 15 nous montre qu'il y a une corrélation entre ces deux facteurs sériques, avec une droite ayant pour équation :

$$\text{Ln } y = 20.852 + 0.259 \text{ Ln } x$$

IX - SPECIFICITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL IA_2-23

1 - En Immunodiffusion (DDG)

L'IgM Mn IA_2-23 étant capable de former un arc de précipitation vis-à-vis de l'Ag Ov en DDG, sa capacité de reconnaissance d'autres antigènes a pu être analysée par cette méthode.

La Photo 10 montre que cet anticorps monoclonal reconnaît certaines fractions antigéniques solubles de certains nématodes tels que *Dipetalonema viteae* (2), *Ascaris suum* (3), *Toxocara canis* (4) et *Panagrellus* species (un nématode libre utilisé pour le diagnostic immunologique des ankylostomoses et anguilluloses) mais ne réagit pas avec les antigènes du nématode *Trichinella spiralis* (6) et d'un trématode *Fasciola hepatica* (7) dans nos conditions expérimentales.

Sur la Photo 11, on peut voir une faible réaction positive avec l'extrait antigénique soluble de *Taenia saginata* (8) mais pas avec les antigènes solubles du liquide hydatique (1) (*E. granulosus* - autre cestode).

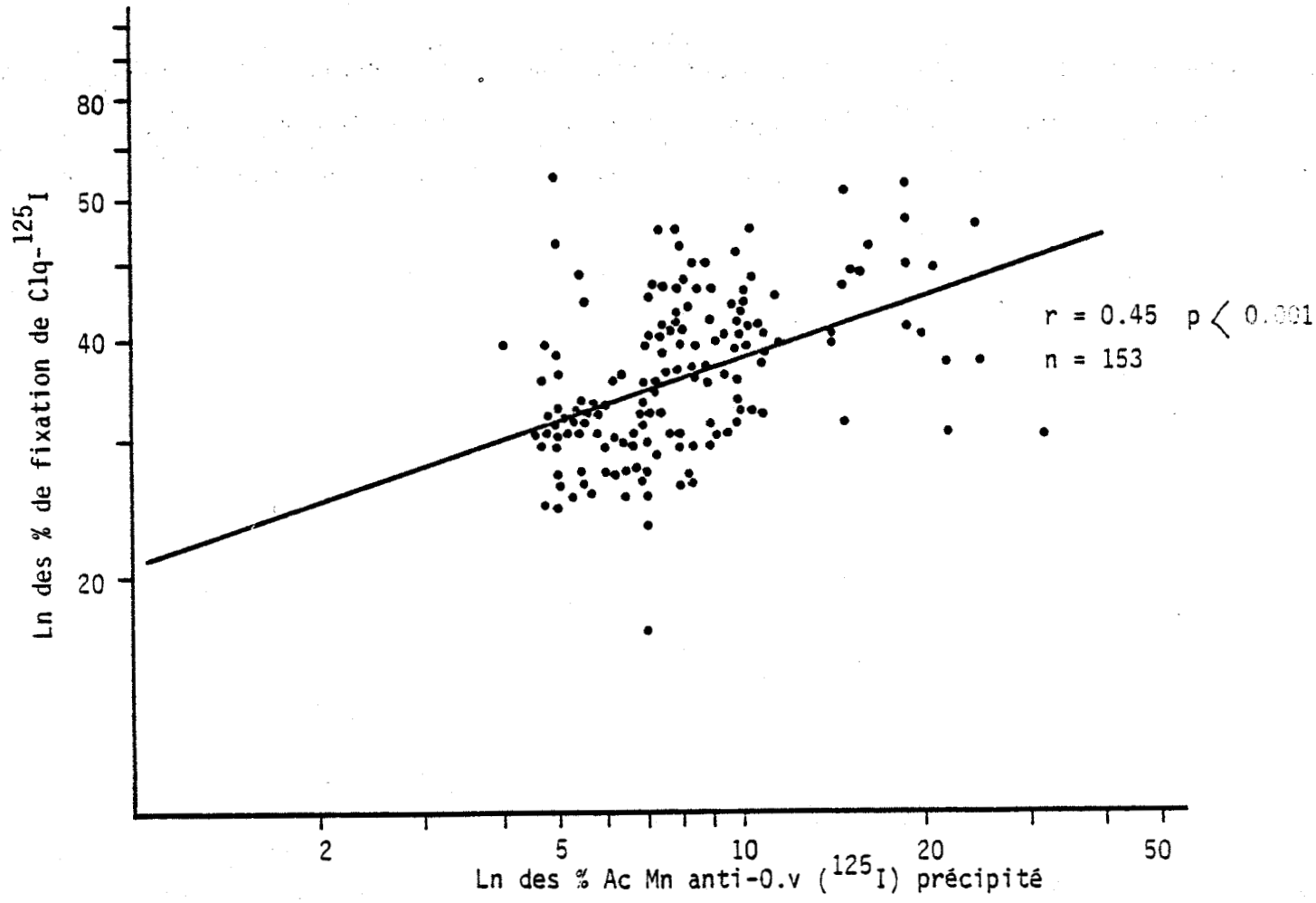


Figure 15 : Représentation graphique de la corrélation entre antigènes circulants de l'Onchocercose (ACO) dosés par le RIPEGA et complexes immuns circulants (CIC) dosés par le test de liaison au Clq marqué.

BUS LILLE

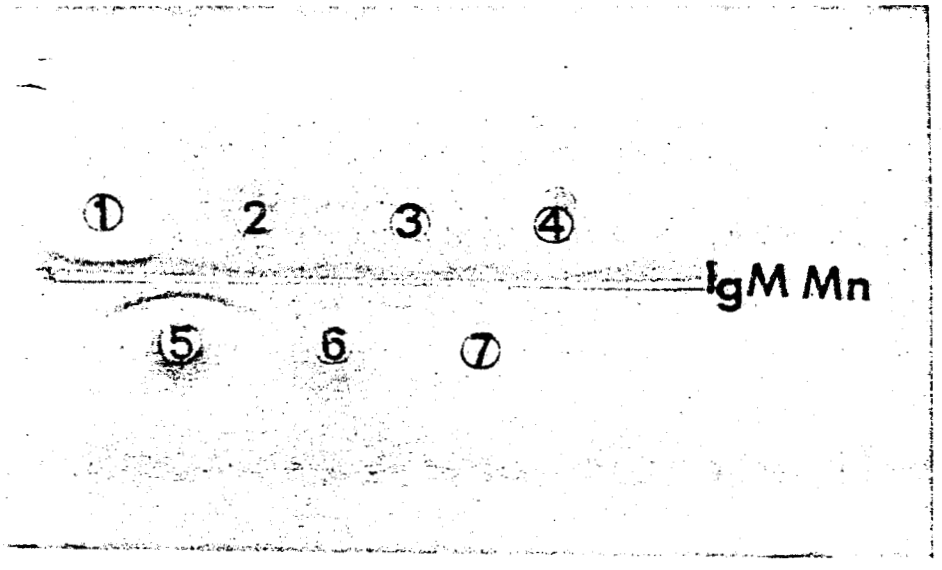


Photo 10 : Double diffusion en gel opposant l'IgM monoclonale (Mn) (4 µg/10 µl) aux antigènes suivants (2 mg/100 µl) :

1 : O. volvulus

2 : Dipetalonema viteae

3 : Ascaris suum

4 : Toxocara canis

5 : Panagrellus species

6 : Trichinella spiralis

7 : Fasciola hepatica

BUS LILLE

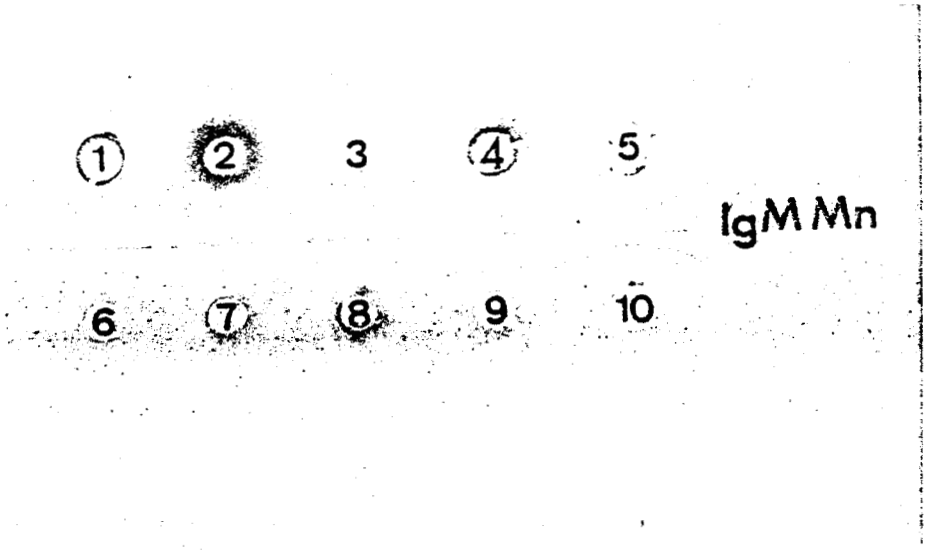


Photo 11 : Double diffusion mettent en évidence une réaction positive entre l'IgM (Mn) (4 µg/10 µl) et certains antigènes parasitaires (2 mg/100 µl).

1 - Liquide hydatique de Echinococcus granulosus

2 - Toxoplasma gondii

3 - Aspergillus fumigatus

4 - Aspergillus flavus

5 - Alternaria tenuis

6 - Penicillium notatum

7 - Mucor mucedo

8 - Taenia saginata

9 - Trypanosoma cruzi

10 - O. volvulus

BUS LILLE

Aucune réaction n'est observée avec les antigènes solubles de protozoaires et de champignons testés. Bien que ces deux lames de DDG montrent que les réactions croisées ne sont observées qu'avec certains antigènes d'helminthes, il a été jugé utile de confirmer qu'il s'agissait bien d'une réaction antigène-anticorps et non d'une réaction due à une "C-reactive protein" (CRP) qui réagirait avec la substance C contenue dans la plupart des antigènes parasitaires, y compris ceux des protozoaires et des champignons. Cette réaction ne donne pas lieu à une réaction antigène-anticorps vraie mais à une floculation qui doit normalement disparaître après immersion des lames dans du tampon citrate de sodium pendant 3 heures. Les résultats (Photos 12 et 13) confirment qu'il ne s'agit pas d'une CRP. En effet, si on oppose un sérum anti-CRP à un sérum humain contenant de la CRP (Photo 12), on observe une réaction. On peut remarquer sur la Photo 13 qu'il n'y a pas de réaction entre cet antisérum anti-CRP et l'anticorps monoclonal IA_2 23 purifié. Les systèmes précipitants observés avec certains antigènes d'helminthes (D. viteae, A. suum, T. canis, Panagrellus sp, T. saginata) sont donc dues à une réaction immunologique. L'anticorps monoclonal IA_2-23 reconnaît donc un déterminant antigénique présent dans certains des antigènes de nématodes testés mais également dans celui d'un cestode T. saginata, dans nos conditions expérimentales.

2 - En ELISA

La spécificité de l'Ac Mn $IA_2$23 a été analysée en ELISA vis-à-vis de plusieurs antigènes parasitaires. Une analyse du Tableau 12 montre que cet anticorps reconnaît un déterminant antigénique qui est également présent dans l'antigène de Toxocara canis, Panagrellus, Dipetalonema viteae, Ascaris suum et Taenia saginata.

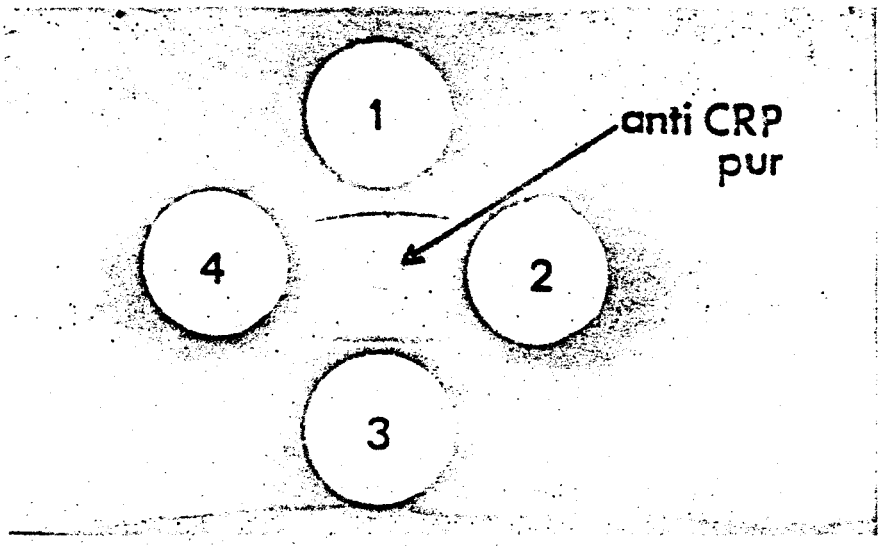


Photo 12 : Vérification de l'activité du sérum anti-CRP en DDG vis-à-vis de sérum (1 - 4) pouvant présenter la "C réactive protéine".

