

50376
1984
193

50376.
1984.
193.

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

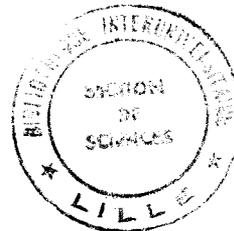
THESE

PRÉSENTÉE À L'UNIVERSITÉ DE LILLE I

POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR DE 3^E CYCLE EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

PAR

WASHINGTON CUNA



ETUDE DES ANTIGENES DE SURFACE DE LA MICROFILAIRE
DE BRUGIA MALAYI : LEUR ROLE DANS L'IMMUNITÉ

PRÉSENTÉE LE 11 OCTOBRE 1984

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

MEMBRES DU JURY : PRÉSIDENT : M.M. DURCHON
RAPPORTEUR : M.A. CAPRON
MEMBRES : M.M. PORCHET
M.A. DHAINAUT

Ce travail a été réalisé dans le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624), Institut Pasteur de LILLE, sous la direction éclairée de Monsieur le Professeur A. CAPRON.

Monsieur le Professeur A. CAPRON,

Monsieur HAQUE (Chargé de Recherche au CNRS)

Permettez moi de vous exprimer ici mes sentiments de gratitude et
mon profond respect.

Nous remercions très sincèrement :

Monsieur le Professeur M. DURCHON

qui nous fait l'honneur de présider la soutenance de cette thèse. Votre aide m'a permis de mener à bien mes études.

Messieurs les Professeurs M. PORCHET et A. DHAINAUT qui ont accepté de juger ce travail.

Madame C. DISSOUS et Monsieur D. AFCHAIN pour leur aide très efficace et amicale.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à :

A. AGGARWAL et à tous les membres du laboratoire qui nous ont aidé à la réalisation de ce travail.

C. COLSON et M.F. MASSARD et J. DERICK : pour leur participation à la préparation du manuscrit.

TABLE DES MATIERES

	Page
Résumé.....	1
Introduction.....	4
<u>CHAPITRE I</u> - GENERALITES.....	6
1.1. Cycle évolutif général des filaires et biologie du parasite.....	7
<u>CHAPITRE II</u> - L'IMMUNITE AUX ANTIGENES FILARIENS.....	12
2.1. Réponse immune de l'hôte.....	12
2.1.1. Larve infestante (L ₃).....	12
2.1.2. Microfilaire.....	15
2.2. Immunisation par différentes sources d'antigènes.....	18
2.3. Mécanismes d'évasion du parasite à la réponse immune de l'hôte.....	20
2.4. Antigènes parasitaires.....	23
<u>CHAPITRE III</u> - MATERIEL ET METHODES.....	31
3.1. Animaux d'expérience.....	32
3.2. Entretien du cycle expérimental de <u>Dipetalonema viteae</u>	32
3.3. Cycle expérimental de <u>Brugia malayi</u>	33
3.4. Préparation des microfilaires (L ₁) de <u>D. viteae in vitro</u>	35
3.5. Obtention des microfilaires <u>in vivo</u> de <u>B. malayi</u>	35

3.6.	Protocole d'infection.....	36
3.7.	Les sérums.....	36
3.7.1.	Sérums de malades.....	36
3.7.2.	Sérums d'infection.....	37
3.8.	Identification des hybrides producteurs d'anticorps anti- <u>B. malayi</u>	37
3.8.1.	Technique radioimmunologique en phase solide (SRIA).....	38
3.8.2.	Immunofluorescence indirecte (IFI).....	39
3.9.	Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	40
3.10.	Caractérisation des antigènes cibles.....	41
3.10.1.	Marquage des protéines de surface.....	41
3.10.2.	Immunoprécipitation.....	42
3.10.3.	Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-SDS.....	43
<u>CHAPITRE IV</u> -	RESULTATS ET DISCUSSION.....	45
4.1.	Obtention et caractérisation de l'anticorps monoclonal AA ₃ -44 anti- <u>B. malayi</u>	46
4.1.1.	Sélection des anticorps monoclonaux.....	46
4.1.2.	Activité biologique <u>in vitro</u> des anticorps monoclonaux.....	47
4.1.3.	Protection passive <u>in vivo</u> des anticorps monoclonaux.....	47

4.1.4.	Identification des antigènes de surface reconnus par l'anticorps monoclonal AA ₃ -44 de type IgM.....	48
4.1.5.	Discussion.....	50
4.2.	Analyses sur la spécificité d'espèce de l'antigène 110 Kd.....	51
4.2.1.	Reconnaissance de l'antigène de 110 Kd par des sérums des malades infectés par différentes filaires.....	51
	- Origine des sérums étudiés.....	51
	- Résultats.....	52
	- Discussion.....	53
4.2.2.	Reconnaissance de l'antigène 110 Kd par les sérums des malades infectés par différents helminthes.....	54
	- Résultats.....	54
	- Discussion.....	54
4.3.	Analyses sur la spécificité de stade évolutif de l'antigène 110 Kd.....	55
4.3.1.	Immunoprécipitation des antigènes de surface de la microfilaire de <u>B. malayi</u> par les sérums de souris d'infection expérimentale.....	55
	- Résultats.....	55
	- Discussion.....	56

4.3.2. Utilisation de l'anticorps monoclonal	
AA ₃ -44.....	57
- Résultats.....	58
- Discussion.....	58
4.4. Immunoprécipitation des antigènes de surface	
de la microfilaire de <u>B. malayi</u> , par les sérums	
des souris Balb/C "nude " et "nu ⁺ ".....	58
- Résultats.....	59
- Discussion.....	60
<u>CHAPITRE V</u> DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67

RESUME

L'étude des antigènes filariens par l'utilisation de sérum de patients ou d'animaux infectés n'est pas adéquate étant donné la grande fréquence des réactions croisées entre les différentes filaires et d'autres nématodes. Dans ce contexte, l'outil monoclonal s'avèrait extrêmement utile. Pour cette raison, des anticorps monoclonaux ayant une réactivité anti-Brugia malayi ont été produits. L'un d'entre eux s'est révélé capable de tuer les microfilaires de B. malayi in vitro en présence de cellules adhérentes et de complément et de conférer par transfert passif une résistance contre la microfilaire de B. malayi chez la souris. Cet anticorps monoclonal de type IgM désigné AA₃-44 a également permis selon la technique d'immunoprécipitation suivie d'une analyse en gel de polyacrylamide-SDS, l'identification d'une molécule de 110 Kd, présente sur la surface de la microfilaire de B. malayi. Ceci nous a laissé penser que cet antigène pourrait avoir un rapport avec l'immunité contre la microfilaire. L'étude de la reconnaissance de cet antigène par les anticorps présents dans l'infection naturelle chez l'homme, par l'utilisation de sérum d'individus infectés par B. malayi, et par d'autres filaires telles que Onchocerca volvulus et Loa loa a été entreprise. L'antigène de 110 Kd est reconnu par les anticorps de patients microfilarémiques et amicrofilarémiques indiquant ainsi l'immunogénicité de cette molécule, mais ne montrant pas par la même occasion, qu'elle puisse avoir un rapport avec l'immunité contre la microfilaire. Ceci élimine donc la possibilité d'utiliser cet antigène comme un marqueur de l'infection pour distinguer la phase patente (microfilarémie) de la phase latente (amicrofilarémie). D'autre part cet antigène ne serait pas spécifique d'espèce puisqu'il est précipité aussi par les anticorps présents dans le sérum d'individus

onchocerquiens et loasiques. En conséquence nous avons cherché à savoir si cet antigène est commun seulement au groupe des filaires ou s'il peut être reconnu aussi par les anticorps présents dans le sérum d'individus infectés par d'autres helminthes en l'occurrence Ascaris lumbricoides, Dracunculus medinensis et Schistosoma mansoni. L'antigène 110 Kd est précipité par le sérum d'individus infectés par A. lumbricoides et D. medinensis; par contre le sérum d'individus infectés par S. mansoni ne reconnaît pas cette molécule. Ainsi cet antigène serait spécifique de la classe des nématodes.

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons analysé la spécificité de l'antigène de 110 Kd vis-à-vis des différents stades évolutifs de B. malayi et Dipetalonema viteae. Nous avons utilisé pour cette étude les sérums des souris d'infection avec différents stades évolutifs de D. viteae et B. malayi et l'anticorps monoclonal AA₃-44. Les divers sérums d'infection des souris contiennent tous des anticorps qui reconnaissent la molécule 110 Kd. L'utilisation de l'anticorps monoclonal a permis de montrer: - l'absence d'antigènes cibles au niveau de la surface de l'adulte de D. viteae, - la présence de plusieurs molécules sur la surface de l'adulte de B. malayi et des microfilaires de D. viteae identifiées par cet anticorps monoclonal, - l'existence d'une parenté antigénique au niveau de la 110 Kd entre la microfilarie de D. viteae et celle de B. malayi

Dans la dernière partie de notre étude, l'utilisation de souris Balb/C "nude", nous a permis d'analyser l'importance des cellules T dans la réponse immune vis-à-vis de l'antigène 110 Kd. Nous avons constaté que la réponse immune dirigée contre cet antigène est dépendante des cellules T.

INTRODUCTION

Les filarioses sont des maladies très répandues dans les régions tropicales. On estime à 300 millions le nombre de personnes atteintes. Ce chiffre explique à lui seul l'intérêt porté à l'étude de ces affections. Ces parasites provoquent toute une série de manifestations cliniques dues à la réponse immune de l'hôte. Il s'avère donc nécessaire de caractériser et d'isoler les antigènes impliqués dans ces manifestations afin de les utiliser pour détecter l'infection.

Il a été bien établi que la surface des nématodes est la cible d'une variété de réponses immunes de l'hôte, qui peuvent provoquer la mort des larves in vitro (Butterworth et al., 1977; Mackenzie et al., 1977; Tanner et Weiss, 1978; Haque et al., 1980). Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à l'identification des antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi qui pourraient être impliqués dans l'immunité contre le parasite ou utilisés dans le diagnostic de l'infection. L'analyse des antigènes parasitaires par les sérums de malades ou les sérums d'infection expérimentale est rendue difficile à cause des réactions croisées fréquentes entre différentes espèces filariennes et d'autres nématodes. Nous avons utilisé pour cette analyse des anticorps monoclonaux anti-B. malayi.

L'immunoprécipitation suivie d'une séparation en gel de polyacrylamide est la méthode de choix pour l'analyse des antigènes protéiques qui peuvent être radiomarqués en surface.

Avant d'aborder les résultats de notre étude sur ces antigènes,

nous présenterons le cycle des filaires humaines et résumerons les données acquises relatives au développement d'un état d'immunité chez l'hôte.

GENERALITES

1.1. Cycle évolutif général des filaires et biologie du parasite.

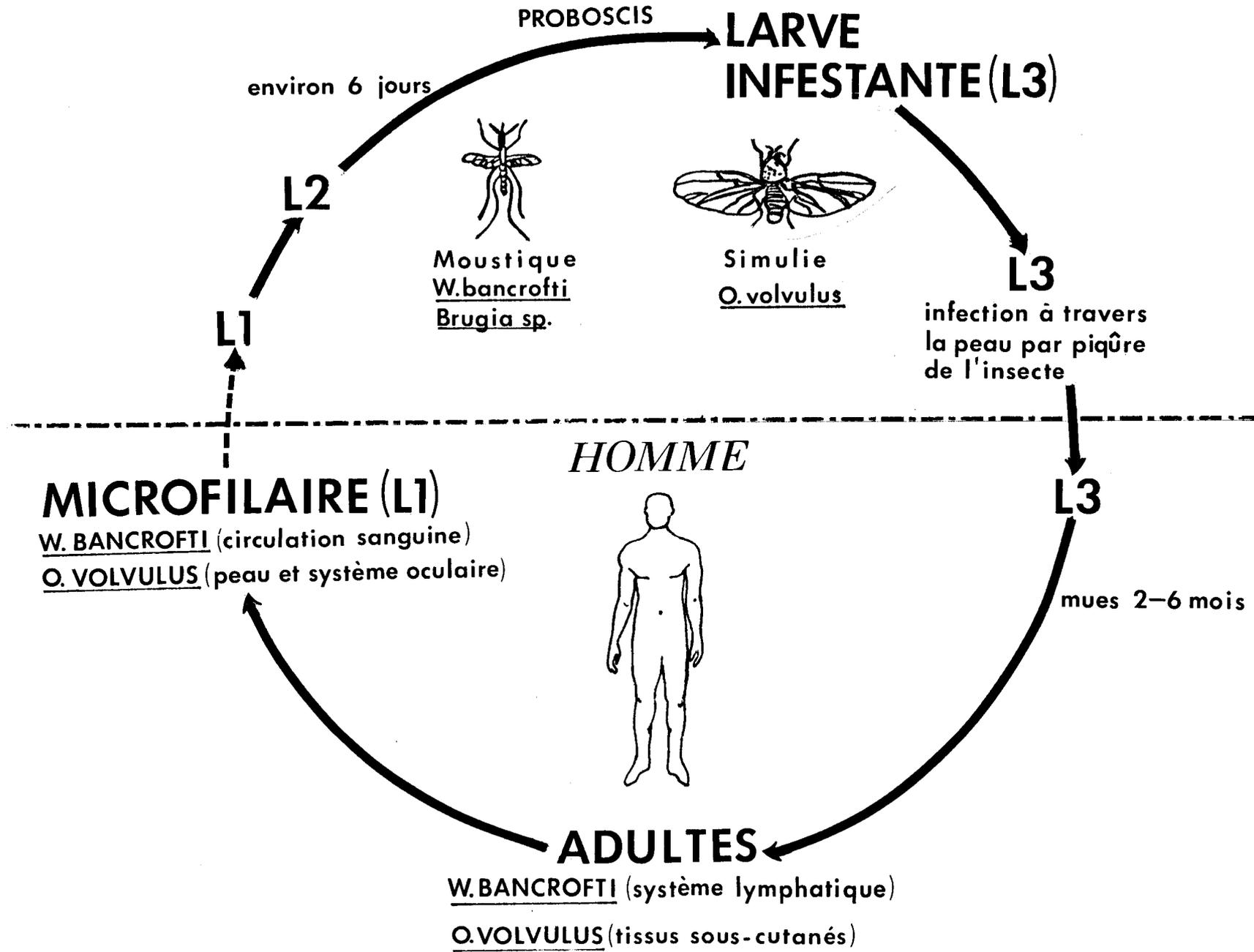
Les filarioses sont un groupe de maladies causées par des nématodes de la famille des Filaroidea. Les filaires adultes vivent dans les tissus ou les cavités d'un hôte vertébré. Les femelles matures produisent des embryons ou microfilaires (L_1) qui se trouvent dans la circulation sanguine ou au niveau de la peau. La transmission se fait par l'intermédiaire d'un vecteur arthropode hématophage qui ingère la microfilaire lors de son repas sanguin. Les microfilaires passent dans la cavité générale de ce vecteur où elles subissent deux mues pour devenir des larves infestantes (L_3). Lorsque le vecteur se nourrit du sang d'un hôte vertébré ces larves matures, situées dans les pièces buccales, lui sont transmises. Dans l'hôte approprié les larves infestantes se développent en filaires adultes dont le cycle évolutif général est montré dans la figure 1.