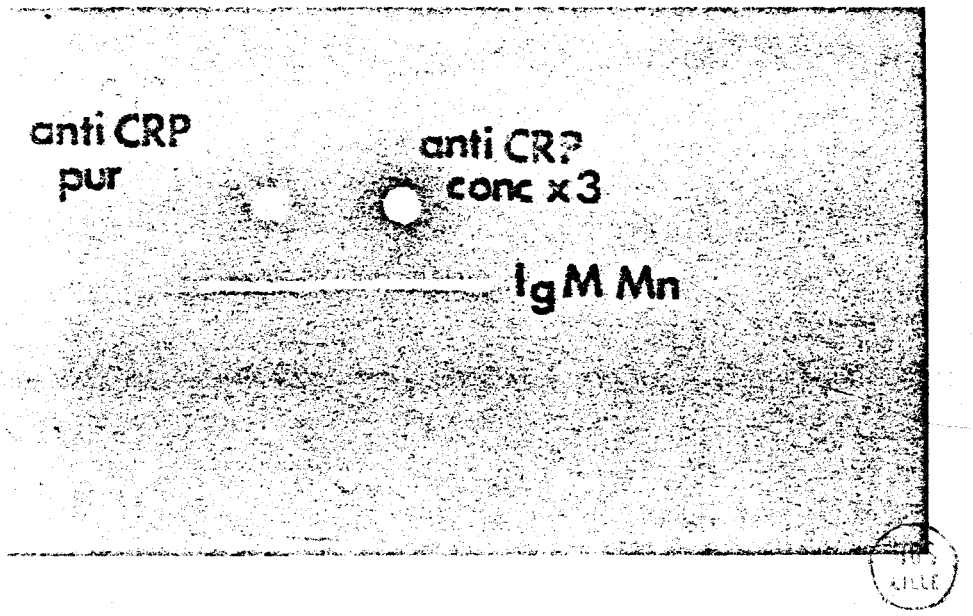


Photo 13 : Double diffusion en gel opposant l'IgM monoclonale (Mn) IA_2 23 à deux concentrations de sérum anti-CRP.

Antigène	Sérum +	IA2-23	IR 983F	Blanc
Schistosoma mansoni	2	0,08	0,073	0,17
Toxocara canis	2	0,74 *	0,093	0,13
Panagrellus	2	0,73 *	0,08	0,17
Trichinella spiralis	2	0,08	0,05	0,05
Dipetalonema viteae	2	1,9 *	0,08	0,16
Ascaris suum	2	0,68 *	0,02	0,11
Liquide hydatique	2	0,15	0,04	0,10
Fasciola hepatica	1,97	0,05	0,02	0,05
Taenia saginata	2	1,00 *	0,06	0,15

Tableau 12 : Spécificité de l'Ac Mn IA2-23 en ELISA. L'antigène est fixé à 5 µg/ml. Les sérums positifs proviennent soit de patients, soit de lapins.
* Représente les valeurs jugées positives.

BUS LILLE

3 - En RIPEGA

La spécificité telle qu'elle est jugée par le RIPEGA concerne uniquement la reconnaissance d'un déterminant antigénique présent dans l'antigène circulant dans le sérum. Les résultats ont été rapportés précédemment (Chapitre V - VII - 4).

X - ESSAI DE MISE EN EVIDENCE D'ACO DANS LES URINES PAR RIPEGA

1 - Mise au point

Comme pour la détection d'ACO dans le sérum, il a été nécessaire d'établir une courbe de solubilité de l'Ac Mn I^{125} dans le milieu urine. Nos premiers essais nous ont révélé que dans un milieu urine pur on ne précipite que 50 % des protéines marquées avec du TCA 20 %. Il s'est donc avéré nécessaire de réaliser l'expérience dans un mélange de sérum et d'urine. En effet, cet apport en protéine aide à la précipitation des immunoglobulines marquées et on obtient ainsi un témoin TCA représentant près de 80 % de la radioactivité initiale. Par la suite, toutes les expériences ont été réalisées avec 100 µl de sérum dilué au 1/2.5e ajoutés aux 100 µl d'urine à tester.

La Figure 16 montre la cinétique de précipitation de l'Ac Mn I^{125} dans un mélange urine + SHN 1/2.5e.D'après cette courbe, la concentration de 5 % de PEG a été sélectionnée.

Au cours des diverses expériences de mise au point de ce test, il a été montré que des urines de sujets sains, concentrées mais non dialysées pouvaient donner des pourcentages de précipitation de l'Ac Mn I^{125} allant jusqu'à 55 %. Ces mêmes urines, après 48 heures de dialyse contre de l'eau distillée donnaient des taux voisins de 5 %. Il est à noter que les écarts

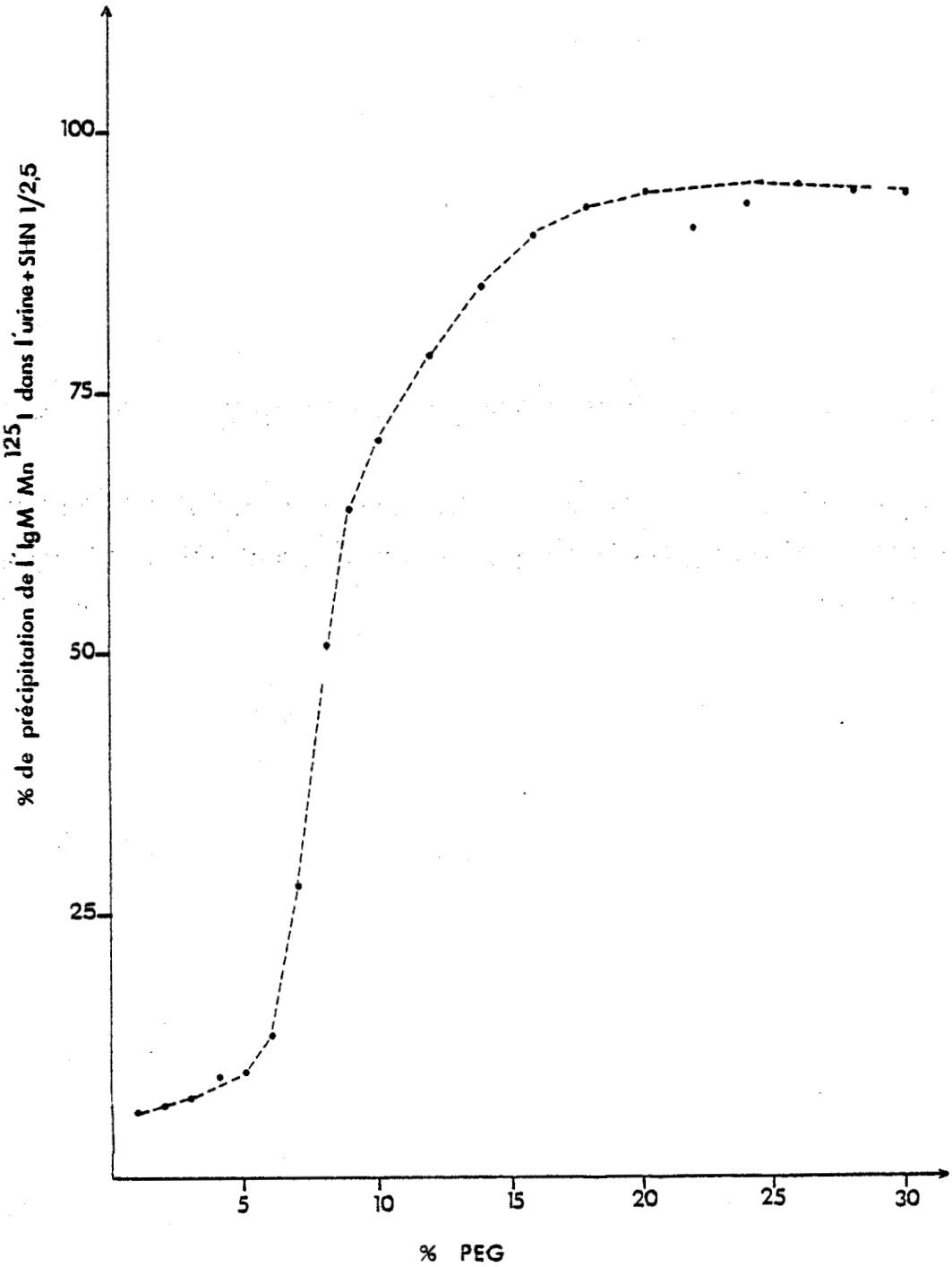


Figure 16 : Courbe de précipitation de l'anticorps monoclonal anti-O. volvulus (Ac Mn - anti-O.v) en milieu sérum + urine,dans dans différentes concentrations de polyéthylène glycol (PEG).

BUS LILLE

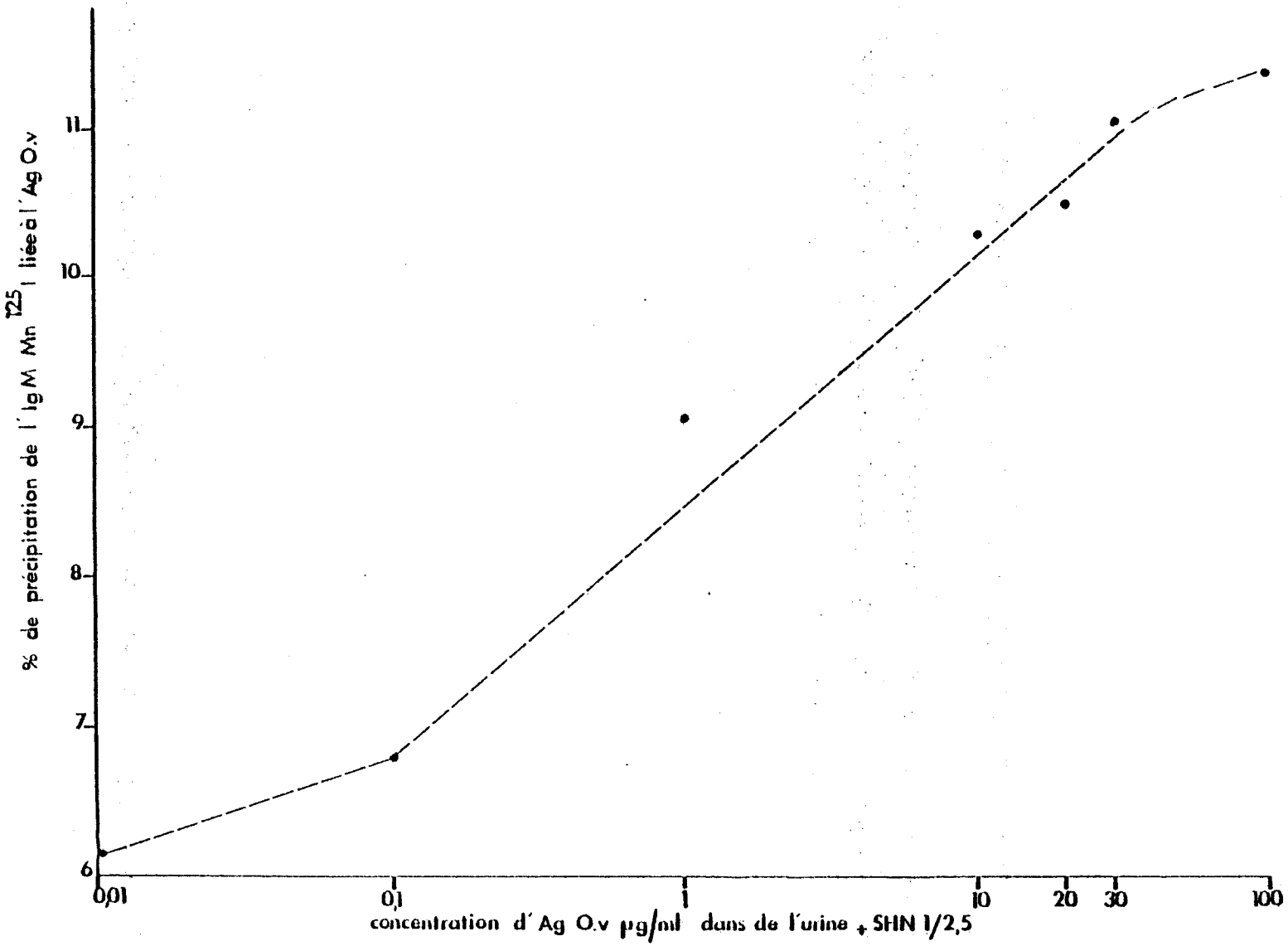


Figure 17 : Courbe dose-réponse de l'Ag Ov en milieu urine + sérum, en RIPEGA utilisant une IgM monoclonale (Mn) anti-*O. volvulus*.

types des urines témoins restaient toujours importants. Les urines de patients européens atteints de protéinurie n'entraînaient pas de pourcentage de précipitation plus élevé.