Dans cinq des filaires humaines qui sont Wuchereria bancrofti, Brugia malayi, Brugia timori, Loa loa, Dipetalonema perstans, Dipetalonema streptocerca et Mansonella ozzardi, les microfilaires (1er stade larvaire (L_1)) apparaissent dans la circulation. La microfilaire d'une sixième filaire humaine, Onchocerca volvulus, ne passe pas dans la circulation, mais migre dans les tissus sous-cutanés et dans le derme.

Les vers adultes vivent dans les vaisseaux et les ganglions lymphatiques. Les adultes d'O. volvulus et de L. loa envahissent les tissus sous-cutanés.

Quelques caractéristiques particulières dans le cycle et la biologie des filaires doivent être considérées. Il existe peu

VECTEUR



d'informations sur la voie de migration de la larve infestante (L₃) et du 4ème stade larvaire chez l'homme. Probablement plusieurs stades du cycle sont présents en même temps chez des individus qui habitent dans des zones endémiques.

La présence d'une gaine autour des microfilaires de quelques espèces filariennes et ses propriétés physiologiques et biochimiques ont suscité des questions jusqu'alors sans réponse. La gaine de la microfilaire de Brugia pahangi réagit avec la concanavaline A et la "wheat germ agglutinin", ce qui indique la présence de N-acétyl-glucosamine et de glucose ou de mannose à la surface du parasite.

Le même hôte vecteur peut avoir simultanément des larves infestantes de plusieurs espèces filariennes (Voelker et Garms, 1972). D'autre part le nombre de microfilaires présentes dans la circulation sanguine ne correspond pas nécessairement au nombre de femelles adultes chez l'hôte (Worms, 1972 ; Pacheco, 1974) et ne représente pas le nombre total de microfilaires produites par les femelles (Beaver et al., 1974 ; Denham et al., 1972b). Il se peut que quelques microfilaires soient présentes dans d'autres organes (par exemple, le poumon, le foie, la rate ou le rein), surtout dans le cas des infections sévères (Grove et al., 1979 ; Van Marck et al., 1983). Chez quelques espèces filariennes, on observe une fluctuation dans le nombre des microfilaires présentes dans la circulation selon un rythme prévisible sur une période de 24 heures. Ce phénomène est connu sur le nom de périodicité circadienne (Manson, 1888 ; Hawking, 1967 ; Anderson et al., 1975). Les facteurs responsables de cette périodicité sont probablement physiologiques ; le relâchement de l'hôte pendant le sommeil serait responsable de la migration microfilarienne à la périphérie pendant la nuit, mais cette explication ne serait pas applicable dans le cas des filaires qui ne présentent pas de périodicité. Il a été avancé

comme explication la possibilité d'une réponse des microfilaires à l'O₂ ou au CO₂. Manson (1888), a suggéré qu'une adaptation de la microfilaire a lieu suivant les heures auxquelles le vecteur prend son repas sanguin.

Il est clair qu'une bonne connaissance de ces mécanismes biologiques parasitaires est indispensable pour mieux combattre les maladies causées par les filaires.

Les filarioses sont des maladies chroniques qui ne mettent que rarement la vie du malade en danger. En cela, elles se distinguent de certaines affections tropicales comme par exemple le paludisme ou la maladie du sommeil qui entraînent un taux de mortalité élevé.

De toutes les filaires, O. volvulus et les filaires lymphatiques W. bancrofti et Brugia sont les plus redoutables. O. volvulus peut entraîner des lésions oculaires conduisant à la cécité, et les filarioses lymphatiques peuvent présenter dans certains cas des manifestations cliniques extrêmes d'éléphantiasis.

Les filarioses représentent un grave problème du fait que la majorité des individus habitent, dans des conditions très pauvres, dans les villages ruraux des pays en voie de développement où les conditions de santé sont reliées à une survie économique. Il existe donc des motivations humaines et économiques pour contrôler ces maladies. Cependant, peu de travaux ont été effectués dans l'immunologie des filarioses car elles ont une spécificité étroite pour l'espèce humaine et leurs cycles évolutifs ne peuvent être maintenus sur des animaux de laboratoire ; ceci est le cas d'O. volvulus et de W. bancrofti, agents responsables des deux filarioses humaines majeures. Les études doivent donc être effectuées obligatoirement sur les malades.

Néanmoins, quelques travaux ont été réalisés : Cross et al. (1979) ont obtenu la maturation et la production de microfilaries de W. bancrofti chez des singes; Duke, (1959) a utilisé aussi des singes pour étudier la Loase; Schacher, (1973, 1974) a décrit 85 cycles filariens, naturels ou expérimentaux et souligné les avantages présentés par les cycles établis chez les rongeurs, les chats, les chiens et les petits primates, ceci bien que le maniement de ces cycles soit délicat et qu'à quelques exceptions près, aucun de ces modèles ne se rapproche suffisamment de la filariose humaine pour permettre une extrapolation directe.

Dans les dernières années, plusieurs travaux ont été effectués dans le domaine de la filariose expérimentale des rongeurs. La découverte d'une remarquable susceptibilité des Mérions à l'infection par B. malayi (Ash et Riley, 1970 et Ash, 1973), a permis l'obtention de filaires humaines vivantes dans le laboratoire.

Les modèles expérimentaux qui ont été étudiés dans ce travail sont ceux de la filaire humaine B. malayi et de la filaire expérimentale Dipetalonema viteae (voir chapitre III, paragraphes 3.2 et 3.3).

La grande spécificité de l'hôte vis-à-vis des filaires s'exprime particulièrement contre la larve infestante (L_3) (Townson et al., 1981; Ahmed, 1967; Haque et al., 1981). Des hôtes vertébrés qui montrent une résistance vis-à-vis des larves (L_3) peuvent par contre supporter, au moins pendant quelques semaines, le transfert de vers

adultes et de microfilaires (Grove et al., 1979 ; Thompson et al., 1979 ; Haque et al., 1980b). Nous avons établi ce type d'infestation chez le rat et la souris par D. viteae et B. malayi pour l'étude de la réponse immunitaire vis-à-vis de la microfilarie et de l'adulte.

L'IMMUNITE AUX ANTIGENES FILARIENS

2.1. Réponse immune de l'hôte

2.1.1. Larve infestante (L₃)

Dans les filarioses, des études épidémiologiques en zones endémiques indiquent que tous les individus sont exposés de la même façon à des infections par des filaires. Bien que certains individus présentent des symptômes aigus dus à l'infection, d'autres ne montrent aucun signe clinique ou parasitologique. Les travaux de Denham et al., (1972b) montrent que parmi une population de chats ayant reçu des infections répétées de 50 larves infestantes de Brugia pahangi tous les 10 jours, certains animaux sont capables à un moment donné d'éliminer la microfilaire présente dans la circulation. Ces résultats suggèrent que des réinfections successives par des larves infestantes (L₃) peuvent conférer une immunité qui se traduit par l'élimination de la microfilaire du torrent circulatoire et par une prévention à des infections ultérieures. Néanmoins, il existe peu d'évidence directe concernant l'immunité dirigée contre la larve infestante chez des hôtes susceptibles. En conséquence des hôtes naturellement résistants aux infections par différentes filaires ont été utilisés pour analyser la réponse immune vis-à-vis de larves L₃ (Vincent et al., 1980 ; Suswillo et al., 1980 ; Haque et al., 1981).

Les rats peuvent être infectés par B. pahangi mais le parasite se développe difficilement, et la microfilarémie ne s'observe pas dans toutes les souches de rats infectés (Weller, 1978; Sucharit et Mc Donald, 1973). Ceci suggère l'intervention de facteurs génétiques dans le développement de l'infestation (Fox et Schacher, 1976).

D'autre part, des rats et des souris dépourvus de thymus ("nude") sont susceptibles aux infections par des filaires, ce qui souligne l'importance des cellules T dans l'immunité contre les larves L₃. Les rats dépourvus de thymus permettent le développement de l'infection par D. viteae (Haque et al., 1981), et la résistance des souris à l'infection de B. pahangi est partiellement dépendante du thymus (Vincent et al., 1982 ; Suswillo et al., 1980). L'infection par B. pahangi est plus longue chez les rats "nude" que chez les rats normaux de la souche PVG chez lesquels on observe une absence de microfilarémie ou de vers adultes associée à la présence d'IgE ; ceci suggère la possibilité d'un rôle protecteur des IgE et l'intervention des lymphocytes T.

Le rôle des anticorps peut être étudié in vivo par le transfert passif d'un immunosérum ou par blocage de la synthèse d'anticorps à l'aide d'un sérum anti- μ . Ainsi, dans les infections par Schistosoma mansoni, le transfert passif d'un immunosérum à des rats de différentes souches (Perez, 1974 ; Phillips et al., 1977) ou des injections de sérum anti- μ à des rats nouveau-nés (Bazin et al., 1980) ont montré que les anticorps jouent un rôle fondamental dans l'immunité contre S. mansoni. De telles études in vivo n'ont pas été effectuées dans les infections filariennes, mais in vitro des cultures de parasites en présence d'anticorps seuls ou d'anticorps associés à différentes populations cellulaires ont mis en évidence le rôle des anticorps dans l'immunité contre la larve infectante L₃. Dans les travaux de Tanner et Weiss (1981b), les larves L₃ de D. viteae sont maintenues chez des mériens sains pendant 5 jours,

avant d'être incubées in vitro en présence du sérum normal ou d'un immunsérum. Toutes les larves cultivées en présence de l'immunsérum meurent sans changer de stade. Par contre, 50 % des larves cultivées en présence d'un sérum normal subissent une mue et seulement 16 % d'entre elles meurent. L'immunsérum devient inefficace après chauffage à 56°C pendant une demi-heure, indiquant que les anticorps impliqués dirigés contre la surface de la larve infestante seraient de type IgM ou IgE ; il n'est pas possible d'exclure le rôle du complément dans la réaction. Haque et al. (1982) observent que la destruction des larves L₃ de D. viteae par des cellules (principalement des éosinophiles, mais aussi des macrophages) est dépendante du complément. Johnson et al. (1981) montrent que des granulocytes de félin peuvent adhérer à la larve infestante de B. pahangi en présence d'anticorps dirigés contre la larve L₃ ; cette adhérence n'est pas altérée par une inactivation préalable du sérum. Higashi et Choudhury (1970) ont observé une adhésion sélective des éosinophiles vis-à-vis des larves infestantes de W. bancrofti, en présence d'anticorps anti-larve L₃, contenus dans le sérum de patients infestés avec W. bancrofti. D'autres travaux montrent la destruction des larves L₃ de B. malayi, in vitro, faisant intervenir des cellules et des anticorps (Sim et al., 1982). Les anticorps impliqués dans cette lyse in vitro et présents dans le sérum de patients ayant

un éléphantiasis et une éosinophilie pulmonaire tropicale, ainsi que dans le sérum de patients ayant un éléphantiasis et une éosinophilie pulmonaire tropicale, ainsi que dans le sérum de patients amicrofilarémiques, seraient de type IgG. Des anticorps dirigés contre la larve infestante d'O. volvulus sont présents dans les sérums d'individus vivant en zones endémiques (Mackenzie, 1980).

2.1.2. Microfilaire

La réponse immunitaire dirigée contre la microfilaire, cible principale contre laquelle l'hôte vertébré peut diriger la réponse immunologique, est probablement l'aspect le plus étudié des filarioses.

Dans le domaine de la filariose expérimentale, plusieurs travaux montrent le développement d'une immunité acquise contre la microfilaire présente dans la circulation sanguine. Duke (1960) utilisant des singes pour étudier la loase, Ramakrishnan et al. (1962) avec des rats albinos infectés par L. carinii, Haque et al. (1978a) avec des hamsters infectés par D. viteae et Worms (1972) avec des chiens infectés par différentes espèces de Dirofilaria, ont observé que les vers adultes, trouvés à l'autopsie quand la microfilarémie avait disparu de la circulation (infection latente ou occulte), étaient capables de produire à nouveau des microfilaires quand ils étaient transférés chez des hôtes sains.

Différents auteurs ont observé une corrélation entre la disparition de la microfilarémie et l'apparition d'anticorps, aussi bien dans le cas des filarioses humaines qu'expérimentales (Ponnudurai et al., 1974; Weiss, 1978; Wong et Guest, 1969; Grove et Davis, 1978). C'est ainsi que le transfert répété d'un sérum contenant des anticorps anti-microfilaires, réduit considérablement le nombre de microfilaires chez des chiens infectés avec D. immitis ou B. pahangi (Wong, 1964). De même, le transfert du sérum de hamsters ayant une infection latente et un stade précoce de la microfilarémie, supprime les parasites en circulation chez les hamsters receveurs (Haque et al., 1978a). Par contre, le transfert du sérum de hamsters au moment du pic de la microfilarémie était moins efficace. Le transfert passif de sérums de souris immunisées avec des extraits solubles de microfilaires de B. malayi, a conféré une résistance (entre 77 et 100 %) aux receveurs sains vis-à-vis des microfilaires (Kazura et Davis, 1982).

Les anticorps peuvent agir en coopération avec des cellules dans l'adhérence et la destruction des microfilaires in vivo. Les microfilaires de D. viteae, implantées chez des hamsters dans des chambres "micropore" sont tuées après 24 h chez des animaux amicrofilarémiques mais restent vivantes chez les hamsters sains. Par contre, chez les hamsters microfilarémiques on observe une mortalité partielle (Weiss et Tanner, 1979). Les cellules impliquées dans l'adhérence sont principalement des neutrophiles et quelques éosinophiles (Rudin, 1980). Une adhérence de ces cellules et la destruction des microfilaires chez les animaux sains en présence soit de sérum de hamsters amicrofilarémiques, soit de la fraction 19S de ce sérum, ont été constatées. Ceci suggère la participation des anticorps de type IgM chez des hamsters infectés par D. viteae. Des hamsters dépourvus de thymus, sont capables de contrôler la microfilarémie et de pro-

duire des IgM. La production de ces immunoglobulines est généralement indépendante des cellules T (Weiss, 1978). Le contrôle et la suppression de la microfilarémie dans les infections par D. viteae ne sont pas toujours indépendants des cellules T. Chez des souris consanguines Balb/c "nude " infectées, le contrôle de la microfilarémie est dépendant des cellules T ; par contre, la destruction de la microfilaire chez les souris non consanguines "nude " est indépendante des cellules T (Haque et al., 1980b). Thomson et al. (1979) ont étudié l'élimination de la microfilarémie de D. viteae chez des souris ayant reçu des vers femelles par voie sous-cutanée. L'évolution de la microfilarémie chez des souris CBA/H normales et CBA/N consanguines est différente ; les animaux de la souche CBA/N ne répondent pas à certains antigènes indépendants du thymus et on peut noter une diminution du taux des IgM et des IgG₃. D'autre part, l'incapacité de ces animaux à éliminer les larves L₁ est en corrélation avec l'absence d'anticorps IgM et suggère la participation de ces immunoglobulines dans la disparition de la microfilarémie.

La réponse immune de l'hôte vis-à-vis de la microfilaire dans les infections par D. viteae chez des rats est différente de celle des souris. La destruction de la microfilaire se fait principalement par les IgE dont la production est dépendante des cellules T (Haque et al., 1981). Des études d'immunoabsorption ont identifié des IgE dans du sérum de rats amicrofilarémiques après une deuxième transplantation. En présence de ce sérum, les auteurs constataient l'adhérence des macrophages de rats sains aux microfilaires in vitro et la mort de 90 % des parasites après 16 à 24 heures de culture. Cette destruction de la microfilaire semble être spécifique du stade évolutif parasitaire. Une réponse similaire, faisant intervenir des IgE et

des macrophages, a été observée dans les infections par L. carinii chez des rats (Mehta et al., 1980). Dans les infections par D. viteae chez des rats, des neutrophiles en présence des IgE, des IgG et du complément, peuvent tuer la microfilaire in vitro, mais l'absence d'un de ces facteurs sériques permet la survie du parasite (Noël et al., 1984).

De nombreux auteurs ont montré que les microfilaires de plusieurs espèces sont tuées in vitro par des réactions faisant intervenir des anticorps et des cellules, mais les cellules et les anticorps impliqués sont de types différents. Ainsi, Johnson et al., (1981) observent l'adhérence et la destruction de la microfilaire de B. pahangi par des éosinophiles de félin, en présence des IgG. Les travaux de El Sadu et al. (1983) montrent la destruction de la microfilaire de D. immitis par des neutrophiles en présence des IgM. Pour B. malayi, Aiyar et al. (1982) observent principalement des neutrophiles mais aussi des éosinophiles qui adhèrent et détruisent les microfilaires en présence des IgG. Mehta et al. (1981) obtiennent l'adhérence et la destruction de la larve L₁ de W. bancrofti par des neutrophiles, en présence des IgG dirigées contre la gaine de la microfilaire. Enfin, Greene et al. (1981) montrent la destruction de la microfilaire d'O. volvulus par des éosinophiles mais aussi des neutrophiles, en présence des IgG.

2.2. Immunisation par différentes sources d'antigènes

Des injections avec des antigènes somatiques provoquent une réponse humorale mais cette réponse n'est pas toujours suivie d'une augmentation de la résistance à l'infection (Stoll, 1961 ; Silverman, 1970). Une série d'injections d'homogénat de vers

adultes de Dirofilaria immitis à des chiens ne réduit pas le nombre de vers adultes (Feng, 1937). D'autres essais d'immunisation par des extraits de vers adultes ne confèrent pas une protection appréciable (Murata, 1939 ; Krishnaswami et Pattanayak, 1959). Par contre, des travaux indiquent la possibilité de conférer une immunité par des injections d'homogénat de vers adultes. Des hamsters recevant des extraits de vers femelles gravides de D. viteae sont capables de réduire significativement le nombre de vers adultes et de microfilaries établies lors d'une réinfection (Haque et al., 1978a). Dans une autre étude (Mehta et al., 1981), l'immunisation de rats albinos en présence d'adjuvant complet de Freund, avec des microfilaries ou des larves infestantes de L. carinii, soumises aux ultrasons, réduit la survie des vers adultes de 12 % à 1 %, et les microfilaries ne sont pas détectables. L'homogénat provenant de vers adultes et qui ne contient pas de microfilaries n'est pas efficace. Ces résultats et d'autres travaux montrent que les effets de l'injection d'antigènes somatiques dépendent de la qualité de la préparation mais aussi du mode d'immunisation. Par exemple, chez des hamsters qui reçoivent deux injections d'un homogénat de 25000 microfilaries fraîches, aux jours 40 et 45 après une injection de larves infestantes, on observe une réduction du nombre de microfilaries par rapport aux témoins. Par contre, des hamsters recevant six injections d'homogénat de 500 microfilaries tous les 4 jours, présentent dès le 25^{ème} jour après la dernière injection une augmentation de la microfilarémie. La microfilarémie a persisté plus longtemps chez ces animaux que chez les témoins et le traitement n'a pas eu d'effet sur le nombre de vers adultes (Haque et al., 1978a).

Des vaccins produits à partir de larves L₃ irradiées stimulent faiblement la réponse immune de l'hôte contre les infections par des filaires et ils ne confèrent pas une protection immune appréciable. Des injections par des larves L₃ irradiées de Brugia malayi à des singes rhésus et à des chats n'ont pas donné une réponse immune protectrice et les femelles ne sont pas devenues stériles (Ramachandran, 1970 ; 1975). Par contre, si les larves reçoivent une dose élevée d'irradiation, elles peuvent conférer une certaine immunité lors d'une réinfection. L'injection de larves infestantes irradiées de L. carinii à des rats albinos a des effets marqués sur les adultes et sur la microfilarémie. La dose d'irradiation était importante et une résistance efficace est observée à une dose de 40 Krad (Rao, 1977). Des résultats semblables ont été observés lors des injections de larves L₃ de B. malayi chez des singes, des chats et des chiens avec Brugia pahangi et des chiens avec Dirofilaria immitis (Denham, 1980).

2.3. Mécanismes d'évasion du parasite à la réponse immune de l'hôte

Malgré la diversité des mécanismes de défense mis en oeuvre par le système immunologique de l'hôte, les filaires ont la capacité de survivre très longtemps chez leurs hôtes vertébrés. Nous pouvons supposer que les filaires ont, soit la possibilité d'esquiver les mécanismes de défense mis en jeu par leurs hôtes, soit qu'elles s'adaptent à cette réponse immunitaire. Ces mécanismes d'évasion pourraient expliquer la survie du parasite, la pérennité de l'infection et donc de sa transmission.

Le phénomène de variation antigénique, observé chez certains protozoaires, ne se présenterait pas dans le cas des helminthes. Néanmoins, par l'utilisation d'un marqueur enzymatique, la phosphatase acide, des différences antigéniques ont été observées entre des vers adultes d'Onchocerca volvulus provenant de souches forestières et celles provenant de savane au Cameroun. Les filaires adultes provenant de souches de savane possèdent un antigène qui est absent sur les vers adultes des souches forestières (Bryceson et al., 1976). En utilisant la même technique, Brun-Munzinger et Southgate (1977), Yarzabal et al. (1983) ont observé des souches différentes de microfilaires d'O. volvulus ; 5 types de répartition de l'activité enzymatique ont pu ainsi être répertoriés. D'autres auteurs ont indiqué des différences au niveau des microfilaires d'O. volvulus : formes "large" et "petite", les deux formes pouvant être présentes en même temps chez un même patient (Watson, 1960 ; De Buen, 1971). L'activité thérapeutique de la diéthylcarbamazine (DEC) dans les infections filariennes s'effectue, en partie, par l'intermédiaire des anticorps anti-filariens ; l'existence d'un nombre réduit de microfilaires après traitement par le DEC, suggère la présence d'une population microfilarémique hétérogène du point de vue antigénique chez le même hôte (Kobajaski et al., 1969 ; Piessens et Beldekas, 1979).

Un des mécanismes possibles d'évasion du parasite à la réponse immune pourrait s'effectuer par l'adsorption non spécifique d'antigènes de groupes sanguins ou d'autres antigènes de l'hôte, mais aucune preuve directe ne vient argumenter cette hypothèse. L'utilisation de techniques de fluorescence a permis d'observer que des antigènes spécifiques des

groupes sanguins A et B pouvaient s'adsorber sur la gaine de la microfilaire de L. loa et W. bancrofti ; cette adsorption est réversible par incubation in vitro avec le sérum d'un groupe sanguin différent (Ridley et Hedge, 1977).

Des facteurs sériques de l'hôte ont été observés à la surface de la microfilaire de L. carinii (Court et Storey, 1981). De l'albumine sérique de l'hôte est adsorbée par la microfilaire d'O. gibsoni (Mitchell et al., 1982 ; Forsyth et al., 1982), de W. bancrofti (Maizels et al., 1984) et de L. carinii (Philipp et al., 1984). Malgré ces observations, il n'y a pas d'évidence sur le fait que ces molécules adsorbées à la surface du parasite vont altérer la réponse immune de l'hôte.

Le parasite pourrait libérer des substances qui auraient un effet régulateur sur la réponse immune. Le surnageant de culture des vers mâles provoque une augmentation de la microfilarémie chez les hamsters lorsqu'il est administré avant une infection par des larves L₃ (Haque et al., 1978). La fraction dialysable de l'incubat de vers mâles adultes de D. viteae a un effet inhibiteur sur la dégranulation des mastocytes (Haque et al., 1983); démontré par un test de PCA (Anaphylaxie Cutanée Passive).

Différents travaux montrent une altération de la réponse immunologique dans les filarioses. Une immunodépression généralisée a été observée chez des hamsters et des gerbilles infectés par D. viteae (D'Alesandro et Klei, 1976). Chez des malades infectés chroniquement par W. bancrofti, il se produit également une immunodépression avec une

diminution de la réponse immunitaire humorale et cellulaire, vis-à-vis d'antigènes non filariens (Grove et Forbes, 1979). Par contre, les résultats obtenus par différents auteurs dans les infections humaines et dans le domaine de la filariose expérimentale suggèrent un état d'immunodépression spécifique dans les infections par des filaires. Ainsi, les travaux de Ottesen et al., (1977) sur des malades infectés par des filaires lymphatiques, ceux de Bartlett et al. (1978) sur des malades infectés par O. volvulus, ceux de Portaro et al. (1976) chez des gerbilles infectées avec B. pahangi, ceux de Weiss (1978) chez des hamsters infectés avec D. viteae et enfin ceux de Haque et al. (1981) chez des souris infectées par D. viteae, montrent que les individus ou les animaux infectés, présentant une microfilarémie, répondent faiblement ou pas du tout vis-à-vis des antigènes filariens ; par contre, la réponse à d'autres antigènes ou à des mitogènes est normale.

2.4. Antigènes parasitaires

En ce qui concerne l'interaction hôte-parasite, plusieurs articles ont indiqué l'efficacité du système immunitaire de l'hôte vis-à-vis des nématodes parasites (Ogilvie et Love, 1974 ; Wakeline, 1978 ; Ogilvie, 1979 ; Maizels et al., 1982), mais le ou les mécanisme(s) d'action impliqué(s) restai(en)t à élucider. Au cours des dernières années, et à partir d'une observation faite par Butterworth et al. (1975) sur la destruction des schistosomes, il a également été possible d'obtenir la destruction des larves nouvellement pondues de Trichinella spiralis in vitro, en présence d'anticorps, de complément et de leucocytes (Kazura et Grove, 1978 ; Mackenzie et al., 1978).