Une courbe dose réponse a été établie à partir d'Ag Ov dilué dans un pool d'urine témoin. Elle est représentée Figure 17. L'augmentation du pourcentage de précipitation de l'Ac Mn I^{125} en fonction de la concentration d'antigène indiqué qu'il est possible de doser de l'antigène en milieu urine + sérum par la technique du RIPEGA.

2 - Etude d'urine de patients onchocerquiens

Des urines de patients onchocerquiens concentrées 10 fois ont été étudiées dans ces mêmes conditions. La moyenne et l'écart type des urines témoins sont de 3.63 $\pm$ 0.9. On peut établir le seuil de positivité comme étant la moyenne additionnée de deux fois l'écart type soit supérieure à 5.43. Sur les 25 urines étudiées, une seule, lors de deux expériences différentes, s'est avérée être au-dessus de ce seuil avec une valeur de 5.77. La moyenne et l'écart type des 25 urines étudiées sont de 3.75 $\pm$ 1.09. La différence entre les urines O.v et les témoins n'est pas statistiquement significative ($p = 0.4$). Il semble donc que l'antigène détecté par l'anticorps monoclonal IA_2-23 ne soit pas présent dans les urines de patients onchocerquiens ou qu'il soit présent sous une forme non décelable par cette technique.

XI - DETECTION D'ACO PAR DES TECHNIQUES DIRECTES (SRIA)

1 - Choix du support

Le choix du support (billes ou plaques) a été fait d'après les courbes doses-réponses obtenues à partir des mêmes solutions d'antigène

dissous dans du SHN. Les conditions de réalisation ont été celles définies comme optimales pour chacun des tests. La superposition des deux courbes (Fig. 18) montre que l'on atteint un plateau beaucoup plus rapidement avec des plaques en polyvinyl chloride
Cependant, ce même support semble apporter de meilleurs résultats quant à la sensibilité du test. Etant données les faibles concentrations d'antigène circulant présentes dans le sérum de patients onchocerquiens, cette dernière caractéristique est plus importante. Le seuil de détection du SRIA-P se situe donc aux environs de 0.1 µg/ml d'Ag Ov.

2 - Etude de sérums de patients onchocerquiens

Les résultats obtenus sont représentés graphiquement Figure 19. Les moyennes et écarts types sont les suivants :

SHN : $\bar{x} = 1.37 \pm 0.15$

SOv : $\bar{x} = 2.34 \pm 1.71$

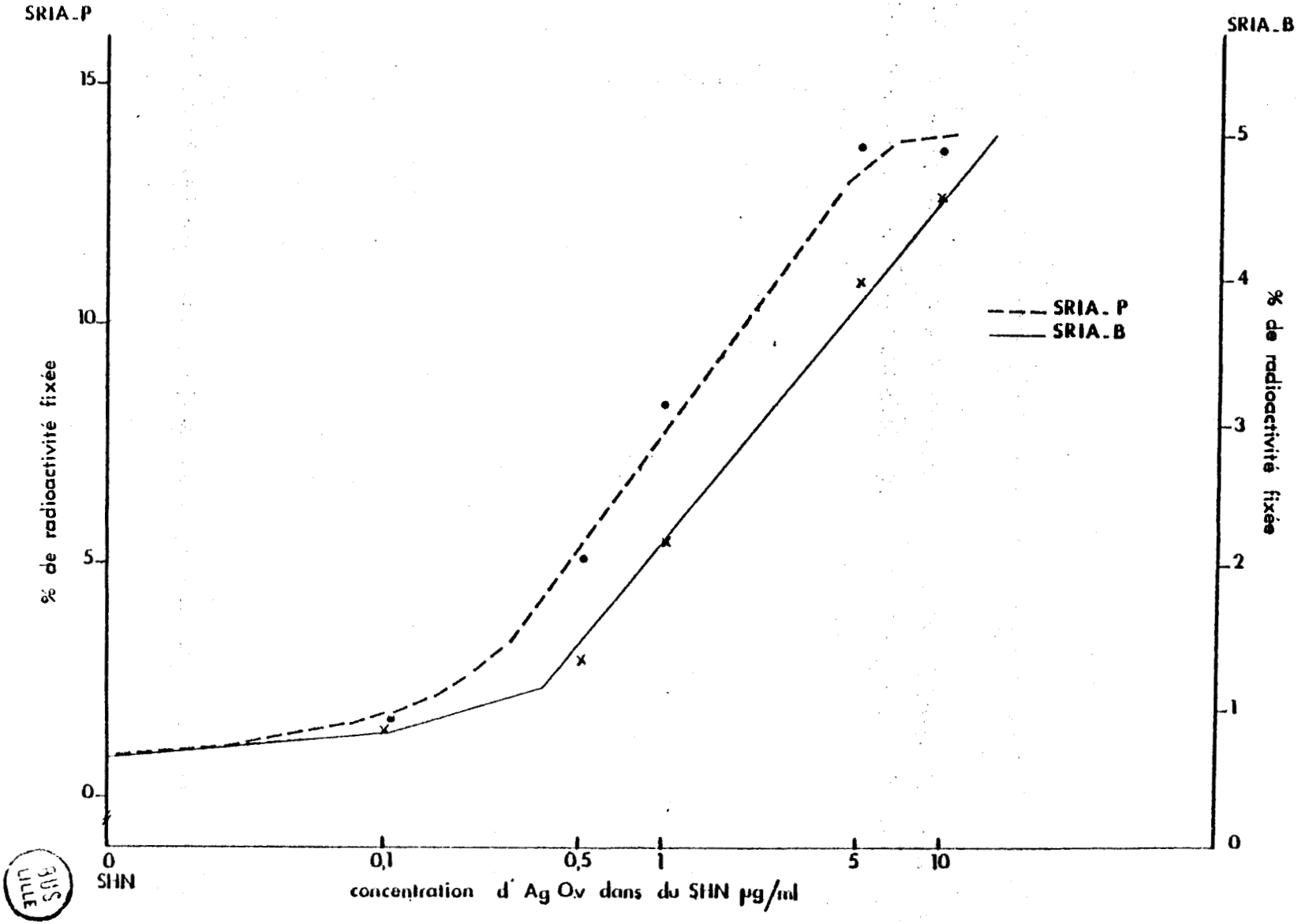
La différence est significative avec une probabilité d'erreur inférieure à 0.009.

Si l'on considère comme positive toute valeur supérieure à 1.67 on détecte de l'antigène circulant par cette technique dans 57 % des cas. Cette technique est reproductible et les plaques sur lesquelles l'anticorps a été fixé peuvent être conservées à 4°C après lavage et séchage à température ambiante.

XII - DONNEES BIOCHIMIQUES SUR L'ANTIGENE CIRCULANT

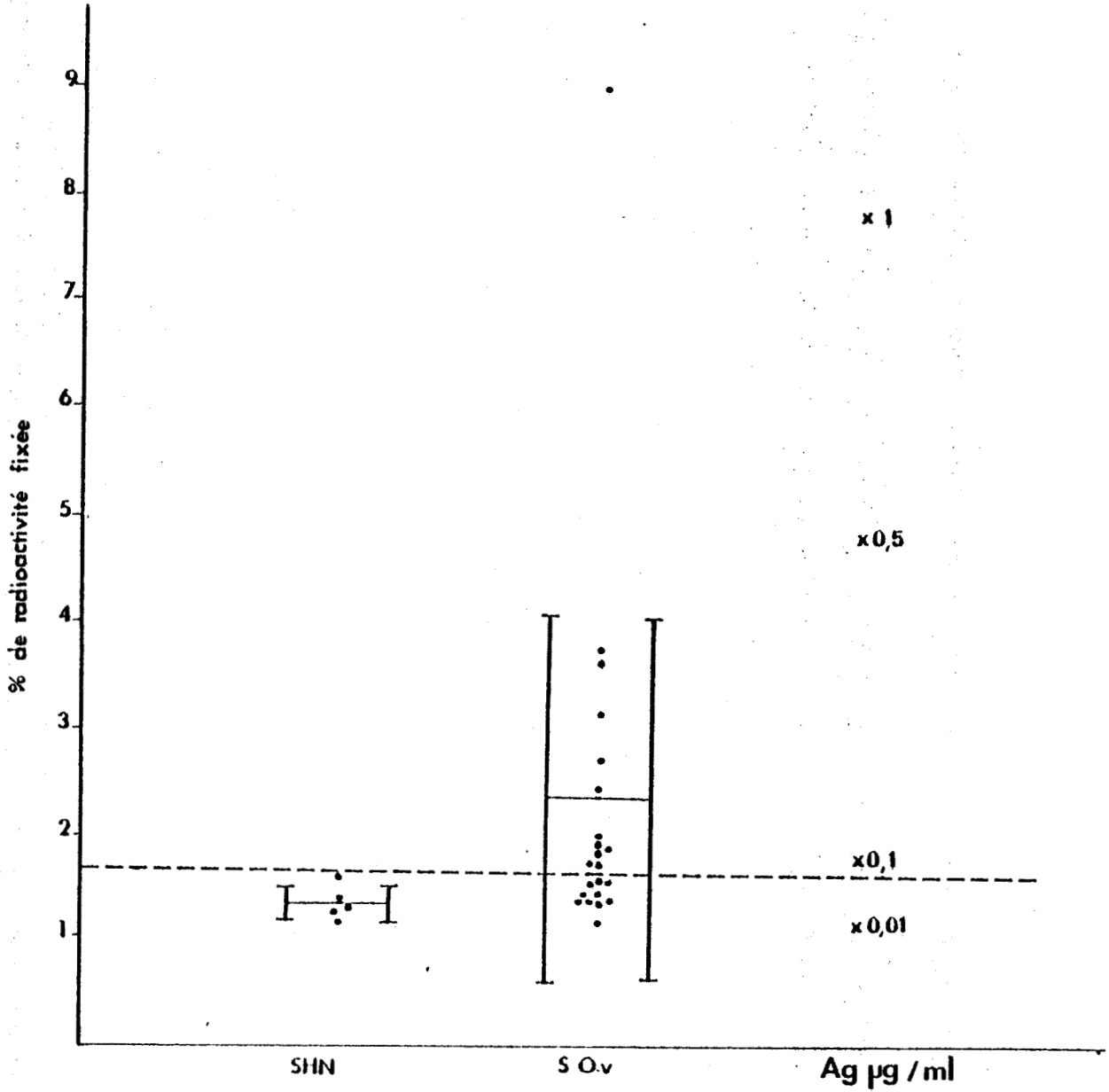
1 - Analyse par immunoprécipitation

La lame de DDG représentée Photo 14 montre qu'il est possible d'obtenir un arc de précipitation en gel entre l'anticorps monoclonal $IA_2 23$ et l'Ag TCAs. Les anticorps monoclonaux ne reconnaissant qu'un



BUS LILLE

Figure 18 : Comparaison de techniques indirectes de dosage d'Ag Ov dans du sérum humain normal (SHN) sur plaques (SRIA-P) et sur billes (SRIA-B).



SHS LILLE

Figure 19 : Détection d'ACO dans le sérum de patients onchocerquiens (S-Ov) par une technique radioimmunologique sur plaques (SRIA-P). SHN : sérums humains normaux ; Ag µg/ml : concentrations d'Ag Ov dilué dans le SHN ; seuil de positivité (------).

seul déterminant antigénique, il est très difficile d'obtenir un réseau de précipitation que l'on peut visualiser sans avoir recours à des agents précipitants tel le PEG. La capacité de cet anticorps monoclonal de former un réseau de précipitation visible avec l'Ag TCAs est une indication que le déterminant antigénique reconnu est répétitif. Il faut noter également que toutes les tentatives de précipitation entre cet anticorps monoclonal et un sérum ou une urine de patients onchocerquiens (concentré au maximum) n'ont jamais donné lieu à des arcs visibles.

La Photo 15 montre que l'Ag TCAs est stable à la chaleur puisque le déterminant antigénique est toujours reconnu après un chauffage à 100°C pendant une demi-heure.

2 - Analyse par filtration sur gel

Après passage de l'Ag Ov sur colonne de gel filtration ACA 44 les différentes fractions sont fixées sur des plaques en polyvinyl chloride et analysées par l'anticorps Mn I^{125} suivant une technique radio-immunologique (RIA). . L'histogramme de la Figure 20 représente la capacité de l'anticorps monoclonal IA223 de reconnaître les différentes fractions de l'antigène. D'après la décroissance progressive de la radioactivité, il apparaît que le déterminant antigénique reconnu par cet anticorps monoclonal n'est pas spécifique d'un poids moléculaire donné. En effet, à partir d'un poids moléculaire de 60,000, la radio-activité augmente avec le poids moléculaire des fractions, indiquant que le déterminant antigénique reconnu est répétitif.