C'est ainsi que, pour la première fois, était démontrée l'existence de mécanismes effecteurs cellulaires dépendant d'anticorps actifs in vitro sur des nématodes. Les anticorps responsables de l'adhérence des cellules au parasite ont pu être éliminés en les incubant avec des parasites vivants, confirmant ainsi indirectement que des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes de surface jouent un rôle fondamental dans la destruction de nématodes parasites in vitro. D'autre part, ces études ont montré qu'en surface se trouvent des antigènes très importants, responsables de l'activation des mécanismes effecteurs qui provoquent la mort du parasite.

Les parasites filariens sont aussi susceptibles d'être détruits in vitro par des cellules faisant intervenir des anticorps, au moins en ce qui concerne la microfilaire ; ces mécanismes pourraient constituer un modèle général dans l'élimination des nématodes parasites (Ogilvie et al., 1980 ; Haque et Capron, 1984).

Ces études ont permis de mettre en valeur l'importance de la surface des nématodes dans l'élimination de ces parasites par l'hôte, et c'est ainsi que les premiers travaux concernant l'identification des antigènes impliqués dans la reconnaissance de ces parasites ont été effectués. Les travaux réalisés par Parkhouse et al., (1981) sur des larves de Trichinella spiralis après iodination de sa surface par la méthode de la chloramine T (Hunter et Greenwood, 1962), et par le réactif de Bolton-Hunter, ont montré que la surface de nématodes vivants peut être marquée sans avoir d'effet sur la viabilité des parasites et que les molécules radioactives peuvent être

solubilisées et immunoprécipitées par des anticorps. Ces études, ainsi que celles réalisées par Maizels et al. (1983a) avec Nippostrongylus brasiliensis, montrent qu'un répertoire antigénique limité est exprimé à la surface de ces nématodes parasites. Un cas extrême de ce répertoire antigénique limité est illustré par la filaire Litomosoides carinii. L'immunoprécipitation des antigènes de surface, après marquage à ^{125}I suivie d'une analyse en gel de polyacrylamide-SDS, a permis d'identifier un antigène majeur de 55000 daltons à la surface des adultes et de la larve L₃ (Philipp et al., 1984). Des réactions croisées ont été observées entre les différents stades de L. carinii. Bien que des antigènes spécifiques de stade aient été mis en évidence par immunofluorescence dans les trois stades de D. viteae (Weiss et Tanner, 1981 ; Baschong et al., 1982), d'autres études indiquent une grande fréquence de réactions croisées entre les différents stades et espèces de parasites filariens. Ainsi, les travaux de Maizels et al. (1983) ont montré des réactions croisées entre les trois stades évolutifs des membres du genre Brugia. Les sérums d'infection de souris contre un stade évolutif ou une espèce ont des anticorps qui reconnaissent les antigènes de surface des autres stades et espèces. Les antigènes de surface d'adultes de B. malayi, B. timori et B. pahangi sont très homologues, ainsi que les antigènes de surface de la larve infestante L₃ des trois espèces et la microfilaire de B. malayi et B. pahangi. Ces antigènes de surface, présentant des réactions croisées, devraient rendre difficile la mise au point d'un test immunodiagnostique spécifique. Forsyth et al. (1981) ont utilisé la filaire bovine O. gibsoni pour développer un test immunodiagnostique. Ces auteurs ont pensé que si certains des antigènes de surface de la microfilaire

de ce parasite étaient spécifiques de stade entre les membres du genre Onchocerca, ce test pourrait être utilisé pour détecter des infections récentes ou chroniques. Ils ont observé que 8 des antigènes majeurs marqués à la surface de la larve L₁ étaient précipités par les anticorps présents dans le sérum de patients infectés avec O. volvulus et W. bancrofti. L'analyse plus détaillée des antigènes de surface de la microfilaire d'O. gibsoni par électrophorèse bidimensionnelle a toujours montré des réactions croisées au niveau des antigènes de surface.

De nouvelles possibilités dans la détection des antigènes spécifiques sont offertes par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ainsi, Canlas et Piessens (1984) ont pu mettre en évidence des antigènes spécifiques de stade de B. malayi par l'utilisation d'anticorps monoclonaux, quelques uns de ces anticorps monoclonaux reconnaissent des antigènes spécifiques de chacun des trois stades de B. malayi. Par contre, certains anticorps monoclonaux reconnaissent des antigènes communs à la filaire D. immitis, au nématode I. spiralis et au trématode S. mansoni.

Le diagnostic des infections filariennes dépend encore en grande partie de la détection des parasites, principalement de la microfilaire au niveau de la peau (malades onchocerquiens) ou dans la circulation sanguine (infections par B. malayi et W. bancrofti). Un diagnostic parasitologique n'est pas toujours adéquat étant donné les caractéristiques des infections filariennes. Par exemple, les infections prépatentes ou celles ne présentant pas de signes cliniques ne seront pas détectées. D'autre part, la différenciation entre les manifestations

cliniques des malades en zones endémiques est importante pour le traitement de la maladie, d'où l'intérêt de disposer de tests de diagnostic spécifiques. Il faudra donc aussi avoir recours à des antigènes spécifiques d'espèce ou de stade.

Les tests de diagnostic sont basés sur la détection des anticorps dans le sérum des malades par l'utilisation de différentes sources d'antigènes. Ces antigènes sont généralement obtenus à partir de coupes à congélation de vers adultes (Ambroise-Thomas et al., 1974) pour des tests d'immunofluorescence indirecte, ou à partir des extraits de filaires animales (Capron et al., 1968; Kagan et Norman, 1974; Ambroise-Thomas, 1980) pour des tests d'hémagglutination (Rose et al., 1966) ou de fixation de complément (Hedge et Ridley, 1977). Il faut souligner que le test d'immunoélectrophorèse offre plus d'exactitude dans le diagnostic de l'infection, même si des extraits de vers adultes de D. viteae sont utilisés ; la position de l'arc majeur de précipitation varie en fonction du type de filariose concernée (Capron et al., 1968).

Les méthodes utilisées pour la préparation des extraits antigéniques sont souvent drastiques, pouvant provoquer une dénaturation ou un réarrangement au niveau des molécules réactives spécifiques. La présence de molécules de l'hôte associées aux parasites représente aussi une difficulté dans la purification du matériel antigénique ; elles ont été observées dans des extraits antigéniques de vers adultes d'O. volvulus (Capron et al., 1968 ; Marcoullis et Grasbeck, 1976). D'autre part, se pose le problème de la spécificité des tests, étant donné qu'il existe une parenté antigénique, d'une part entre les filaires, et d'autre part entre les filaires et d'autres nématodes.

Il a été observé que les produits d'excrétion et de sécrétion (ES) de parasites peuvent offrir des possibilités pour la détection des infections filariennes. Ainsi, ces antigènes (ES) se sont révélés très spécifiques dans le diagnostic des infections par Toxocara canis (De Savigny et Tizzard, 1977). Par contre, les produits d'excrétion et de sécrétion de la microfilaire d'O. volvulus montrent des réactions croisées vis-à-vis des anticorps présents dans le sérum de patients infectés avec L. loa (Schiller et al., 1980). Les travaux de Daveau et Ambroise-Thomas (1982) ont permis d'améliorer la sensibilité et la spécificité du test d'ELISA pour le diagnostic des infections dues à O. volvulus grâce à l'utilisation des produits d'excrétion et sécrétion de vers adultes de ce parasite. Des résultats similaires ont été obtenus dans le diagnostic des infections par L. loa avec des produits d'excrétion et sécrétion dans le test d'ELISA.

D'autre part, la détection des antigènes circulants offre une alternative pour le diagnostic des infections filariennes. Les antigènes circulants sont définis comme des substances solubles d'origine parasitaire dans la circulation sanguine. Leur présence pourrait constituer un marqueur de l'infection pendant la période prépatente. Ainsi, des antigènes circulants ont été détectés dans le sérum de patients onchocerciens par l'utilisation d'un immunsérum anti-O. volvulus obtenu chez le lapin (Ouaissi et al., 1981); mais ce sérum a montré aussi des réactions croisées avec les antigènes circulants d'autres infections filariennes (W. bancrofti, L. loa, B. malayi). Dans ce contexte, l'utilisation des anticorps monoclonaux offre de nouvelles possibilités. Un anticorps monoclonal de type IgM dirigé contre O. volvulus a permis l'identification

des antigènes circulants par un test de radioimmunoprécipitation par le polyéthylène-glycol (RIPEGA) dans le sérum de malades infectés par ce parasite (Des Moutis et al., 1983). L'utilisation de l'anticorps monoclonal dans ce test a permis d'augmenter le degré de spécificité par rapport à l'immunsérum anti-O. volvulus dans le même test. De même, un anticorps monoclonal de type IgM anti-B. malayi peut détecter des antigènes circulants dans le sérum de patients et d'animaux infectés avec B. malayi par un test de RIPEGA (Haque et al., 1984). L'anticorps monoclonal détecte des molécules d'origine parasitaire dans le sérum des animaux infectés depuis 15 jours, donc ce test pourrait détecter l'infection à une phase précoce avant qu'elle ne devienne patente.

Dans l'étude des infections filariennes, un aspect important concerne les manifestations pathologiques et cliniques causées par les filaires lymphatiques et celles observées chez les malades onchocerquiens. Des études sur la pathologie des individus et des animaux d'expérience infectés par des filaires suggèrent que les manifestations cliniques des filarioses sont le résultat de la réponse immune de l'hôte aux antigènes parasitaires. Néanmoins, peu d'études ont été réalisées pour l'identification des molécules d'origine parasitaire, présentes à la surface ou dans les extraits somatiques des parasites, responsables de ces manifestations pathologiques et cliniques. Les lésions lymphatiques, observées lors d'une infection filarienne, sont probablement une conséquence de la réponse immune de l'hôte contre les antigènes filariens. Ainsi, la présensibilisation des mérions avec des microfilaires et des extraits antigéniques de vers adultes de B. pahangi augmente l'intensité des lésions lymphatiques chez ces animaux,

après une infection (Klei et al., 1982). La microfilarémie des mérions présensibilisés par des microfilaires est moins élevée que celle des animaux recevant des extraits antigéniques de vers adultes.

Dans l'éosinophilie pulmonaire tropicale lors des infections par les filaires lymphatiques, ces manifestations seraient le résultat de la réponse immune vis-à-vis de la microfilaire. En général, les microfilaires ne sont presque jamais observées dans la circulation mais elles sont éliminées au niveau du poumon et dans les ganglions lymphatiques (Webb et al., 1960 ; Joshi et al., 1969). La transfusion de microfilaires, suivie d'une infection par des larves L₃ de D. immitis, induit le même syndrome (éosinophilie pulmonaire tropicale) chez des chiens (Wong, 1974) ; malgré le développement de la larve infestante en vers adultes, ces animaux ne présentent pas de microfilarémie.

Il a été postulé qu'un contact prénatal avec des antigènes parasitaires pourrait influencer la réponse immune des enfants lors d'une infection filarienne. Weil et al. (1983) ont rapporté la possibilité d'une sensibilisation allergique prénatale aux antigènes filariens chez les descendants de mères infectées par W. bancrofti. Dans un modèle expérimental, les travaux d'Haque et Capron (1982) montrent que le passage transplacentaire de la microfilaire de D. viteae chez des rats induit une tolérance antigénique spécifique. Des études récentes suggèrent que les molécules tolérogéniques sont présentes à la surface et dans les extraits somatiques de la microfilaire de D. viteae (Haque et al., 1984).

MATERIEL ET METHODES

3.1. Animaux d'expérience

Les animaux utilisés sont des souris consanguines Balb/C (CNRS, Orléans), mâles et femelles, âgés de 8 à 12 semaines.

3.2. Entretien du cycle expérimental de *Dipetalonema viteae*

Le maintien au laboratoire de la filaire *D. viteae* a été mis au point par Baltazard et al., (1953) et par Worms et al., (1961). L'hôte naturel est le mérion, *Meriones libycus*, un rongeur des déserts d'Afrique du Nord et d'Asie Mineure. Le vecteur est un Argasidae; *Ornithodoros tartakovsky*. Au laboratoire, le cycle est aussi maintenu chez le hamster doré, *Mesocricetus auratus* (Worms et al., 1961). Chez le hamster et le mérion, les adultes vivent dans les tissus sous-cutanés et dans les couches musculaires superficielles. Les mâles ont une taille plus petite que les femelles et la partie postérieure est en spirale. Les femelles matures produisent des embryons larvaires, appelés microfilaires ou L₁ (premier stade larvaire). Les microfilaires sont observées dans la circulation environ 7 à 8 semaines après l'infestation et leur nombre est maximum vers la 10^{ème} ou 13^{ème} semaine ; elles disparaissent vers la 17^{ème} ou 19^{ème} semaine. Les microfilaires sont ingérées lors du repas sanguin des argas. Elles migrent dans la cavité générale de la tique où elles subissent deux mues pour devenir L₃ (3^{ème} stade larvaire). Après 3 à 4 semaines de développement, les L₃ matures sont transmises à l'hôte vertébré lorsque le vecteur se nourrit.

Au cours du cycle expérimental, les hamsters (Mesocricetus auratus) obtenus d'une source locale commerciale, à l'âge de 6 semaines, sont infestés par 200 larves L₃ obtenues à partir de tiques (Ornithodoros tartakovsky) infestées depuis 4 semaines. Les tiques sont infestées sur des hamsters qui présentent une microfilarémie de 60-70 microfilaires/10 μ l de sang.

Les larves L₃ proviennent de tiques infestées qui sont lavées brièvement dans l'alcool à 70°C, rincées dans une solution saline stérile puis disséquées avec de fines aiguilles dans une solution de Ringer contenant 100 UI de pénicilline et 100 μ g de streptomycine/ml. Les larves L₃ libérées sont débarrassées des morceaux de tissus provenant des tiques, comptées sous loupe binoculaire et injectées par voie sous-cutanée à des hamsters (200 L₃/hamster).

Environ 40 % de larves L₃ produisent des vers adultes en proportion sensiblement égale de mâles et de femelles persistant au moins 200 jours. La microfilarémie apparaît 55 jours environ après l'infestation par L₃, atteint un taux maximal à 75-85 jours puis décline et s'annule à 120-130 jours.

3.3. Cycle expérimental de *Brugia malayi*

Le maintien au laboratoire de la filaire *B. malayi* a été mis au point par Ash ,(1973).

L'hôte intermédiaire est le moustique *Aedes togoi* et l'hôte définitif est le rongeur *Mastomys natalensis* remplaçant l'homme, hôte définitif naturel (voir paragraphe 1.1.). Au laboratoire, le cycle a été

adapté aussi chez le rongeur Meriones unguiculatus, mais étant donné que chez ces animaux, les adultes ainsi que les microfilaires se logent dans la cavité péritonéale, ils sont utilisés principalement pour l'obtention de matériel parasitaire. Chez l'hôte définitif (Mastomys natalensis), les adultes se logent dans les voies lymphatiques.

L'élevage des moustiques se fait dans une pièce où l'humidité est maintenue constante. Les moustiques sont infestés en piquant le dos rasé des mastomys présentant une microfilarémie de 60 - 70 microfilaires/ 10 μ l de sang. La microfilarémie reste élevée pendant très longtemps chez ces animaux (environ 400 jours). Environ 3 jours après le repas sanguin des moustiques, les femelles pondent des oeufs qui donneront de nouveaux vecteurs. Les microfilaires ingérées par les moustiques lors de l'infestation, se transforment en larves infestantes ou L₃ 10 jours plus tard. A ce moment, les moustiques infestés sont placés dans une chambre froide à 4°C afin de les endormir, lavés dans de l'alcool à 70 % puis dans du Hanks Wallace PS, ensuite écrasés et filtrés dans ce même milieu. Les larves L₃ sont ainsi récupérées.

Les parasites sont comptés sous loupe binoculaire, 90 à 100 larves L₃ sont injectées par voie sous-cutanée à des Mastomys ou par voie intrapéritonéale à des mérions. Environ 90 à 100 jours après l'infestation, les femelles deviennent matures et la microfilarémie est observée dans la circulation sanguine chez le mastomys, chez les mérions la larve L₁ reste dans la cavité péritonéale.

3.4. Préparation des microfilaires (L1) de *D. viteae* in vitro

Des hamsters infestés depuis 90 à 95 jours par 200 larves L₃, sont sacrifiés et les vers femelles sont recueillis stérilement à partir des tissus sous-cutanés; nous obtenons ainsi 60 à 80 femelles (et autant de mâles) que nous lavons dans une solution de Ringer à 37°C.

Les vers femelles sont ensuite transférés dans des flacons (Falcon) de culture contenant 5 ml de milieu stérile (RPMI PS), à raison de 5 vers femelles par flacon. Cette culture est ainsi entretenue à 37°C en atmosphère de CO₂, avec changement quotidien du milieu. Dans ces conditions, les microfilaires sont produites in vitro par les vers femelles à partir du 2ème jour de culture.

Les microfilaires sont recueillies par filtration du milieu de culture sur filtre millipore 5 μ .

L'obtention de microfilaires à partir de vers femelles de *B. malayi* en culture n'a pas été possible étant donné le nombre limité d'adultes femelles obtenus chez les mériens.

3.5. Obtention des microfilaires in vivo de *B. malayi*

Les microfilaires sont obtenues chez des mériens ayant reçu 6 mois auparavant une infestation de 90 - 100 larves L₃ de *B. malayi* par voie intrapéritonéale.

La filtration du liquide de lavage sur filtre millipore 5 μ permet d'obtenir les microfilaires.

3.6. Protocole d'infection

10 vers femelles adultes sont transplantés dans chaque souris Balb/C. Ils sont introduits dans une poche sous-cutanée pratiquée sur la partie dorsale de l'animal qui a été préalablement rasée. Les animaux sont anesthésiés à l'éther et l'intervention est effectuée stérilement (Haque et al., 1980b, 1981).

Dans le cas d'infections par des microfilaires, les parasites produits soit in vivo soit in vitro sont récupérés dans du milieu Hanks Wallace et injectés par voie intraveineuse à raison de 100 000 microfilaires pour chaque souris.

L'infection avec des larves infestantes L₃ se fait par voie sous-cutanée et 70 L₃ sont introduites par souris.

3.7. Les sérums

3.7.1. Sérums de malades

Les sérums de patients infectés par B. malayi sont prélevés sur des sujets originaires d'Indonésie et Malaisie en zones de haute endémie, du sexe masculin et féminin, âgés entre 25 et 40 ans. La maladie de ces sujets est confirmée par l'observation de la microfilarémie et par un test d'ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay).

Afin d'analyser la spécificité des antigènes par les sérums de malades et les sérums d'infection expérimentale, nous avons utilisé des sérums de patients infectés par d'autres filaires humaines, en

l'occurrence: Loa loa et Onchocerca volvulus, ou par d'autres helminthes tels que Schistosoma mansoni, Ascaris lumbricoides et Dracunculus medinensis.

Les sérums des sujets normaux ont été prélevés chez des européens et chez des sujets originaires des zones endémiques pour lesquels les examens parasitologiques pour la recherche d'helminthiase ont été négatifs.

3.7.2. Sérums d'infection

Les sérums sont récoltés par ponction au niveau du sinus veineux rétroorbital à l'aide d'une micropipette en verre, sur des animaux infestés soit par des larves infestantes (L₃), soit par des vers adultes femelles ou des microfilaires.

3.8. Identification des hybrides producteurs d'anticorps anti-B. malayi

Une hybridation cellulaire a été réalisée en utilisant comme modèle expérimental la souris (voir page 47).

Cette étude a été réalisée sur les surnageants de culture testés simultanément par une technique radioimmunologique en phase solide (SRIA) et par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI).

3.8.1. Technique radioimmunologique en phase solide (SRIA)

Le principe de cette technique consiste à détecter les anticorps qui se fixent aux antigènes adsorbés sur un support solide. La réaction est révélée par un antisérum anti-immunoglobulines de souris marqué à ^{125}I .

100 μl d'une solution de l'antigène total soluble de vers adultes de B. malayi (5 $\mu\text{l}/\text{ml}$) sont incubés 3 heures à température ambiante dans chacune des cupules d'une plaque de chlorure de polyvinyle (Microtiter, Dinattech) ; cette incubation permet l'adsorption des protéines parasitaires sur les parois des cupules. Les cupules sont lavées 2 heures à température ambiante avec 200 μl de tampon PBS (0,01 M pH 7,4) additionné d'albumine sérique bovine à 2 % (p/v), afin de saturer les sites actifs restants sur les parois des cupules. Les cupules sont lavées une dernière fois en PBS.

-Réaction de SRIA

100 μl de chaque surnageant de culture à tester sont incubés 3 heures à 37°C dans des cupules traitées avec l'antigène. Les cupules sont ensuite lavées deux fois avec du tampon PBS additionné de 0,1 % de BSA et 0,05 % de Tween 20 (PBS-RIA), chaque cupule reçoit 100 μl d'une solution d'anti-immunoglobulines de souris marquée à ^{125}I (100 000 cpm par cupule).

Après 1 heure de contact à température ambiante, la radioactivité restant sur chaque cupule est mesurée dans un compteur gamma (Beckman) ; les résultats sont exprimés en coups par minutes (cpm) et correspondent à la moyenne arithmétique de 5 expériences.

Dans tous les essais le surnageant de culture de cellules myélomateuses et le sérum de souris saine ont été inclus comme témoins négatifs, le témoin positif étant le sérum de souris infectées par des larves infestantes L₃.

3.8.2. Immunofluorescence indirecte (IFI)

Cette technique a pour principe la détection des anticorps qui se fixent au parasite; la révélation de la réaction est faite à l'aide d'un sérum anti-immunoglobulines de souris, marqué à la fluoresceine.

- Réaction d'immunofluorescence

50 μ l de surnageant de culture (concentré 3 fois par lyophilisation) sont déposés sur des lames contenant des coupes à congélation de vers adultes. Après 30 min d'incubation à température ambiante, l'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages dans du tampon PBS.

La révélation de la réaction s'effectue avec 50 μ l d'un anti-sérum spécifique d'immunoglobulines de souris préparé chez le lapin (Cappel Lab. U.S.A.) marqué à la fluorescéine dilué au 1/30^{ème}. Après 3 lavages dans du tampon PBS, afin d'éliminer l'excès d'antisérum fluorescent, les coupes sont colorées par une solution de Bleu d'Evans au 1/10 000^{ème}. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, les coupes sont lavées dans du tampon PBS (3 x 10 min). Les préparations sont recouvertes avec une goutte de glycérol 50 % (v/v) en PBS et observées au microscope doté d'une source de lumière U.V.

L'expression des résultats s'effectue de 0 à 5 + , selon l'intensité de la fluorescence observée. Les témoins utilisés sont traités dans les mêmes conditions. Dans chaque lecture, nous avons inclu un sérum de souris saine, un surnageant de culture de cellules myélo-mateuses concentré 3 fois après lyophilisation et comme témoin positif un sérum de souris infectée.

3.9. Caractérisation des anticorps monoclonaux

La technique de double-diffusion en gel décrite par Ouchterlony, (1958) a permis l'identification de l'isotype des anticorps monoclonaux montrant une réactivité contre B. malayi.

Le principe de cette technique consiste à faire réagir les anticorps, présents dans les surnageants de culture, avec des sérums anti-immunoglobulines de souris. La réaction est révélée par une coloration à l'amidoschwarz.

3.10. Caractérisation des antigènes cibles

L'isolement et la caractérisation de(s) molécule(s) portant les déterminants antigéniques reconnus par l'anticorps monoclonal et par des sérums d'infection ont été envisagés par la technique d'immunoprécipitation. L'analyse des produits antigéniques purifiés selon cette technique a été réalisée en gel de polyacrylamide-SDS.

- Matériel antigénique

Nous avons utilisé des antigènes de surface pour la formation d'immuno-complexes. Cet antigène provient de microfilaires produites soit in vitro dans le cas de D. viteae, soit in vivo dans le cas de B. malayi.

Les vers adultes sont obtenus à partir des hamsters, dans le cas de D. viteae, et au niveau de la cavité péritonéale des mérions dans le cas de B. malayi.

3.10.1. Marquage des protéines de surface

Les protéines de surface de microfilaires et d'adultes sont marquées par le réactif de Bolton-Hunter ^{125}I (Bolton et Hunter, 1973). Dans ce marquage, 50 μl (0,250 mCi ^{125}I) de la solution de réactif sont déposés dans un tube conique en verre et le solvant (benzène) est évaporé par un faible flux de N_2 à la surface. 40×10^4 microfilaires ou 10 vers adultes (mâles et femelles) repris dans 100 μl de tampon EBSS (Earle's balanced salt solution), sont additionnés immédiatement au réactif; le marquage est réalisé à 4°C pendant 10 min. La réaction est arrêtée par l'addition de 20 μl d'une solution molaire de glycine dans le tampon EBSS. Les parasites ainsi traités, sont lavés 3 fois par 1 ml de tampon EBSS et centrifugés à 400 g pendant

15 min . Après lavage , le dernier culot est repris dans 500 μ l de tampon Tris (0,01 M pH 8) contenant du L-1-Tosylamide-2-Phenyl-Ethylchloromethyl Ketone (TPCK) et du N- α -p-Tosyl-1-Lysine Chloromethyl Ketone (TLCK) comme inhibiteurs enzymatiques. Les parasites sont ensuite soumis aux ultrasons 4 fois de suite pendant 30 secondes à l'aide d'une sonotrode type TC4C à une puissance de 25 W dans un appareil à ultrasons Type 20-200 S (A. Pons, France).

La solubilisation est complétée par l'addition de 120 μ l de tampon Tris 0,01 M pH 8 contenant 10% de désoxycholate (DOC). Après une incubation de 20 min à 4°C sous agitation, la suspension est centrifugée à 10.000 g pendant 15 min. Le surnageant contient les antigènes de surface marqués qui vont être utilisés dans le test d'immunoprécipitation.

3.10.2. Immunoprécipitation

- Formation d'immunocomplexes

Les immunocomplexes sont obtenus après incubation d'une nuit à 4°C, de 20 μ l d'extrait de parasites marqués (environ 100 000 cpm) auxquels sont additionnés soit 20 μ l de liquide d'ascite soit 20 μ l d'un sérum d'infection.

Le mélange est dilué dans 1 ml de tampon Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M, pH 7,4.

Un liquide d'ascite sans activité vis-à-vis de B. malayi et des sérums de souris saines sont utilisés comme contrôles.

- Isolement des immuncomplexes

Le principe de cette réaction est basé sur la propriété de la protéine A de se lier d'une façon spécifique et réversible à la partie constante des immunoglobulines (Kronvall et al., 1970).

Les immuncomplexes sont mélangés avec 10 mg (poids sec) de protéine A sépharose (CL - HB, Pharmacia, Uppsala - Suède), incubée préalablement avec 10 μ l d'antisérum spécifique des immunoglobulines de souris ou humaines (Nordic). Après 3 heures de contact à 4°C sous agitation rotative, la suspension est centrifugée 5 min à 1000 g. Le culot est lavé à plusieurs reprises avec du tampon Tris - HCl 0,01 M pH 8 contenant 2% de désoxycholate (DOC), Tris - HCl 0,01 M pH 8 et Tris - HCl 0,005 M pH 8 jusqu'à ce que le surnageant soit dépourvu de radioactivité.