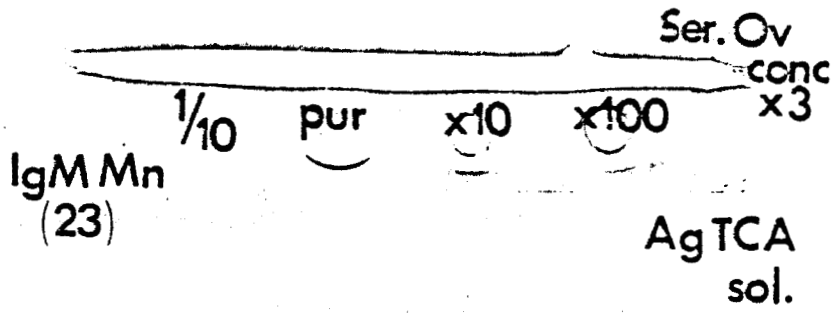


Photo 14 : Double diffusion en gel opposant différentes concentrations de l'IgM monoclonale (Mn) IA_2 23 à l'antigène TCA soluble (2 mg/100 µl) et à un sérum de patient onchocerquien présentant de l'antigène circulant.

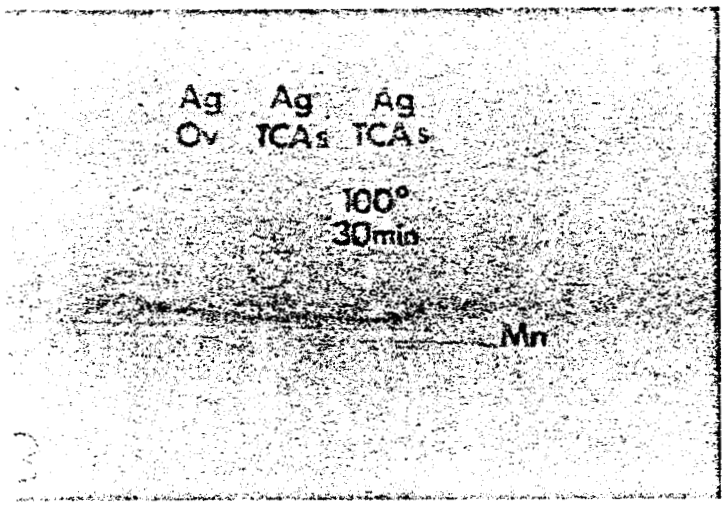
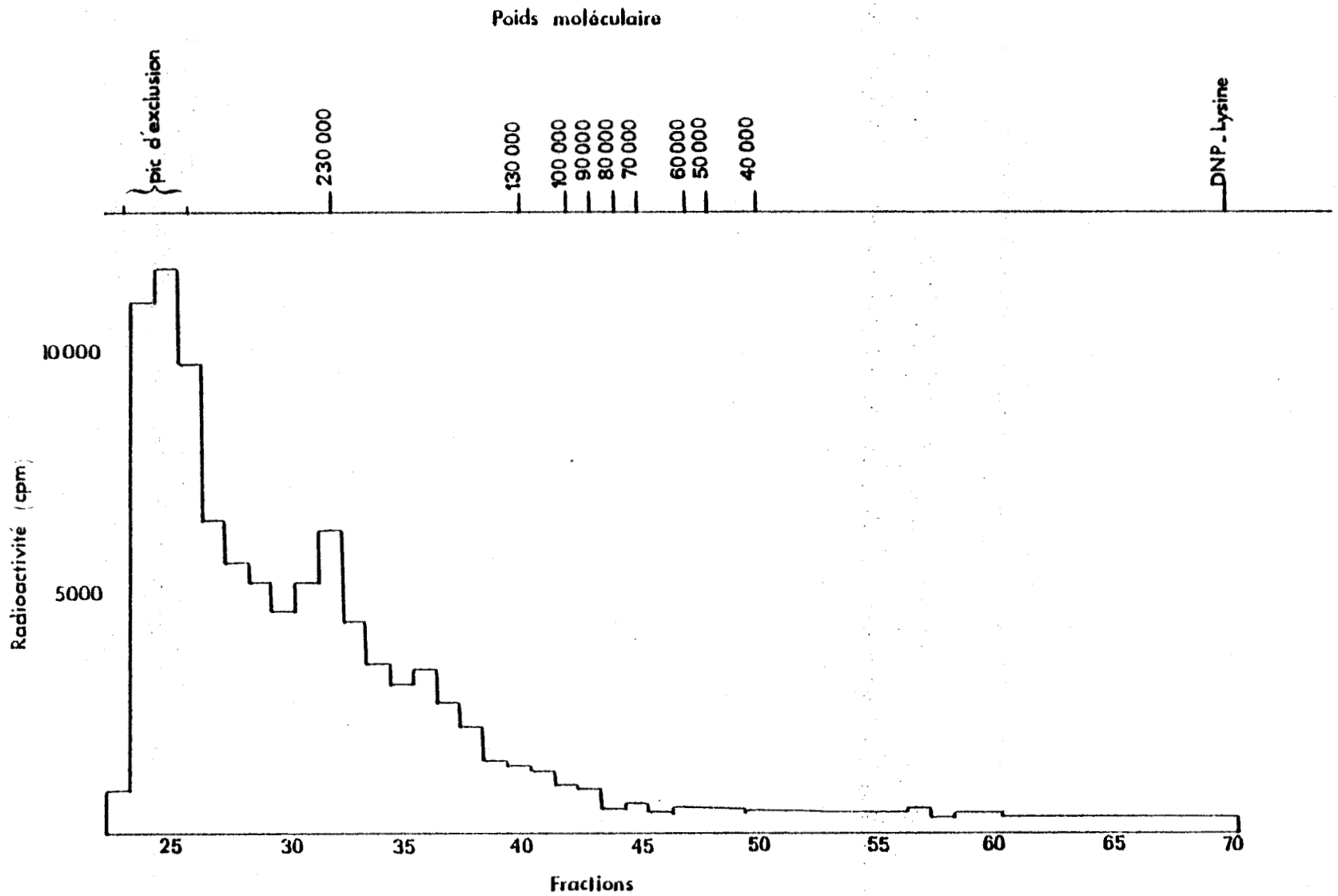


Photo 15 : Double diffusion en gel mettant en évidence la stabilité à la chaleur du déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal (Mn).



BIUS LILLE

Figure 20 : Analyse radioimmunologique par l'anticorps monoclonal IA2-23, des fractions obtenues après filtration de l'Ag Ov sur gel ACA 44.

3 - Analyse par migration en gel

La migration en gel de l'antigène TCA soluble apporte une preuve indirecte sur la nature de l'antigène circulant. La forte coloration par le Schiff, et une coloration plus faible par le bleu de Coomassie (Photo 16) indique qu'il s'agit essentiellement d'un polysaccharide.

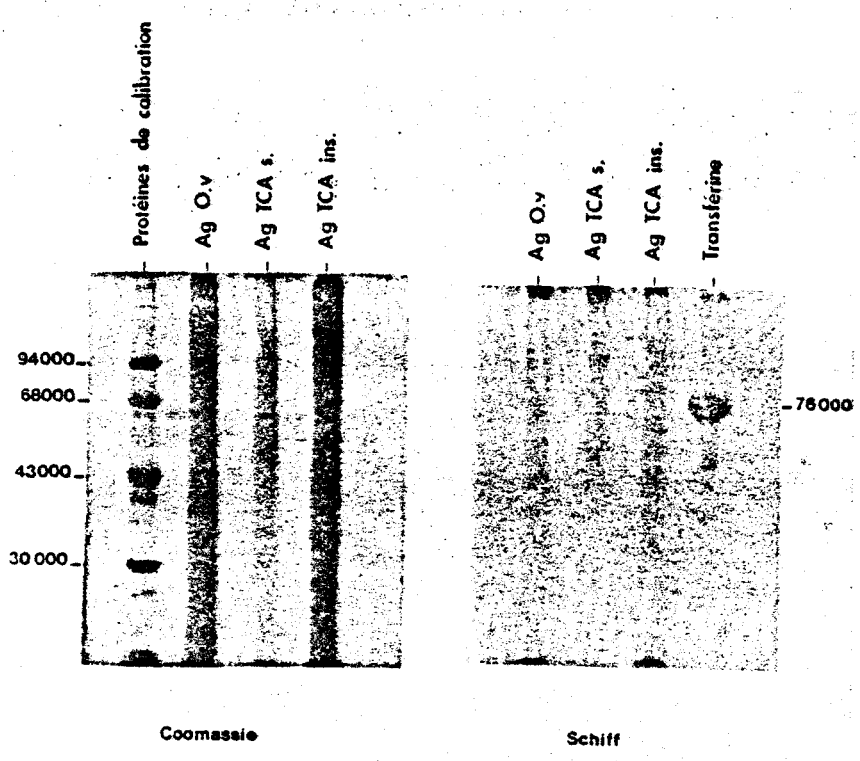


Photo 16 : Electrophorèse en gel de polyacrylamide SDS colorée par le Schiff et le bleu de Coomassie.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

I - PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-*O. VOLVULUS*

La fusion cellulaire est une phase technique où le hasard joue un rôle important et qui, par conséquent, est difficilement contrôlable. Pour la production d'anticorps monoclonaux d'une spécificité donnée, on immunise des rats avec un antigène soluble dans lequel l'antigène à étudier ne représente qu'un faible pourcentage. On n'obtient donc qu'un petit nombre de cellules de rates produisant des anticorps contre l'antigène circulant de l'Onchocercose. L'importance du hasard dans la fusion cellulaire mentionné plus haut fait concevoir que le pourcentage de clones positifs obtenu reste faible.

Il est important que les rats soient bien immunisés contre l'antigène à étudier, ce qui constitue un problème dans ce cas précis puisque l'antigène circulant de l'Onchocercose n'est pas isolé. On connaît son identité partielle a ec l'antigène TCA soluble, mais cette fraction étant de nature polysaccharidique, est peu immunogénique injectée sous cette forme. L'immunisation avec des complexes immuns isolés à partir de sérum de patients onchocerquiens par ultracentrifugation ou précipitation au PEG a permis la production d'anticorps anti-*O. volvulus*. Cependant les expériences d'hybridation réalisées à partir de ces rats n'ont pas conduit à la production d'anticorps anti-antigène circulant.

Pour justifier du choix des techniques de dépistage utilisées, il faut tout d'abord souligner que de telles techniques doivent être réalisables dans la journée afin d'éviter le repiquage des cellules qui entrainerait un travail considérable, et un gaspillage de matériel. Les résultats obtenus (Tableau 7) montrent l'importance d'utiliser deux antigènes, l'un

de structure et l'autre soluble, car les anticorps produits ne reconnaissent pas forcément les deux. L'utilisation d'antigène TCA soluble pour le dépistage d'anticorps anti-ACO n'est également pas d'une probabilité totale puisque l'identité entre les 2 composants n'est que partielle. On peut noter cependant que le choix entre les techniques utilisables est assez restreint car l'antigène circulant onchocerquien n'est pas encore isolé. En effet, l'emploi de précipitation en gel vis-à-vis de sérum de patient ne peut pas être envisagé pour le dépistage d'anticorps monoclonaux. D'autres techniques telles que le RIPEGA sont trop lourdes au niveau de la préparation de l'anticorps (purification, marquage) pour être utilisées dans le dépistage.

Tant pour l'ELISA que pour la technique d'immunofluorescence, l'emploi comme conjugué d'une anti-IgG marquée, soit à la péroxidase, soit à la fluoresceine, impose une restriction au niveau des classes d'immunoglobulines qui pourront être détectées. Cependant, l'emploi de sérum anti-IgA, anti-IgD et anti-IgE multiplierait considérablement le travail de dépistage. De plus, étant donné le protocole d'immunisation et la cinétique de production d'anticorps, il était plus probable d'obtenir des immunoglobulines de classe M ou éventuellement G. Le dépistage d'IgE anti-*O. volvulus* conduirait certainement à des résultats intéressants mais constitue une voie d'approche différente.

Le matériel antigénique utilisé en immunofluorescence doit être de bonne qualité. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur coupes de kystes Vénézuéliens qui avaient été congelés dans les 5 minutes suivant leur prélèvement et rapportés congelés au laboratoire. De plus, cette population indienne n'a jamais été traitée par des antifilaricides et

les vers sont par conséquent intacts. Ces observations rappellent les difficultés constamment présentes dans l'étude de l'Onchocercose. On peut rappeler que ce parasite uniquement présent sous les tropiques ne se développe chez aucun animal de laboratoire. Par conséquent, le matériel oncnocerquien utilisé (kystes, sérum et urine) provient d'Afrique ou d'Amérique du Sud et doit parvenir dans de bonnes conditions jusqu'au lieu d'étude. Les conditions de conservation sur le terrain sont souvent inexistantes et les temps de transport très longs. L'obtention de bon matériel onchocerquien dans un laboratoire si éloigné des zones d'endémie est par conséquent très difficile ; elle nécessite donc une bonne organisation des personnes travaillant sur le terrain. De plus, l'antigène est préparé à partir de vers extraits d'Onchocercomes de patients infectés. L'ablation de ces kystes nécessite une petite intervention chirurgicale et par voie de conséquence, un personnel qualifié. On comprend donc que l'antigène d'Onchocerca volvulus est un produit rare, d'obtention difficile.

Cette situation particulière à l'étude d'une maladie n'ayant pas de cycle expérimental, fait de la technique de production d'anticorps monoclonaux une technique de choix car elle n'utilise que d'infimes quantités d'antigènes comparée à la production d'un hyperimmunsérum. Les techniques de dépistage, ELISA et IF, présentent également l'avantage d'utiliser peu d'antigène.

Il est intéressant de noter que les deux techniques de dépistage utilisées (IF et ELISA) sont complémentaires. En effet, certains antigènes de structure ne semblent pas être présents dans l'antigène soluble, ou tout au moins ne se fixent pas sur la surface de chlorure de polyvinyle Bien que l'ELISA semble plus approprié pour la détection d'un antigène

circulant, donc soluble, l'IF ne doit pas être négligée car elle apporte des renseignements sur la localisation de l'antigène.

II - LA DETECTION D'ANTIGENE CIRCULANT DANS LE SERUM PAR UN ANTICORPS MONOCLONAL

Il convient tout d'abord de souligner les problèmes inhérents à la sélection des malades. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, il n'existe pas de diagnostic de l'Onchocercose dans sa période pré-patente. Par conséquent, on ne possède pas de sérum de référence des différents stades de l'infection. Seul le regroupement par tranche d'âge nous apporte une indication sur la durée probable et approximative de l'infection car la population étudiée est en contact permanent, et dès la naissance avec le vecteur. Cette absence de diagnostic précoce pose un problème pour la sélection de controles sains de la même ethnie que les malades étudiés, ainsi que pour l'étude des réactions croisées. Cette lacune rend également hasardeux le calcul d'un pourcentage de faux positifs et de faux négatifs, paramètres importants pour l'évaluation d'une technique de diagnostic.

L'anticorps monoclonal sélectionné en vue de la détection d'ACO est de classe IgM. Ceci ne nous surprendra pas puisque plusieurs publications (Paganelli et al., 1980 ; Steward et al., 1982) font état de la présence d'IgM dans les complexes immuns circulants dans le sérum de patients onchocerquiens. En outre, dans la schistosomiase, les anticorps dirigés contre les antigènes circulants sont également de classe IgM (Nash et al., 1978 ; Deelder et al., 1980).

Cet anticorps permet la détection d'antigène circulant (ACO) dans 80 % des cas Africains étudiés et dans 76 % des cas chez les indiens du Vénézuéla. Il est de plus remarquable que cet anticorps produit contre un antigène d'origine africaine reconnaisse également l'antigène vénézuélien. En effet, l'existence ou la non-existence d'une différence antigénique entre ces deux souches fait actuellement l'objet d'un sujet de recherche en collaboration avec l'équipe de Caracas.

Dans la schistosomiase, des désaccords persistent au niveau de l'existence d'une corrélation entre le taux d'antigènes circulants et la charge parasitaire (Carlier et al., 1975 ; Santoro et al., 1980 ; Deelder et al., 1980). Santoro et al. (1980) préconisent l'utilisation du RIPEGA pour l'évaluation de la charge parasitaire alors que Deelder et al. (1980) n'observent pas de corrélation entre l'antigène circulant qu'il détecte et les données parasitologiques. Ceci pourrait néanmoins être expliqué par une différence au niveau des antigènes circulants dosés. Aucune étude permettant de faire de telles corrélations n'a été réalisée précédemment dans les filarioses. On peut seulement noter que Karavodin et al. (1980) et Steward et al. (1982) n'observent aucune corrélation entre le taux de CIC et le nombre de microfilaires. Les résultats présentés dans cet ouvrage confirment indirectement ces travaux en montrant d'une part un manque de corrélation entre la présence d'ACO et la microfilarodermie, et d'autre part une corrélation positive entre les CIC et l'ACO.

L'étude détaillée de la population Vénézuélienne a permis pour la première fois de corréler la présence d'ACO aux données parasitologiques. L'augmentation avec l'âge du nombre de cas présentant des nodules palpables et une microfilarodermie positive n'est pas surprenante chez une population vivant en contact permanent avec le vecteur. Cette augmentation avec l'âge n'est pas observée en ce qui concerne la présence d'antigène circulant. L'hypothèse de départ, et qui est corroborée par des travaux effectués dans d'autres parasitoses, est que l'antigène circulant est d'origine parasitaire, probablement un produit de sécrétion et d'excrétion libéré dans la circulation, qui est peu antigénique, de demi-vie courte et qui pourrait donc donner une indication sur la charge parasitaire. En fait, on n'observe pas de corrélation directe entre l'antigène circulant détecté par l'anticorps monoclonal sélectionné et la charge parasitaire.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

- D'une part, l'anticorps monoclonal utilisé ne reconnaît qu'un seul déterminant antigénique et peut, par conséquent, détecter un antigène autre que celui correspondant à l'hypothèse de départ. On peut

noter, à ce propos, que Deelder et al. (1980) mettent en évidence dans la schistosomiase deux antigènes circulants, de migration anodique CAA ou cathodique (CCA) en immunoélectrophorèse. L'un d'eux (CAA) est immunogénique, facilement détectable dans le sérum mais n'apporte aucune indication sur la charge parasitaire. L'autre (CCA) se retrouve dans les urines et semble être un meilleur candidat mais sa détection par des techniques sensibles est freinée par le fait que son manque d'immunogénicité rend difficile la production d'un bon antisérum.

- L'immunogénicité des antigènes circulants semble être un facteur important car c'est probablement la formation d'anticorps contre ces antigènes, et ensuite de complexes immuns circulants qui est à l'origine du manque de corrélation avec la charge parasitaire. On peut ainsi envisager qu'au début de la maladie, les antigènes sont libres dans la circulation. Par la suite, une réponse immunologique se développe, pouvant conduire à une situation où les anticorps sont en excès et où aucun site antigénique n'est libre au sein des complexes immuns. Dans ce cas, il n'est pas possible de détecter l'antigène circulant par le RIPEGA, bien qu'il soit présent chez le malade. Ceci expliquerait les cas négatifs en ACO mais présentant un diagnostic parasitologique positif.

Une corrélation entre l'ACO et les CIC a été observée, ce qui peut suggérer que l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal sélectionné joue un rôle dans la formation des complexes. Il faut noter cependant que cette technique de fixation du C1q ne détecte pas que les CIC spécifiques de l'Onchocercose. Une telle technique serait très utile et permettrait de vérifier l'hypothèse citée plus haut. Elle pourrait être basée sur la fixation des complexes à un support par un site antigénique

libre et leur visualisation serait réalisée par un sérum anti-immunoglobuline humaine marqué. Cependant, ce genre de technique serait limité, comme le RIPEGA, par la présence de sites antigéniques libres. Il apparaît donc difficile lorsqu'on parle de détection d'ACO de n'avoir que de l'antigène libre, et il n'est pas encore possible de pouvoir détecter des CIC spécifiques de l'Onchocercose. Ceci explique que pour certains cas particuliers, on ne puisse observer de corrélation entre ACO et CIC.

L'étude d'une corrélation entre l'ACO et les données parasitologiques par tranches d'âge apporte une information très intéressante en ce qui concerne les enfants de moins de 10 ans. On note en effet que l'ACO est présent chez 91 % de ces enfants alors que seulement 52 % d'entre eux ont une microfilarodermie positive. Ces observations sont très importantes car elles montrent que la présence de l'antigène circulant étudié grâce à l'anticorps monoclonal permet un diagnostic précoce de l'Onchocercose. De plus, cet antigène est présent dans 83 % des cas présentant une microfilarodermie négative. Cette technique présenterait ainsi le gros avantage de permettre un diagnostic plus précoce de la maladie. Elle ne peut cependant pas remplacer complètement le diagnostic parasitologique par biopsie cutanée car on a observé 27 % de cas présentant des microfilaires mais où COA n'a pu être détecté. Ces cas présentent une microfilarémie faible ou moyenne et il est possible qu'il y ait un excès d'anticorps masquant ainsi tous les sites antigéniques. Un seul cas sur 15 présentant une microfilarodermie élevée s'est révélé négatif en COA. Les autres techniques envisageables en vue de la détection d'antigènes circulants dépendent également de la présence de sites antigéniques libres et ne détecteront pas d'antigènes

dans les cas où les anticorps sont en excès. Pour permettre un diagnostic sérologique complet des antigènes circulants et éclairer les différentes hypothèses analysées plus haut, il faudrait compléter le RIPEGA par une technique de détection des CIC spécifiques de l'Onchocercose. En effet la technique de dosage par le C1q radiomarqué ne tenant pas compte de la spécificité des CIC mesurés, il serait hasardeux de s'adonner à une étude de corrélation plus approfondie entre l'ACO, les CIC et les données parasitologiques.

D'après les études réalisées en immunofluorescence, l'anticorps monoclonal IA2-23 semble reconnaître la cuticule des microfilaires. L'antigène circulant détecté serait donc une conséquence de la destruction des microfilaires. Cependant, il reste à expliquer la mise en évidence d'ACO dans des cas de microfilarodermie négative, ainsi que chez de très jeunes enfants où il est peu probable que des microfilaires soient produites. On peut, pour cela, envisager l'existence de réactions croisées entre les cuticules de microfilaires (L1) et de stades infestants (L3) et même de stades larvaires L4. Il est probable que, comme c'est le cas pour Dipetalonema viteae (Haque et al., 1982), il y ait une destruction naturelle (non immunologique) d'un grand nombre de larves L3 et L4 qui deviennent probablement des antigènes circulants. Si le déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal est présent dans les larves L3 et L4, il est alors vraisemblable d'obtenir un diagnostic précoce en utilisant cet anticorps. Cette hypothèse est très difficile à vérifier techniquement, de par la difficulté (ou l'impossibilité) d'obtenir des larves L3 ou L4 en l'absence d'un modèle expérimental.

De nombreuses informations sur l'origine somatique ou métabolique de l'antigène détecté ainsi que sur son rôle dans les CIC pourraient probablement être obtenues en suivant l'évolution de ces paramètres chez une population traitée par une drogue microfilaricide telle que la diéthylcarbamazine. Cette étude ne peut cependant pas être réalisée sur

la population Vénézuélienne analysée ici car des chocs anaphylactiques graves pourraient survenir (voir Chapitre I) qui, en l'absence d'une infrastructure hospitalière proche, risqueraient d'être fatals.

III - ABSENCE DE L'ANTIGENE CIRCULANT ETUDIE DANS LES URINES DE PATIENTS ONCHOCERQUIENS

Il faut tout d'abord noter qu'il est important de filtrer toutes les urines avant congélation ou lyophilisation. En effet, des microfilaires peuvent être libérées dans les urines de patients et de tels traitements entraîneraient une libération artificielle d'antigène parasitaire.

L'obtention d'une courbe dose-réponse avec une solution d'Ag Ov dans de l'urine montre qu'il est techniquement possible de détecter de l'antigène dans de l'urine. Cependant, d'après les spécimens analysés ici, l'antigène circulant reconnu par l'anticorps monoclonal n'est pas présent dans les urines.

Dans la schistosomiase où les études sur les antigènes circulants ont été les plus développées, Carlier et al. (1975) met en évidence un antigène "M" dans les urines de patients atteints de schistosomiase qui pourrait correspondre à l'antigène "CCA" décrit par Deelder et al. (1980). Cependant, les antigènes circulants détectés dans le sérum de patients par Santoro et al. (1980) et celui à migration anodique, le "CAA" de Deelder et al. (1980) ne sont pas mis en évidence dans les urines. Vice-versa , Carlier et al. (1975) n'ont pu mettre en évidence dans les sérums l'antigène "M" qu'ils détectent dans l'urine.

Tous ces arguments sont en faveur de l'hypothèse suivant laquelle l'antigène étudié ici n'est pas présent dans les urines onchocerquiennes mais qu'il peut exister un autre (ou d'autres) antigène(s) qui pourrai(ent)t être détecté(s) par un autre anticorps que celui utilisé.

Une autre hypothèse mérite d'être considérée. Il est possible que des antigènes parasitaires ne passent dans les urines que lorsqu'il y a des lésions rénales. Ces lésions sont surtout observées après traitement par la diéthylcarbamazine où la formation de très nombreux complexes immuns (peut-être de nature différente de celle des sujets non traités) entraîne de nombreuses complications, notamment rénales. Le fait que la population Vénézuélienne n'ait jamais été traitée pourrait alors expliquer ces résultats. Dans ce cas, on pourrait expliquer l'unique résultat positif, non pas comme un artefact, mais par la présence chez le patient de lésions rénales d'une autre origine.

IV - SPECIFICITE DE L'ANTICORPS MONOCLONAL $IA_2 23$

Les anticorps produits par des cellules issues d'un même clone cellulaire ne reconnaissent qu'un seul déterminant antigénique. Cependant, les résultats obtenus en double diffusion en gel et en ELISA révèlent que le déterminant antigénique reconnu est répétitif non seulement dans l'antigène d'*O. volvulus* mais également dans celui de nombreux autres helminthes. Tous ces antigènes ont en commun la présence de substance C. On pouvait donc imaginer que la solution d'anticorps monoclonal soit ou contienne une "C réactive protéine" ou CRP. Les résultats négatifs

obtenus vis-à-vis d'un sérum anti-CRP, et vis-à-vis d'antigène de protozoaires et de champignons écartent cependant l'hypothèse d'une CRP.