L'élution des immuncomplexes est effectuée par traitement avec 40 μ l de tampon d'échantillon (Tris - HCl 62,5 mM pH 6,8, 3% SDS, 10% Sucrose, 0,005% Bleu de bromophénol) et par chauffage pendant 3 min à 100°C. Une centrifugation de 5 min à 1000 g permet de récupérer le surnageant qui est ensuite analysé par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

3.10.3. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-SDS

Cette technique permet la caractérisation du poids moléculaire des fractions antigéniques étudiées; cette technique est basée sur la propriété du sodium dodécyl sulfate (SDS) de dénaturer les protéines de façon à ce que la distance parcourue par les protéines soit fonction de leur poids moléculaire (Laemmli, 1970).

La séparation est effectuée dans un gel homogène de polyacrylamide 10% ou 13%, contenant 0,1% de SDS dans du tampon Tris - HCl 0,375 M pH 8,8. Les dimensions du gel sont de 14 x 16 cm et 0,75 mm d'épaisseur.

Le gel de concentration à 5 % de polyacrylamide est réalisé dans du tampon Tris - HCl 0,125 M pH 6,8 contenant 0,1 % SDS.

La migration dure 18 h à 6 mA dans le tampon Tris-glycine pH 8,3 contenant du SDS à 0,1 %.

Le gel est ensuite coloré pendant 2 h sous agitation dans une solution de Bleu de Coomassie R-250 (Merck) (0,850 g Bleu de Coomassie, 250 ml méthanol, 50 ml acide acétique, 250 ml eau). La décoloration est faite dans une solution d'acide acétique 8 %, méthanol 20 % ; le gel est déposé sur papier Whatman N°1 (Whatman Ltd, UK) puis séché par évaporation sous vide dans un appareil de séchage LKB (n° 2003).

- Autoradiographie

Le gel séché est exposé sur un film X-OMAT RP KODAK (Eastman Kodak Co., Rochester NY) entre deux écrans renforceurs Lightning Plus (Dupont de Nemours, France) ; le temps d'exposition varie de 1 à 8 jours à - 70°C.

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Obtention et caractérisation de l'anticorps monoclonal

AA₃-44 anti-B. malayi

4.1.1. Sélection des anticorps monoclonaux

Le schéma, présenté dans la figure 2, résume les différentes étapes de la fusion cellulaire et du clonage des cellules hybrides qui ont permis de sélectionner le clone AA₃-44.

Des cellules spléniques prélevées chez des souris Balb/C ayant subi des infections par des larves infestantes L₃ sont ajoutées à des cellules myélomateuses SP 2/0 qui ne synthétisent pas d'immunoglobulines; la fusion cellulaire a lieu en présence de polyéthylèneglycol (PEG) et de diméthylsulfoxyde (DMSO), et la sélection s'opère en milieu HAT (hypoxanthine, aminoptérine, thymidine). Le clonage cellulaire a été réalisé en répartissant une cellule par alvéole (technique de la dilution limite); les premiers clones apparaissent 8 à 15 jours plus tard et la sélection des clones s'opère sur le surnageant des alvéoles présentant un clone unique. Le clonage est fait deux fois pour assurer la pureté du clone et afin d'éliminer les éventuels mutants pouvant survenir au cours de la multiplication cellulaire.

La production massive des anticorps monoclonaux est obtenue par le développement d'ascites chez les souris Balb/C.

Enfin, l'application de la technique de fusion cellulaire a permis de sélectionner au laboratoire, divers anticorps monoclonaux dirigés contre B. malayi, parmi lesquels une immunoglobuline de type IgM, appelée AA₃-44, a été plus spécialement étudiée pour ses propriétés biologiques particulières. Les résultats sont montrés dans le tableau I ("Résistance against Brugia malayi microfilariae induced by a monoclonal antibody that promotes killing by

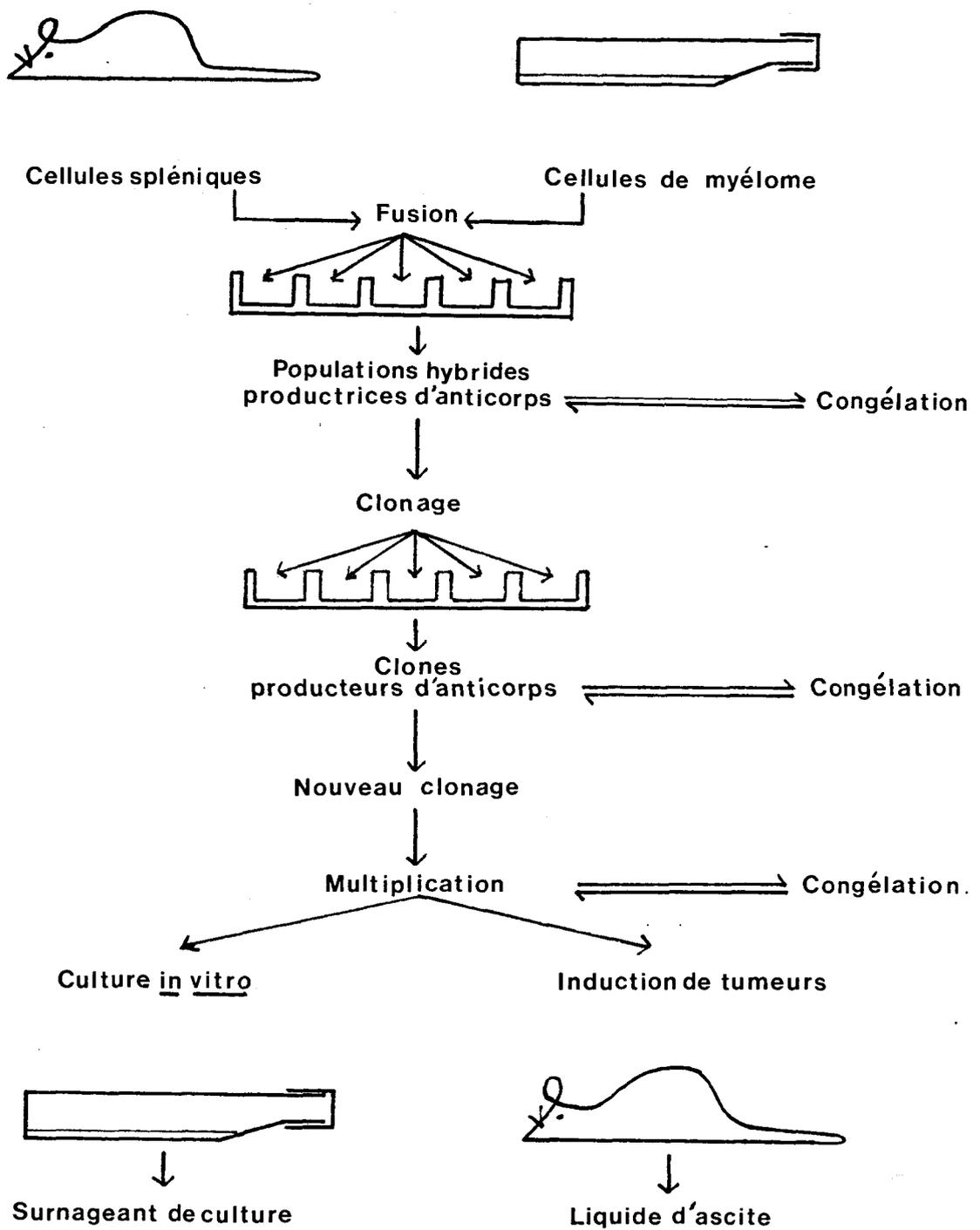


FIGURE 2 : Production des anticorps monoclonaux.



Anticorps monoclonaux	SRIA	IFI		Immunodiffusion Ig classe
		coupes de vers adultes	microfilaire	
AA ₁ -29	+	-	+	
AA ₁ -35	+	-	-	G
AA ₁ -72	+	+	+	M, G
AA ₂ -58	+	-	+	G
AA ₃ -5	+	+	-	G
AA ₃ -43	+	+	+	M
AA ₃ -44	+	+	+	M
AA ₃ -80	+	+	-	G
AA ₃ -89	+	+	-	N.D.
AA ₃ -96	+	+	-	N.D.
AA ₄ -50	+	-	+	N.D.
AA ₄ -70	+	-	+	M

SRIA = Technique radioimmunologique en phase solide

IFI = Immunofluorescence indirecte

TABLEAU I

Réactivité des différents anticorps monoclonaux anti-B. malayi vis-à-vis
des adultes et des microfilaires de B. malayi

macrophages and recognizes surface antigen(s). A. Aggarwal, W. Cuna, A. Haque, C. Dissous et A. Capron, 1984 -Immunology, soumis à publication).

4.1.2. Activité biologique *in vitro* des anticorps monoclonaux

Nous avons étudié l'activité biologique des anticorps monoclonaux vis-à-vis de la microfilaire de B. malayi par un test de cytotoxicité en présence de cellules adhérentes et de complément.

Les cellules péritoneales de souris saines, adhérant au plastique, ont été incubées pendant 5 - 7 heures en présence de l'anticorps monoclonal de type IgM, désigné AA₃-44. Des microfilaires de B. malayi, obtenues à partir du sang de Mastomys natalensis infectés, sont ajoutées à la culture. Après 24 h d'incubation, environ 40 % des microfilaires sont mortes et recouvertes de cellules. Le pourcentage de mortalité a été augmenté à 80 % quand du sérum frais de souris a été ajouté dans le système de culture. Par contre, seulement 12 % de mortalité sont observés quand les microfilaires sont incubées en présence de cellules et de milieu de culture et environ 22 % de microfilaires sont mortes quand il est additionné du sérum frais de souris saine. De plus, aucune mortalité significative n'est observée en présence de surnageant de culture de cellules SP 2/0 ou de sérum de souris saine inactivé (Aggarwal et al., 1984).

4.1.3. Protection passive *in vivo* des anticorps monoclonaux

La persistance de la microfilaire de B. malayi dans la circulation sanguine de souris, ayant subi une injection intraveineuse

de larves L₁, est apparu comme un bon modèle pour tester l'efficacité des anticorps monoclonaux vis-à-vis de la microfilaire. Environ 100.000 microfilaires de B. malayi ont été injectées par voie intraveineuse chez chaque souris. Bien que le nombre de microfilaires dans la circulation sanguine des souris soit variable, l'évolution de la microfilarémie est bien déterminée.

Les résultats obtenus de trois expériences montrent qu'environ 70 % des animaux sont résistants à la microfilaire de B. malayi quand ces animaux ont été immunisés par voie passive avec l'anticorps monoclonal de type IgM. Dans les autres animaux, bien que la microfilarémie ne soit pas disparue complètement, une réduction importante du nombre de microfilaires est observée. Par contre chez les souris non traitées, injectées soit avec un surnageant n'ayant pas une activité anti-B. malayi, soit avec du liquide d'ascite induite par des clones cellulaires produisant des IgM contre des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii, aucune réduction significative de la microfilarémie n'est observée.

4.1.4. Identification des antigènes de surface reconnus par l'anticorps monoclonal AA₃-44 de type IgM

Les antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux ont été identifiés par immunoprécipitation des antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi, suivie d'une analyse en gel de polyacrylamide.

Nous avons utilisé des microfilaires marquées en surface par le réactif de Bolton-Hunter (voir paragraphe 3.10.1.). Cette méthode de conjugaison est relativement douce et a été spécialement développée pour

éviter les problèmes de dénaturation des molécules lors de l'exposition à des agents réducteurs ou oxydants, comme la chloramine T par exemple (Langone, 1980). L'iodation se fait au niveau des groupements NH_2 terminaux et préférentiellement sur les groupements NH_2 des résidus lysine.

Le profil autoradiographique des antigènes de surface des microfilaires iodés par le réactif de Bolton-Hunter, puis solubilisés par un détergent ionique comme le désoxycholate de sodium, montre après analyse en gel de polyacrylamide-SDS (10 %), 4 molécules majeures avec un poids moléculaire apparent de 110 Kd, 66 Kd, 35 Kd et 20 Kd, ainsi qu'un nombre important de bandes moins intenses (Figure 3, piste surf).

Nous pouvons observer sur la figure 3, que les anticorps monoclonaux AA₃-44 (piste 4) ainsi qu'un sérum de souris injectée depuis 21 jours par des microfilaires de B. malayi (piste 2) et un sérum de souris ayant reçu de larves infestantes L₃ de B. malayi depuis 19 jours en sous-cutané (piste 3), reconnaissent la molécule de 110 Kd, une des 4 protéines majeures marquées à la surface des microfilaires. Des autres antigènes de poids moléculaires apparents de 36 et 67 Kd sont aussi reconnus par le sérum de souris injectée par des microfilaires de B. malayi (piste 2). La molécule 110 Kd n'est pas précipitée par un sérum de souris saine (piste 1), les anticorps monoclonaux anti-S. mansoni (piste 6) ou anti-T. gondii (piste 5).

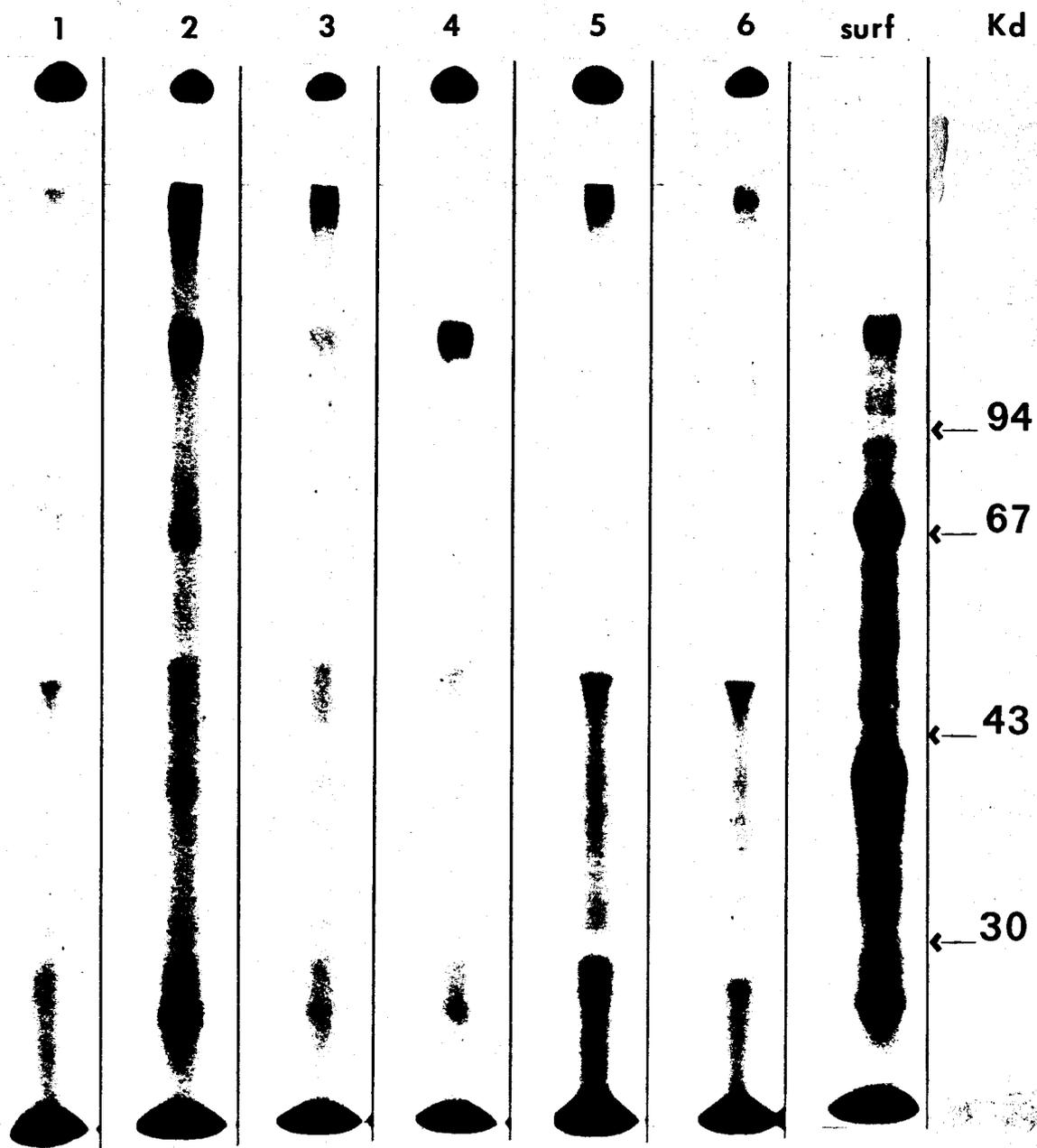


FIGURE 3



4.1.5. Discussion

Dans cette étude, les résultats du test de cytotoxicité in vitro montrent que l'anticorps monoclonal de type IgM, provoque l'adhérence des macrophages de souris saines et la destruction de la microfilaire de B. malayi. Le pourcentage d'adhérence et de destruction de la microfilaire est augmenté quand un sérum frais de souris saine est ajouté au système de culture. Ceci suggère l'intervention du complément dans cette réaction.

Les anticorps monoclonaux n'ont pas provoqué d'adhérence ou de mortalité significative vis-à-vis de la larve infestante L₃ de B. malayi ou de la microfilaire de D. viteae, ce qui indiquerait le caractère de spécificité de stade et d'espèce de la cytotoxicité induite par l'anticorps monoclonal.

Les résultats de cette étude, montrent clairement que ces anticorps monoclonaux peuvent aussi conférer une résistance chez la souris infectée, par transfert passif.

Les larves infestantes L₃ de B. malayi ne se développent pas en vers adultes chez la souris; environ 10 % des larves infestantes se transforment seulement en larve L₄. Le fait d'obtenir des anticorps monoclonaux reconnaissant la surface de la microfilaire, alors que les souris ayant servi à l'hybridation cellulaire ont été immunisées avec des larves infestantes L₃ et non des microfilaires suggère: -soit que la surface de la larve infestante L₃ possède des composants antigéniques ayant des épitopes communs avec la microfilaire, -soit que les produits de lyse de la larve L₃ démasquent des antigènes ayant des épitopes communs avec la microfilaire. Néanmoins, ces deux der-

nières possibilités restent des hypothèses. La spécificité de stade de l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal (110 Kd), n'a pas pu être vérifiée à la surface de la larve infestante L₃ en raison de l'impossibilité actuelle d'obtenir ce matériel en quantité suffisante.

En conclusion, ces expériences suggèrent que l'antigène de 110 Kd pourrait représenter au niveau de la surface de la microfilaire de B. malayi la cible des mécanismes effecteurs spécifiques chez la souris. D'autre part si nous considérons le pouvoir protecteur des anticorps monoclonaux AA₃-44 il faut admettre le rôle potentiel de l'antigène de 110 Kd dans le développement de l'immunité vis-à-vis de la microfilaire de B. malayi.

4.2. Analyses sur la spécificité d'espèce de l'antigène 110 Kd

4.2.1. Reconnaissance de l'antigène de 110 Kd par des sérums des malades infectés par différentes filaires

La présence d'anticorps dirigés contre la molécule de 110 Kd a été recherchée dans le sérum des individus vivants en zones endémiques pour B. malayi. Parallèlement à cette étude, nous avons utilisé le sérum des individus infectés par d'autres filaires (O. volvulus - L. loa).

- Origine des sérums étudiés

Le tableau II résume les différentes caractéristiques parasi-

TABLEAU II

Caractéristiques parasitologiques et immunologiques des sérums
humains utilisés dans notre étude

Age	Infectés par	Origine	Nombre de patients	Microfilarémie	RIPEGA	IEP	ELISA	Traitement	Autres Infections
20 - 45	<u>B. malayi</u>	Indonésie-Malaisie	5	60-90/10 μ l sang	+	NR	NR	NT	?
20 - 45	"	"	5	60-90/10 μ l sang	+	NR	NR	DEC(1)	?
20 - 45	"	"	5	0	-	NR	+	NT	?
20 - 45	"	"	5	0	-	NR	+	DEC(1)	?
20 - 45	<u>O. volvulus</u>	Afrique	5	+	+	NR			?
20 - 45	<u>L. loa</u>	"	5	14-30/10 μ l sang	NR	NR	+		-
20 - 45	"	"	5	0	NR	NR	+		-
20 - 45	<u>D. medinensis</u>	"	3	*	NR	NR	NR		-
20 - 45	<u>A. lumbricoïdes</u>	Europe	3		NR	+			-
20 - 45	<u>S. mansoni</u>	Amérique du Sud	5		NR	+			?

NR = Non réalisé
NT = Non traités
* = Détection de vers adultes
- = Négative
+ = Positive

(1) = Traitement par DEC (diéthylcarbazine) pendant 24 h



tologiques et immunologiques des divers sérums humains utilisés dans cette étude.

Les sérums de patients infectés par B. malayi proviennent d'une zone endémique pour ce parasite en Indonésie et Malaisie. Pour un premier groupe de patients, la preuve parasitologique a été apportée par la mise en évidence de microfilaires sanguicoles caractérisées comme B. malayi. Pour un autre groupe de patients la preuve parasitologique a été apportée par une étude sérologique avec le test d'ELISA (Enzyme Linked Immunsorbent Assay).

Les sérums de patients infectés par O. volvulus et par L. loa proviennent de zones endémiques d'Afrique.

Résultats

La figure 4 montre les résultats de l'analyse en gel de polyacrylamide homogène de 13 %, des antigènes de surface des microfilaires de B. malayi reconnus par les sérums de malades mentionnés auparavant. Parmi les antigènes de surface précipités par les sérums de patients, nous observons la présence du composant de 110 Kd. Cet antigène est reconnu par les anticorps présents dans le sérum de malades infectés par B. malayi, microfilarémiques (pistes 2, 3) et amicrofilarémiques (pistes 4, 5), des malades infectés par O. volvulus (piste 6) ainsi que des malades infectés par L. loa, microfilarémiques (piste 7) et amicrofilarémiques (piste 8).

Un nombre important de bandes (entre 6 - 7) est reconnu par les différents sérums de malades dans la zone comprise entre 14 et 50 Kd.

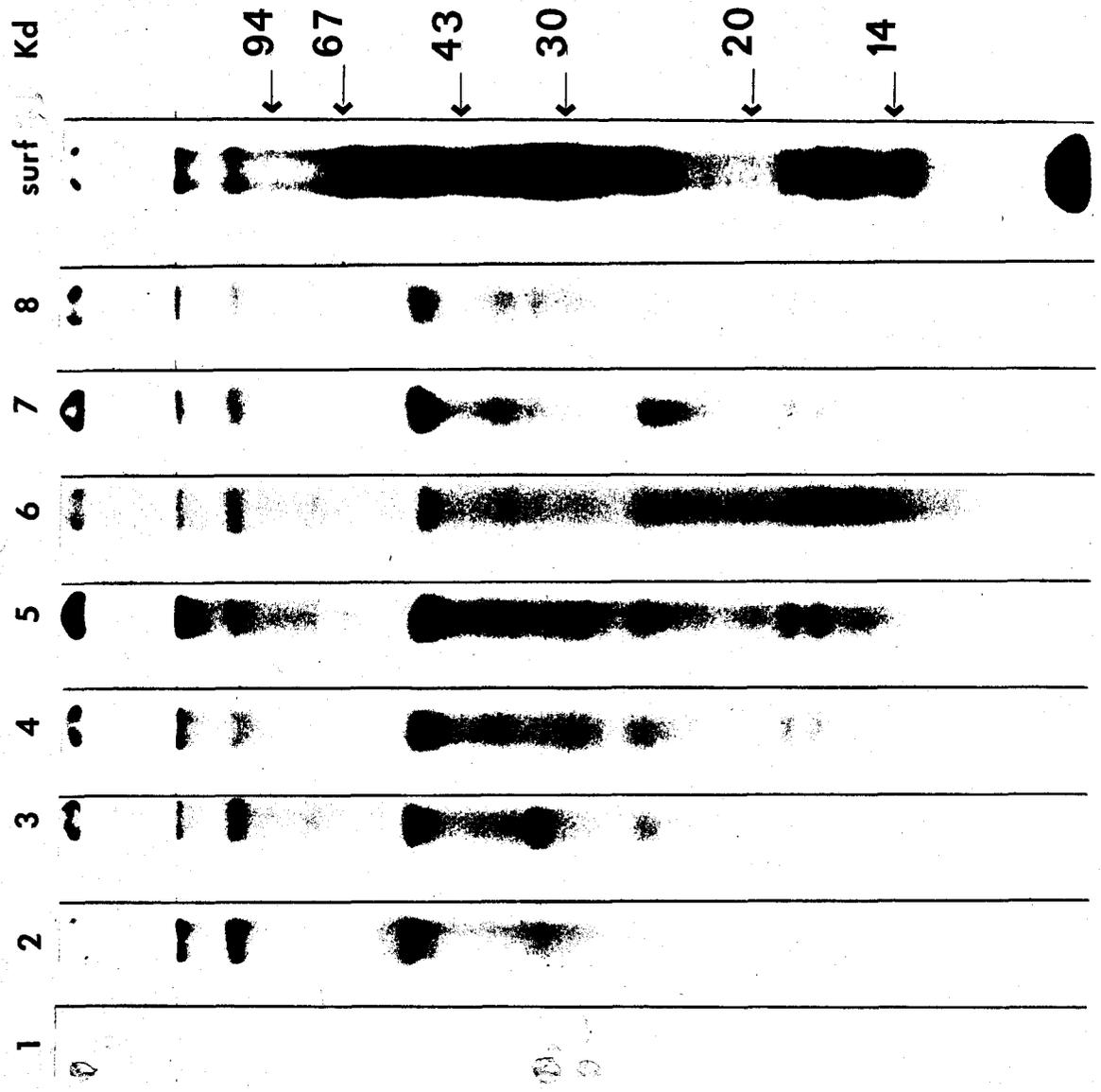


FIGURE 4

Discussion

Tous les sérums d'humains infectés que nous avons testés, contiennent des anticorps capables de reconnaître l'antigène de 110 Kd, ceci suggère donc l'existence d'antigènes communs entre la microfilaire de B. malayi et les filaires O. volvulus et L. loa ou au moins des épitopes similaires entre ces filaires.

Plusieurs auteurs ont observé par des études d'immunofluorescence, dans les infections humaines et dans la filariose animale, l'existence d'une association entre l'apparition des anticorps contre la microfilaire et la disparition de la microfilarémie (Wong et Guest, 1969; Ponnudurai et al., 1974; Weiss, 1978; Grove et Davis, 1978; Wong et Suter, 1979; Piessens et al., 1980; Mc Greevy et al., 1980). Par contre nos résultats montrent que les sérums des individus microfilarémiques contiennent des anticorps dirigés contre des antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi (110 Kd). Des résultats semblables ont été observés par Maizels et al., (1983) sur des patients infectés par Brugia timori en utilisant aussi la technique d'immunoprécipitation. Ces auteurs ont constaté que des anticorps dirigés contre la surface de la microfilaire de B. timori sont présents dans le sérum d'individus microfilarémiques.