Les réactions croisées observées en RIPEGA sont beaucoup moins importantes. Il semble donc que la ou les molécule(s) contenant le déterminant antigénique commun ne se trouve(nt) pas, ou moins fréquemment, en circulation dans les autres helminthiases.

Ce manque de spécificité n'a pas de conséquence néfaste importante, dans un test comme le RIPEGA s'il est très limité en ce qui concerne les antigènes circulants. Par contre, les réactions croisées avec une filaire expérimentale comme Dipetalonema viteae peuvent être très bénéfiques dans l'étude d'une maladie où l'antigène est si difficile à obtenir. Des expériences préliminaires ont ainsi pu être réalisées sur l'haemagglutination par l'anticorps monoclonal de globules rouges sensibilisés avec de l'antigène de D. viteae.

V - MISE AU POINT DE TECHNIQUES DIRECTES POUR LA DETECTION DE COA

L'utilisation de techniques directes avec le positionnement de l'antigène entre deux anticorps issus du même clone cellulaire peut être envisagée grâce à la répétitivité du déterminant reconnu. Les résultats obtenus en SRIA-P sont encourageants puisque l'on obtient 57 % de cas positifs pour une série de sérums onchocerquiens pris au hasard. Cette technique est moins sensible que le RIPEGA, à en juger par ce pourcentage et par la dilution limite d'antigène détectée. L'élaboration d'une technique à double "sandwich", utilisant comme conjugué un sérum anti-immunoglobuline de rats est en cours, elle devrait augmenter considérablement la sensitivité du test. Cependant, pour que le conjugué ne

reconnaisse pas l'anticorps monoclonal de rat fixé au support, il est nécessaire d'utiliser un fragment (Fab')2. En effet, les réactions idiotypes anti-idiotypes étant basées sur la reconnaissance du fragment Fc des immunoglobulines, l'utilisation de portions (Fab')2 éviterait des bruits de fond très importants dus à la reconnaissance de l'anticorps fixé.

On peut également envisager la détection de CIC spécifiques de l'Onchocercose par une technique similaire. Elle consiste à fixer la partie (Fab')2 de l'anticorps monoclonal, à incuber le sérum de patient comme dans la technique précédemment décrite, et à révéler les complexes immuns qui sont fixés par le biais d'un site antigénique libre avec un sérum anti-IgM ou IgG humaine. Une telle technique ne peut cependant pas détecter très efficacement les CIC en excès d'anticorps.

Dans les deux cas d'expériences mentionnées, le conjugué peut utiliser des marqueurs enzymatiques, comme en ELISA. De telles techniques pourront alors être standardisées et commercialisées, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux et pourront être mises en application sur le terrain grâce à l'utilisation de marqueurs enzymatiques.

VI - CARACTERISTIQUES DE L'ANTIGENE CIRCULANT DETECTE

Les études biochimiques préliminaires réalisées ici apportent quelques informations sur la nature de l'antigène circulant dans l'Onchocercose, sujet resté jusqu'alors inexploré. Cet antigène est de nature essentiellement polysaccharidique et demeure stable à la chaleur. On retrouve ici les caractéristiques des antigènes circulants de la schistosomiase (Carlier et al., 1975 ; Deelder et al., 1980). Les polysaccharides étant en général peu immunogènes, cette caractéristique de l'antigène circulant explique les difficultés d'obtention d'un hyperimmunsérum contre

l'antigène circulant et par conséquent l'avantage de l'outil monoclonal.

Les résultats obtenus en filtration sur gel indiquent que le déterminant antigénique reconnu par l'anticorps monoclonal est présent dans toutes les fractions d'un poids moléculaire supérieur à 60,000. Ce déterminant antigénique semble donc hautement répétitif, ce qui complique l'étude biochimique de cet antigène et de son rôle dans des systèmes de prolifération cellulaire in vitro.

La possession d'un anticorps monoclonal contre l'antigène circulant devrait permettre la purification de ce dernier par le biais de techniques biochimiques plus fines. Cependant, le choix des techniques utilisables restera limité par le manque d'antigène et cela risque de constituer un frein important à la caractérisation biochimique de l'ACO.

CONCLUSION

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont conduit à l'obtention du premier anticorps monoclonal dirigé contre un antigène circulant de l'Onchocercose.

Cet anticorps nous permet par le biais d'un dosage radioimmunologique (le RIPEGA) de détecter un antigène circulant de l'onchocercose (ACO) chez 80 % d'Africains et 76 % d'Indiens du Vénézuéla vivant dans des zones endémiques. Ces valeurs correspondent aux résultats obtenus par Ouaissi et al. (1981) avec des anticorps polyclonaux. L'anticorps monoclonal apporte cependant une amélioration quant à la spécificité et présente surtout l'avantage d'être un produit homogène et de source quasiment intarissable. Ces qualités nous permettent donc d'envisager une standardisation au niveau mondial d'un test de diagnostic utilisant un tel anticorps monoclonal. De plus, des travaux de corrélation entre la présence d'ACO et des données épidémiologiques ont révélé que l'ACO a pu être détecté grâce à cet anticorps monoclonal dans 83 % des cas présentant un diagnostic parasitologique négatif. La technique de détection de l'ACO développée dans cette thèse renforce donc considérablement les possibilités de diagnostic de l'Onchocercose. Elle permet, de plus, un diagnostic précoce puisque l'ACO est mis en évidence chez 91 % des enfants de moins de 10 ans étudiés, alors que le diagnostic parasitologique se révèle positif chez seulement 52 % d'entre eux.

Pour une meilleure applicabilité de ce test de diagnostic dans les zones endémiques, il est nécessaire de transférer cette technique radioimmunologique dans le domaine de l'enzymologie. Les travaux préliminaires réalisés dans cette thèse ont montré qu'un dosage direct de l'ACO par son positionnement entre deux anticorps monoclonaux était possible du fait de la répétitivité du déterminant antigénique reconnu. Cependant,

pour augmenter la sensibilité du test, il est nécessaire de recourir à l'utilisation d'une réaction supplémentaire, en l'occurence une détection de l'anticorps monoclonal par un sérum anti-immunoglobuline de rat marqué à l'aide d'un enzyme. Des travaux sont en cours pour la préparation de fragments (Fab')2 de l'anticorps monoclonal ; ils permettront d'améliorer la sensibilité du test en "sandwich" par une réduction des bruits de fond dus à la reconnaissance du premier anticorps monoclonal fixé sur plaque par le conjugué anti-Ig. On peut espérer par ce biais mettre au point une technique enzymologique facilement utilisable sur le terrain permettant une détection d'ACO avant l'apparition de signes cliniques et même avant la possibilité d'un diagnostic parasitologique.

Les progrès constants réalisés dans le domaine des marqueurs enzymologiques ont conduit à la mise au point de techniques plus sensibles comme le système biotine-avidine ou des dosages fluorométriques. Il serait intéressant de tester l'efficacité de ces nouveaux marqueurs dans le système étudié.

L'anticorps monoclonal étudié reconnaît par définition un seul déterminant antigénique. Celui-ci a été localisé au niveau de la cuticule des microfilaires. Il est probable que cet antigène n'est pas le seul présent dans la circulation de patients onchocerquiens. Il serait donc souhaitable de poursuivre les expériences d'hybridation cellulaire pour tenter d'obtenir des anticorps reconnaissants d'autres antigènes circulants. Un anticorps détectant les antigènes d'excrétion et de sécrétion du parasite pourrait être d'un grand intérêt. Cependant, pour obtenir un anticorps contre un antigène, celui-ci doit par définition être

immunogénique. Un tel antigène entraînera donc dans la circulation la formation d'anticorps et de complexes immuns. Par voie de conséquence, toute technique de dosage d'antigène circulant de l'Onchocercose sera limitée par la présence, dans certains cas, de complexes immuns sans sites antigéniques libres ou accessibles.

Les résultats d'immunofluorescence montrent la reconnaissance par l'anticorps monoclonal de la cuticule des microfilaires. Il serait intéressant d'étudier l'action de cet anticorps en présence de cellules et/ou de complément dans une expérience de cytotoxicité vis-à-vis de microfilaires. Une telle étude pourrait être réalisée dans un laboratoire qui soit proche des zones d'endémie et possède l'équipement nécessaire à la culture cellulaire. L'alternative serait de réaliser cette étude dans ce laboratoire grâce à l'obtention de nodules peu après leur ablation.

L'étude biochimique réalisée ici est très préliminaire. La possession d'un anticorps monoclonal contre un antigène circulant devrait permettre à un biochimiste d'isoler et de caractériser celui-ci par des techniques telles que la co-précipitation ou l'immunoabsorbtion. Ce travail se heurtera à trois problèmes principaux :

- la rareté de l'antigène d'<u>O. volvulus</u>
- le manque d'affinité des anticorps monoclonaux
- la présence dans les sérums de complexes immuns présentant des sites antigéniques libres.

L'isolement de cet antigène circulant permettrait d'étudier son rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire. En effet, des études réalisées récemment par Ouaissi et al. dans ce laboratoire ont montré que l'Ag Ov (extrait total) inhibait la prolifération cellulaire induite par des mitogènes.

Une étude plus approfondie de la corrélation entre l'antigène circulant dosé et les signes cliniques, notamment après traitement par la diethylcarbamazine pourrait constituer des données complémentaires intéressantes.

Enfin, les résultats obtenus nous permettent de proposer le RIPEGA, utilisant l'anticorps monoclonal IA223 comme test complémentaire de la biopsie cutanée exsangue. Cette technique est limitée aux laboratoires où la radioactivité peut être manipulée, mais on peut espérer dans un proche avenir disposer d'un test enzymologique permettant un diagnostic aussi précoce.

APPENDICES TECHNIQUES

1 - TAMPON PHOSPHATE 1 M pH 7,2

a) Solution A : $Na_2H\ PO_4\ 12\ H_2O$ 358.14 g/l

Solution B : $NaH_2\ PO_4\ 2\ H_2O$ 156.01 g/l (acide)

Mélanger ≃ 72 % de solution A et 28 % de solution B pour obtenir un pH = 7.2.

Cette solution-mère peut être stockée par 100 ml à -20°C.

b) Tampon phosphate de sodium 10 mM :

- 10 ml de la solution mère tampon phosphate pH 7.2
- 9 g NaCl
- qsp 1 litre d'eau distillée

2 - TAMPON PHOSPHATE AZIDE 0,01 M

- 10 ml de la solution-mère tampon phosphate pH 7.2
- 9 g NaCl
- 0.2 g azide
- qsp 1 litre d'eau distillée

3 - TAMPON PHOSPHATE TWEEN 0,01 M

- 100 ml de la solution mère tampon phosphate pH 7.2
- 90 g NaCl
- 5 ml Tween 20
- qsp 10 litres d'eau distillée

4 - TAMPON PHOSPHATE CITRATE pH 5.5 0.1 M

- 100 ml de la solution mère tampon phosphate pH 7.2
- 900 ml d'eau distillée
- Ajuster à pH 5.5 avec de l'acide citrique 0.1 M (250 ml)

5 - TAMPON BORATE pH 8.4

- Acide borique 12.36 g
- disodium tetraborate 19.08 g
- NaCl : 8.76 g
- qsp 2 litres d'eau distillée

6 - TAMPON VERONAL

- 1 tube de Véronal calcium magnésium (BD Mérieux) pH 7.2
- qsp 1 litre d'eau distillée

7 - TAMPON CARBONATE BICARBONATE pH 9.6 0.1 M

Solution A 0.2 M : Carbonate de sodium (21.2 g/l)

Solution B 0.2 M : Bicarbonate de sodium (16.8 g/l)

Mélanger ≃ 16 ml de la solution A et 34 ml de la solution B pour obtenir un pH 9.6.

Diluer au demi pour obtenir la molarité 0.1 M.

8 - TAMPON NaCl - Tween

- NaCl 9 ‰
- 0.4 ml/l de Tween concentré

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABELEV G.I. (1960) Modification of the agar precipitation method for comparing two antigen-antiserum systems. Folia Bio, 6, 56.

AHKONG Q.F., FISHER D., TAMPION W. & LUCY J.A. (1975) Mechanisms of cell fusion. Nature, 253, 194.

AMBROISE-THOMAS P. (1969) Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence. Thèse Doctorale, Institut de Médecine et d'Hygiène Tropicales, Faculté de Médecine de Lyon, France.

AMBROISE-THOMAS P. (1974) Immunological diagnosis of human filariasis : present possibilities, difficulties and limitations (a review). Acta Tropica, 31, 108.

AMBROISE-THOMAS P. (1975) Etude critique des procédés diagnostiques parasitologiques et immunologiques des filarioses humaines. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 497.

AMBROISE-THOMAS P. (1980) Filariasis. In : "Immunological investigation on Tropical Parasitic Diseases", Churchill Livingstone, EDINBURGH, 84.

AMBROISE-THOMAS P. & KIEN-TRUONG T. (1974) Application of the indirect fluorescent antibody test on sections of adult filariae to the serodiagnosis, epidemiology and post-therapeutic surveillance of human filariasis. Am. Trop. Med. Parasitol., 68, 435.

AMBROISE-THOMAS P., DAVEAU C. & DESGEORGES P. (1980) Sérodiagnostic de l'Onchocercose par micro-ELISA. Etude de 450 sérums et comparaison avec l'immunofluorescence indirecte. WHO/ONCHO/80., 152.

ANDERSON R.I., FAZEN L. & BUCK A.A. (1975) Onchocerciasis in Guatemala. 2. Microfilariae in urine, blood and sputum after DEC. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1, 58.

ANDERSON R.I., THOMAS D., Mc RAE A. & BUCK A.A. (1975) Onchocerciasis : frequency of microfilaruria and other manifestations in a village of Cameroon. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1, 66.

ANDERSON J. & MELCHERS F. (1978) The antibody repertoire cell lines obtained by fusion of X63 - Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. Current Topic in Microbiology and Immunology, 81, 130.

ARAUJO F.G., HANDMAN E. & REMINGTON J.S. (1980) Use of monoclonal antibodies to detect antigens of Toxoplasma gondii in serum and other body fluids. Infection and Immunity, 30 (1), 12.

AXEN R.J., PORATH & ERNBACK S. (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 214, 1302.

BAKER J.R. & GREEN S.M. (1977) Trypanosomal antigen on macrophages cultivated in vitro with Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii. Ann. Trop. Med. Parasit., 71, 141.

BARSKI G., SORIEUL S. & CORNEFERT F. (1960) Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de cellules de caractère "hybride". C.R. Acad. Sci (Paris), 251, 1825.

BARTLETT A., BIDWELL D.E. & VOLLER A. (1975) Preliminary studies on the application of enzyme immunoassay in the detection of antibodies in Onchocerciasis. Tropenmed. Parasit., 26, 370.

BASSET A., LARIVIERE M. & HOCQUET P. (1962) Technique de recherche des microfilaires d'onchocerques dans la peau. Bull. Soc. Path. Exot., 55 (6), 968.

BAZIN H., BECKERS A. & QUERINJEAN P. (1974) Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. Eur. J. Immunol., 4, 44.

BAZIN H., GRZYCH J.M., VERWAERDE C. & CAPRON A. (1980) A LOU rat non-secreting myeloma cell line suitable for the production of rat-rat hybridomas. Annales d'Immunologie, 1310, 359.

BOURREE P., PASSERON J., MOLIMARD R. & BOUVIER J.B. (1976). Sensibilisation du test à la notézine dans l'Onchocercose (à propos de 25 cas personnels). Annales de Médecine Interne (Paris), 127 (11), 831.

BOUT D., SANTORO F., CARLIER Y., BINA J.C. & CAPRON A. (1977) Circulating immune complexes in schistosomiasis. Immunology, 33, 17.

BUCK A.A. (1973) Microfilaruria in Onchocerciasis in Africans. Tropenmed. Parasit., 24, 336.

BUCK A.A., ANDERSON R.I., CONSTON J.A.C., WALLACE C.K., CAMOR D.H., HARMAN L.E., DORMER M.W. & GAVLEY J.J. (1971) Microfilaruria in Onchocerciasis. A clinical and epidemiological follow up study in the Republic of Tchad. Bull. Org. Mond. Santé, 45, 353.

BURCH T.A. (1951) Prurit consécutif à l'emploi de l'Hétrazan comme test de diagnostic de l'Onchocercose. Rev. Coleg. Med. Guatem., 2, 53.

CAPRON A., GENTILINI M. & VERNES A. (1968) Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par immunoélectrophorèse. Path. Biol., 16, 1039.

CARLIER Y., BOUT D., BINA J.C., CAMUS D., FIGUEIREDO J.F.M. & CAPRON A. (1975) Immunological studies in human schistosomiasis. I. Parasitic antigen in urine. The Am. J. Trop. Med. Hyg., 24, 949.

CARLIER Y., BOUT D., STRECKER G., DEBRAY H. & CAPRON A. (1980) Purification, immunochemical and biologic characterization of the Schistosoma circulating M antigen. J. Immunol., 124 (5), 2442.

CHOUET M., GRAVELINE J., METGE P. & LOREAL E. (1976) Les lésions du segment postérieur de l'oeil dans l'Onchocercose. Médecine d'Afrique Noire, 23 (10), 601.

CLEVINGER B., HANSBURG D. & DAVIE J. (1978) Murine anti- (I-3) dextran antibody production by hybrid cells. Current Topics in Microbiol. and Immunol., 81, 110.

COON H.G. & WEISS M.C. (1969) A quantitative comparison of formation of spontaneous and virus produced viable hybrids. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 62, 852.

CRAIG P.S., HOCKING R.E., MITCHELL G.F. & RICKARD M.D. (1981) Murine hybridoma-derived antibodies in the processing of antigens for the immunodiagnosis of hydatid (Echinococcus granulosus) infection in sheep. Parasitology, 83, 303.

CREIGHTON W.D., LAMBERT P.H. & MIESCHER P.A. (1973) Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene-glycol. J. Immunol., III, 1219.

CRUISE K.M., MITCHELL G.F., GARCIA E.G. & ANDERS R.F. (1981) Hybridoma antibody immunoassays for the detection of parasitic infection : further studies on a monoclonal antibody with immunodiagnostic potential for schistosomiasis japonica. Acta Tropica (Basel), 38 (4), 437.

DASGUPTA A. & SHUKAL B. (1978) Litomosoides carinii-soluble antigen in circulation and immunosuppression in vitro. Ind. J. of Med. Research, 67, 30.

DAVIDSON M.R. & GERALD P. (1976) Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridation by polyethylene-glycol. Somat. Cell. Genet., 2, 165.

DEELDER A.M., KLAPPE H.T.M., VAN DEN AARDWEG G.J.M.J. & VAN MEERBEKE E.H.E.M. (1976) Schistosoma mansoni : Demonstration of two circulating antigens in infected hamsters. Exp. Parasitol., 40, 189.

DEELDER A.M., KORNELIS D., VAN MARCK E.A.E., EVELEIGH P.C. & VAN EGMOND, J.G. (1980) Schistosoma mansoni : Characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse hamster and human infections. Exp. Parasitol., 50, 16.

DESOWITZ R.S. & UNA S.R. (1976) The detection of antibodies in human and animal filariasis by Counter current immunoelectrophoresis with Dirofilaria immitis antigen. J. of Helminth., 50, 53.

DODIN A., RATOVONDRAHETY, MOREAU J.P. & RICHAUD J. (1965) Etude immunologique de bilharziens traités par le CIBA 32644. Ann. Inst. Pasteur, 109 (supplt), 128.

EPHRUSSI B. (1964) Chromosomal markers. In "Somatic Cell Genetics" R.S. Krooth Ed., University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan, p 253.

EPHRUSSI B. & SORIEUL S. (1962) Nouvelles observations sur l'hybridation in vitro de cellules de souris. C.R. Acad. Sci. (Paris), 254, 181.

EPHRUSSI B., SCALETTA L.J., STENCHEVER M.H. & YOSHIDA M.C. (1964) Hybridization of somatic cells in vitro. Symp. Intern. Soc. for Cell. Biol. on Cytogenetics of Cell in Culture. Acad. Press New York, 3, 13.

FAHEY J.L. & TERRY E.W. (1973) Ion exchange chromatography and gel filtration. "Immunochemistry" Handbook of Experimental Immunology, Weir D.M. Ed., 1, 7.1.

FAIN A. (1981) Pourquoi faut-il combattre les filarioses ? Ann. Soc. Belge Med. Trop., 61 (2), 145.

FRANKS M.B. (1946) Specific soluble antigen in the blood of filarial patients. J. Parasitol., 32, 400.

GALFRE G., MILSTEIN C. & WRIGHT B.W. (1979) Rat x Rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature, 217, 131.

GENTILINI M., PINON J.M. & NIEL G. (1972) Immunoélectrodiffusion sur membrane d'acétate de cellulose. Applications diagnostiques en Parasitologie. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 65, 60.

GIDEL R., BRENGUES J. & RODHAIN F. (1969) Essai de deux tests immunologiques (intradermoréaction et réaction de fixation du complément) pour le dépistage des filarioses dans les populations de Haute-Volta où coexistent Wuchereria bancrofti, Onchocerca volvulus et Dipetalonema perstans. Bull. of WHO, 40, 831.

GOLD R., ROSEN F.S. & WELLER T.H. (1969) A specific circulating antigen in hamsters infected with Schistosoma mansoni. Detection of antigen in serum and urine and correlation between antigenic concentration and worm burden. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18, 545.

GOLDENBERG D.M. (1982) Radioactive antibodies in cancer detection in vivo. International Symposium on Monoclonal Antibodies, Venice, June 14, 1982.

GREENE B.M., TAYLOR H.R., HUMPHREY R.L. & LAWLEY T.J. (1980) Circulating immune complexes in Onchocerciasis : significance and influence of diethylcarbamazine therapy. Clin. Res., 28, 370A.

GREENWOOD F.C., HUNTER W.M. & GLOVER J.S. (1963) The preparation of ^{131}I labeled human growth hormone of high specific radioactivity. Biochem. J., 89, 114.

GUERRA-CACERES J.G., BRYCESON A.D.M., QUAKYI I. & SIRY C.J.F. (1980) Studies on the mechanisms of adverse reactions produced by diethylcarbamazine in patients with Onchocerciasis-Mazzoti reaction. Parasit. Immunol., 2, 121.

HANG L.M., BOROS D.L. & WARREN K.S. (1974) Induction of immunological hyporesponsiveness to granulomatous hypersensitivity in Schistosoma mansoni infection. J. Infect. Diseases, 130, 515.

HAQUE A., OUAISSI M.A., SANTORO F., des MOUTIS I. & CAPRON A. (1982) Damage to infective larvae of Dipetalonema viteae (Filariodea) mediated by rat eosinophil and macrophage adherence : involvement of alternative pathway of complement. J. Immunol., sous presse.

HARRIS H. & WATKINS J.F. (1965) Hybrid cells derived from mouse and man : artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature, 205, 640.

d'HAUSSY R., CAPRON A., ROLLAND A. & BIGUET J. (1972) Rapport de l'immunologie à l'épidémiologie de l'Onchocercose. Corrélations avec les données parasitologiques et ophtalomologiques. Revue d'Immunologie, 36, 55.

HOMMEL M. (1977) New approaches in experimental Leishmaniasis. Ph. D. Thesis, University of Liverpool.

d'HOOGHE M. (1934) Contribution à l'étude de l'Onchocercose humaine dans l'Uêle. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 14, 153.

HOWARD J.C., BUTCHER G.W., GALFRE G. & MILSTEIN C. (1978) Monoclonal anti-rat MHC (H-I) alloantibodies. "Current Topics in Microbiol. and Immunol." 81, 54.

JENKINS S.N. & WAKELIN D. (1977) The source and nature of some functional antigens of Trichuris muris. Parasitology, 74, 153.

KAGAN I.G. (1963) A review of immunologic methods for the diagnosis of filariasis. J. Parasitol., 49, 773.

KAGAN I.G. (1979) Diagnostic epidemiologic and experimental parasitology : immunologic aspects. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28 (3), 429.

KAGAN I.G., NORMAN L. & ALLAIN D.S. (1963) An evaluation of the bentonite floculation and indirect hemagglutination tests for the diagnosis of filariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 12, 548.

KALE O.O., BAMMEKE A.O. & AYENI O. (1974) An evaluation of skin snip techniques used in the quantitative assessment of microfilarial densities of Onchocerca volvulus. Bull. Org. Mond. Santé, 51, 547.

KALIRAJ P., GHIRNIKAR S.N. & HARINATH B.C. (1979) Detection of circulating filarial antigen in bancroftian filariasis. Indian J. Exp. Biol., 17 (10), 1148.

KALIRAJ P., KHARAT I., GHIRNIKAR S.N. & HARINATH B.C. (1981) The utility of human filarial serum in the detection of circulating antigen. J. of Helminth., 55, 133.

KARAVODIN L.M. & ASH L.R. (1980) Circulating immune complexes in experimental filariasis. Clin. exp. Immunol., 40, 312.

KARAVODIN L.M. & ASH L.R. (1981) Sequential determination of circulating immune complexes in experimental Filariasis. Inf. and Immunity, 34 (1), 105.

KOHLER G. & MILSTEIN C. (1975) Continuous cultures fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 26, 495.

KOHLER G. & MILSTEIN C. (1976) Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol., 6, 511.

LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature (London), 227, 680.

LAGRAULET J. (1971) Etude des biopsies cutanées et de la réaction de Mazzoti chez les Onchocerquiens examinés en France. Bull. Soc. Path. exot., 64, 231.

LAMBERT P.H., TRIBOLLET E., KNOEPFEL M., MADALINSKI K. & MIESCHER P.A. (1974) PEG test : a new radioimmunoassay for the detection of hepatitis B antigen. Schweiz. Med. Wschr, 104, 128.

LAMBERT P.H., DIXON F.J., ZUBLER R.H., AGNELLO V., CAMBIASO C., CASALI P., CLARKE J., COWDERY J.S., McDUFFIE F.C., HAY F.C., McLENNAN I.C.M., MASSON P., MULLER-EBERHARD H.J., PENTTINEN K., SMITH M., TAPPEINER G., THEOFILOPOULOS A.N. & VERROUST P. (1978) A WHO Collaborative study for the evaluation of eighteen methods for detecting immune complexes in serum. Clin. Lab. Immunol., 1, 1.

LE BRAS J., DUCHATELLE C., PAYET M. & SAVEL J. (1977) Comparaison des résultats obtenues à partir d'antigènes homologues et hétérologues dans l'étude immunologique de l'Onchocercose et de la dracunculose. Bull. Soc. Path. exot., 70, 515.

LIPINSKI M. & HERZENBERG (1981) Les hybridomes et leurs applications. La Recherche, 12 (125), 952.

LITTLEFIELD J.W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science, 145, 709.

MACKEY L., PERRIN L., LEEMANS E. & LAMBERT P.H. (1980) The diagnosis of malaria infection using a solid phase radioimmunoassay for the detection of malaria antigens. Application to the detection of Plasmodium berghei infection in mice. Parasitology, 80, 171.

MAZZOTTI L. (1948) Posibilidad de utilizar como medio de diagnostico auxiliar en la Onchocerciasis las reacciones alergicas consecutivas a la administration de Hetrazan. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop., 9, 235.

MAZZOTTI L. & OSORIO M.T. (1949) Sobre la presencia de microfilarias de Onchocerca volvulus en la sangre y en la orina de pacientes afectados por esta filaria. Rev. Inst. Salubry Enferm. Trop., 10, 269.

Mc CONAHEY P.J. & DIXON F.J. (1966) A method for trace iodination of proteins for immunologic studies. Int. Arch. Allergy, 29, 185.

McKEARN T.J., SARMIENTO M., WEISS A., STUART F.P. & FITCH F.W. (1978) Selective impression of reactivity to rat histocompatibility antigens by hybridoma antibodies. Dans "Current Topics in Microbiol. and Immunol.", 81, 61.

McMICHAEL A.J. & BASTIN J.M. (1980) Clinical applications of monoclonal antibodies. Immunology Today, Sept. 80, 56

MILLER M.J. (1958) An evaluation of the skin scarification technique for the recovery of microfilariae of Onchocerca volvulus. Am. J. Trop. Med. Hyg., 7, 554.

MITCHELL G.F., CRUISE K.M., CHAPMAN C.B., ANDERS R.F. & HOWARD M.C. (1979) Hybridoma antibody immunoassay for the detection of parasitic infection : development of a model system using a larval cestode infection in mice. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 57, 287.

MITCHELL G.F., CRUISE K.M., GARCIA E.G. & ANDERS R.F. (1981) Hybridoma-derived antibody with immunodiagnostic potential for Schistosomiasis japonica Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (5), 3165.

MONJUSIAU A., LAGRAULET J., DURAND B. & ROBERT C. (1964) Contribution à l'étude de la réaction de Mazzotti. Bull. Soc. Path. exot., 57, 1084.

MONTPELLIER J. & LACROIX A. (1920) Le craw-craw ou gale filarienne. Son origine dans les kystes sous-cutanés à Onchocerca volvulus. Bull. Soc. Path. exot., 13, 305.

des MOUTIS I., OUAISSI A., GRZYCH J.M., YARZABAL L., HAQUE A. & CAPRON A. (1982) Onchocerca volvulus : Detection of circulating antigen by monoclonal antibodies on human onchocerciasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., sous presse.

NASH T.E., PRESCOTT B. & NEVA F.A. (1974) The characteristics of a circulating antigen in schistosomiasis. J. Immunol., 112, 1500.

NASH T.E., OTTESEN E.A. & CHEEVER A.W. (1978) Antibody-response to a polysaccharide antigen present in the schistosome gut. II. Modulation of antibody response. The Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 944.

NGU J.L. & BLACKETT K. (1976) Immunological studies in Onchocerciasis in Cameroon. Trop. Geogr. Med., 28, 111.

NIEL G., COUTURE J., GENTILINI M., DARRIGOL J., ALBERT J.P., RICOSSE J.H. & CHARMOT G. (1968) Etude immunologique des sérums d'onchocerquiens vis-à-vis des antigènes onchocerquiens et ascaridiens.
Rapport Fin VIIIème Conf. Technique de l'O.C.G.E., Bamako, vol. 1, 220.

NIEL G., GENTILINI M., COUTURE J., PINON J.M. & DANIS M. (1972) Application des extraits antigéniques d'Ascaris suum au diagnostic des filarioses en double-diffusion. Valeur comparée à celle des antigènes Onchocerca volvulus et Dipetalonema viteae. Bull. Soc. Path. Exot., 65, 569.

OKABE K. & TANAKA T. (1961) Urine precipitin reaction for Schistosomiasis japonica. Kurume Med. J., 8, 24.

OLSSON L. & KAPLAN (1980) Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 5429.

OUAISSI M.A., KOUEMENI L.E., HAQUE A., RIDEL P.R., SAINT ANDRE P. & CAPRON A. (1981) Detection of circulating antigens in Onchocerciasis Am. J. Trop. Med. & Hyg., 30 (6), 1211.

OUCHTERLONY O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5, 1.

PAGANELLI R., NGU J.L. & LEVINSKI R.J. (1980) Circulating immune complexes in Onchocerciasis. Clin. Exp. Immunol., 39, 570.

PETITHORY J., BRUMPT L. & BAHNO M. (1973) Etude des possibilités diagnostiques sérologiques de l'Onchocercose par double-diffusion avec des antigènes hétérologues. Ann. Parasit. Hum. Comp., 48 (2), 343.

PICQ J.J. & ROUX J. (1973) Faits nouveaux dans l'Onchocercose : la microfilarurie. Sa répartition géographique, ses rapports avec les densités microfilariennes cutanées, l'albuminurie et la chimiothérapie. Premiers résultats. Med. Trop., 33, 451.

PONTECORVO G. (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. Somat. Cell. Genet., 1, 397.

PRICE D.L. (1961) The occurrence of microfilariae of Onchocerca volvulus in urine of infected individuals. J. Parasitol., 47, 572.

PROST A. & PROD'HON J. (1978) Le diagnostic parasitologique de l'Onchocercose Revue Critique des Méthodes en usage. Médecine Tropicale, 38 (5), 518.

RAIZMAN R.E. & NEVA F.A. (1975) Detection of circulating antigen in acute experimental infections with Toxoplasma gondii. J. Infect. Dis., 132, 44.

REINHERZ E.L., KUNG P.C., GOLSTEIN G., LEVEY R.H. & SCHLOSSMAN S.F. (1980) Discrete stages of human intrathymic differenciation : analysis of thymocytes and leukemic lymphoblasts of T lineage. Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 1588.

RODHAIN J. & VAN DEN BRANDEN F. (1916) Recherches diverses sur la Filaria (Onchocerca volvulus). Bull. Soc. Path. Exot., 9, 186.

ROSE G., BIGUET J., ROSE F. & d'HAUSSY R. (1966) Application d'une réaction d'hémagglutination au diagnostic de l'Onchocercose. Revue Hyg. & Méd. Soc., 14, 383.

ROWE D.S. (1980) The role of monoclonal antibody technology in immunoparasitology. Immunology Today, August 1980, 30.

SANTORO F., WATTRE P., DESSAINT J.P. & CAPRON A. (1977a) Hepatitis B circulating immune complexes. Characterization by radioimmunoprecipitation-PEG assay (RIPEGA). J. Immunol. Methods, 15, 201.

SANTORO F., BOROJEVIC R., BOUT D., TACHON P., BINA J.C. & CAPRON A. (1977b) Mother-child relationship in human Schistosomiasis mansoni. I. Parasitic antigens and antibodies in milk. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 1164.

SANTORO F., VANDEMEULEBROUCKE B. & CAPRON A. (1978) The use of the radioimmunoprecipitation-PEG assay (RIPEGA) to quantify circulating antigens in human and experimental schistosomiasis. J. Immunol. Methods, 24, 229.

SANTORO F., PRATA A., CASTRO C.N. & CAPRON A. (1980) Circulating antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis : relationship with Schistosoma mansoni egg output. Clin. exp. Immunol., 42, 219.

de SAVIGNY D. (1979) Secretory products in Immunodiagnosis : Rationale and practical aspects. WHO, Working paper n°16.

SCALETTA L. & EPHRUSSI B. (1965) Hybridization of normal and neoplastic cells in vitro. Nature, 207, 1169.

SCHULZ-KEY H., ALBIEZ E.J. & BUTTNER D.W. (1977) Isolation of living adult Onchocerca volvulus from nodules. Tropenmed. Parasitol., 28, 428.

SEKIGUCHI K., KURODA K., OHNISHI S. & ASANO A. (1981) Virus-induced fusion of human erythrocyte ghosts : I. Effects of macromolecules on the final stages of the fusion reaction.
Biochimica et Biophysica Acta, 645, 211.

SHULMAN M., WILDE C.D. & KOHLER G. (1978) A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature, 276, 269.

SOMORIN A.O. & HEINER D.C. (1976) A new immunodiagnostic test in Onchocerciasis. Clin. Allergy, 6 (6), 573.

SPEISER F. (1980) Application of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of filariasis and Echinococcosis.
Tropenmed. Parasit., 31, 459.

STEINITZ M., KLEIN G., KOSKIMIES S., MAKEL O. (1977) EB virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. Nature, 269, 420.

STEWARD M.W., SISLEY B., MACKENZIE C.D. & EL SHEIKH H. (1982) Circulating antigen antibody complexes in Onchocerciasis. Clin. exp. Immunol., 48, 17.

TERRENO S. (1970) Diagnostic sérologique des filarioses humaines par immunofluorescence indirecte sur coupes de filaires adultes. A propos de 1685 examens. Thèse de Médecine, Lyon.

TOISTER Z. & LOYTER A. (1973) The mechanism of cell fusion : II. Formation of chicken erythrocyte polykaryons. The J. of Biol. Chem., 248 (2), 422.

VAN DEN BERCHE L. & CHARDOME M. (1951) An easier and more accurate diagnosis of malaria and filariasis through the use of the skin scarification smear. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 31, 411.

VAN KNAPEN F. & PANGGABEAN S.O. (1977) Detection of circulating antigen during acute infections with Toxoplasma gondii by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. J. Clinical Microbiol., 6 (6), 545.

VERNES A. (1975) Valeurs et limites des réactions d'hypersensibilité appliquées au diagnostic des helminthiases. Ann. Soc. Belge Med. Trop., 55, 455.

WADE N. (1980) Hybridomas : A potent new biotechnology. Science, 208, 692.

WEISS M.C. & EPHRUSSI B. (1966) Studies of interspecific (rat x mouse) somatic hybrids. I - Isolation, growth, and evolution of karyotype. Genetics, 54, 1095.

WEISS M.C. & GREEN H. (1967) Human mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 58, 1104.

WEISS N., SPEISER F. & HUSSAIN R. (1981) IgE antibodies in human Onchocerciasis. Application of a newly developped radioallergosorbent test (RAST). Acta Tropica, 38, 353.

WEISS N., HUSSAIN R. & OTTESEN E.A. (1982) IgE antibodies are more species-specific than IgG antibodies in human onchocerciasis and Lymphatic filariasis. Immunology, 45, 129.

W.H.O. Technical Report (1977) The role of immune complexes in disease Series 606 - World Health Organization - Geneva.

WILSON R.J.M. (1974) Soluble antigens as blocking antigens. CIBA Foundation Symposium, Associated Scientific Publishers - Amsterdam, 25, 185.

WILSON R.J.M., Mc GREGOR I.A. & WILLIAMS K. (1975) Occurence of S-antigens in serum in Plasmodium falciparum infections in man. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 69, 453.

WOODRUFF A.W. & WISEMAN R.A. (1968) Indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Onchocerciasis. Exp. Parasit., 22 (3), 285.

YARZABAL L., ARANGO M., SANTIAGO R. & BOTTO C. (1981) Oncocercosis en la poblacion Yanomami. I. Estudio immunologico. XXXI Conv. Nac. ASOVAC, Maracaibo, Venezuela.

YERGANIAN G. & NELL N. (1966) Hybridization of dwarf hamster cell by UV-inactivated sendaï virus. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 55, 1066.

ZUBLER R.H. & LAMBERT P.H. (1976) The ^{125}I-C1q binding test for the detection of soluble immune complexes. Dans "In vitro Methods in cell-mediated and tumor immunity", B.R. Bloom & J.R. David ed., New York, Academic Press, 565.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE Section de SCIENCES LILLE