En conclusion l'antigène de 110 Kd ne serait pas spécifique d'espèce. Néanmoins, pour conclure définitivement, il serait nécessaire d'utiliser un plus grand nombre de sérums de malades filariens parfaitement caractérisés et provenant de zones endémiques. D'autre part, la détection de l'antigène de 110 Kd par des anticorps ne pourrait pas être utilisée comme un marqueur de l'infection permettant de faire la

distinction entre phase patente (avec microfilarémie) et phase latente (disparition de la microfilarémie).

4.2.2. Reconnaissance de l'antigène 110 Kd par les sérums des malades infectés par différents helminthes

Etant donné que cet antigène est commun à différentes espèces filariennes nous avons cherché à savoir si l'antigène de 110 Kd pourrait être reconnu aussi par les anticorps présents dans les sérums de malades infectés par d'autres helminthes, en l'occurrence Dracunculus medinensis, Ascaris lumbricoides et Schistosoma mansoni (Tableau II).

Résultats

Les résultats obtenus (figure 5) après analyse en gel de polyacrylamide homogène de 13 % montrent que les anticorps présents dans le sérum des malades infectés par A. lumbricoides (piste 2) et D. medinensis (piste 3) précipitent l'antigène de 110 Kd présent à la surface de la microfilaire de B. malayi. Par contre les anticorps contenus dans le sérum des malades infectés par S. mansoni ne reconnaissent pas cet antigène (piste 4). Le sérum des malades infectés par D. medinensis, reconnaissent aussi un antigène ayant un poids moléculaire apparent de 33 Kd (piste 3).

Discussion

Ces résultats indiquent une parenté antigénique entre la surface de la microfilaire de B. malayi et les nématodes A. lumbricoides et D. medinensis. Cette parenté peut porter sur la molécule entière de 110 Kd ou au moins sur un épitope de cette molécule reconnu par l'anti-

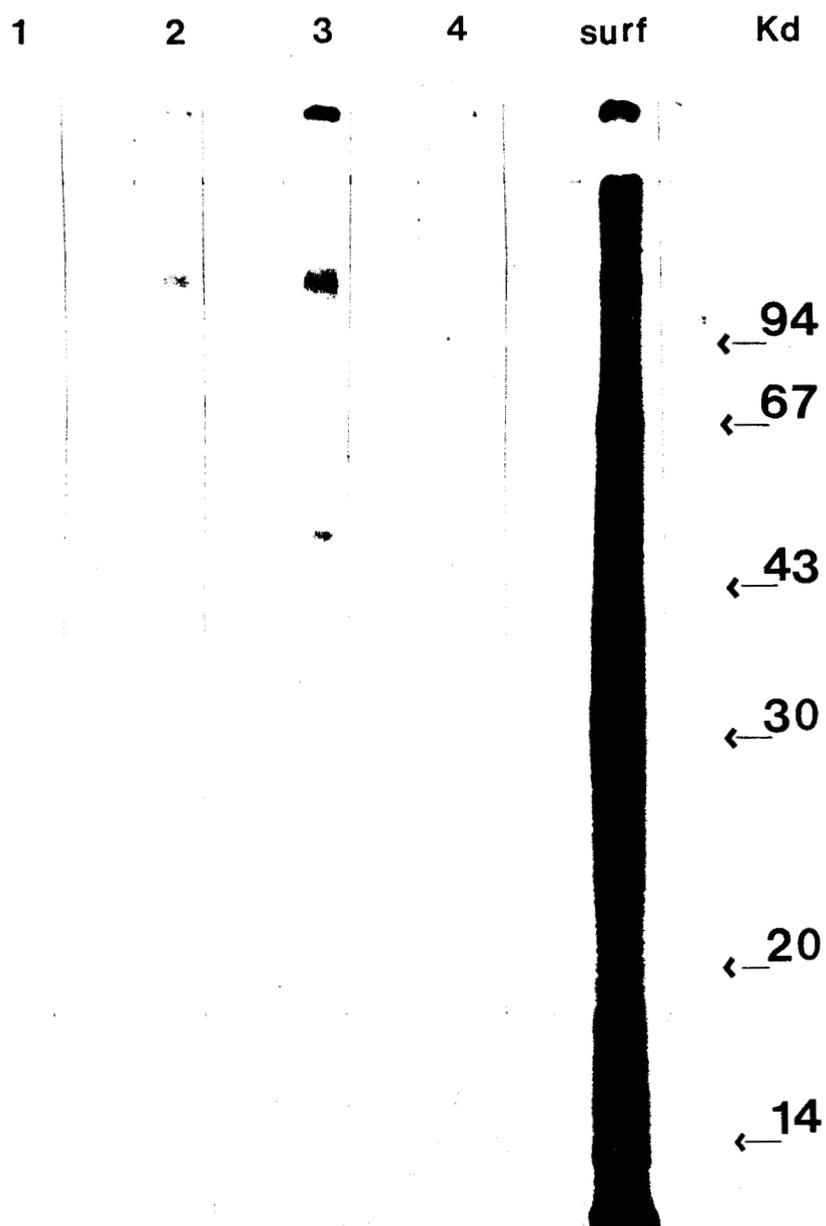


FIGURE 5

corps monoclonal AA₃-44.

En conclusion, ces résultats suggèrent que cet antigène n'est pas spécifique d'espèce mais serait plutôt spécifique de la classe des nématodes.

4.3. Analyses sur la spécificité de stade évolutif de

l'antigène 110 Kd

4.3.1. Immunoprécipitation des antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi par les sérums de souris d'infection expérimentale

Les sérums de souris infectées par des larves L₃ et des microfilaires de D. viteae ainsi que les sérums de souris, ayant reçu des vers adultes de D. viteae ou B. malayi en sous-cutané, ont été utilisés afin d'identifier les antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi reconnus par ces sérums. Nous avons inclus dans notre expérience l'anticorps monoclonal AA₃-44 qui reconnaît l'antigène de 110 Kd et un liquide d'ascite sans réactivité anti-B. malayi.

Résultats

Les résultats présentés dans la figure 6 montrent que les sérums de souris infectées par des larves L₃ et des microfilaires de D. viteae (pistes 2, 3) ainsi que ceux des souris ayant reçu des vers adultes de D. viteae (piste 4) ou de B. malayi (piste 5) reconnaissent la molécule de 110 Kd. La piste 6 correspond à l'anticorps monoclonal AA₃-44; les pistes 1 et 7 représentent respectivement un sérum de souris saine et un liquide d'ascite sans activité anti-B. malayi

Il faut noter la présence de bandes dans la zone de 35 et 67 Kd

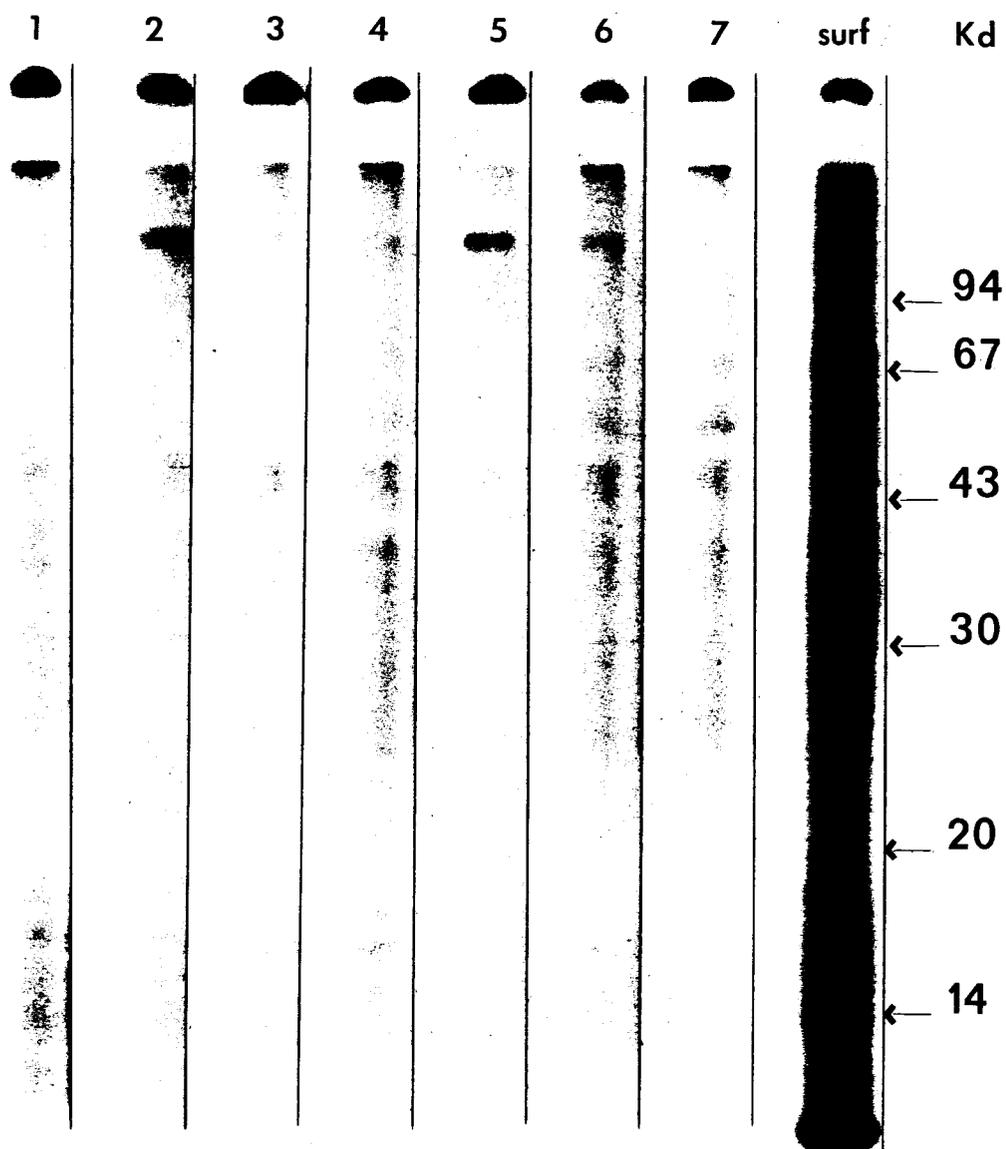


FIGURE 6

et de 14 et 20 Kd qui apparaissent avec une intensité plus au moins faible selon les différents sérums. La spécificité de reconnaissance de ces antigènes peut être mise en doute puisqu'elles sont également précipitées par le sérum de souris saine (piste 1) et le liquide d'ascite sans activité anti-B. malayi (piste 7).

Discussion

Etant donné que la souris élimine les larves L₃ de D. viteae et B. malayi avant qu'elles ne deviennent des vers adultes, que les microfilaires injectées en intraveineuse ainsi que les vers adultes transférés en sous-cutané sont aussi éliminés, nous avons donc essayé d'étudier la spécificité de stade de la molécule de 110 Kd par ces modèles d'infection.

Nous avons vu auparavant (figure 3) que les sérums de souris injectées par des larves L₃ et des microfilaires de B. malayi, reconnaissent la molécule de 110 Kd. Les résultats présents montrent que tous les sérums des souris utilisés reconnaissent la molécule de 110 Kd et semblent donc indiquer que cet antigène ne serait pas spécifique de stade. D'autre part, les sérums de souris infectées par différents stades évolutifs de D. viteae reconnaissent l'antigène de 110 Kd de B. malayi; ceci confirme les résultats précédents (figure 4) montrant la non spécificité d'espèce de cet antigène de surface.

Ces données, obtenues indirectement à l'aide de sérums de souris ayant reçu différents stades évolutifs soit de D. viteae soit de B. malayi, méritent d'être confirmées par l'utilisation de l'anticorps monoclonal

reconnaissant la molécule 110 Kd. En effet l'injection à des souris de larves L₃ ou de microfilaires de D. viteae et B. malayi entraînent leur destruction ce qui pourrait, lors de la lyse parasitaire, démasquer des antigènes somatiques, réputés être responsables des réactions croisées fréquemment observées. D'autre part lors du transfert de vers adultes de D. viteae, on observe rapidement l'apparition de microfilaires, donc l'analyse des anticorps produits par ces souris ne reflète pas uniquement un seul stade évolutif.

4.3.2. Utilisation de l'anticorps monoclonal AA₃-44

En raison de l'argumentation précédente nous avons alors étudié par immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps monoclonal AA₃-44, la spécificité de stade de la molécule de 110 Kd directement au niveau des antigènes de surface de la microfilaire et de l'adulte de D. viteae ainsi que sur la surface de l'adulte de B. malayi. L'analyse des composants de surface des larves L₃ de D. viteae et B. malayi n'a pas été possible en raison de la quantité limitée de ce matériel parasitaire récoltée actuellement.

Les résultats obtenus montrent que l'anticorps monoclonal AA₃-44 reconnaît des antigènes de surface sur la microfilaire de D. viteae (figure 7 piste 5) et sur l'adulte de B. malayi (figure 8 piste 5). Par contre cet anticorps monoclonal ne précipite pas de molécule de surface au niveau de l'adulte de D. viteae (figure 9 piste 5). Bien que l'anticorps monoclonal reconnaisse de bandes de poids moléculaires comprises entre 22 et 113 Kd, le fait qu'elles soient visualisées aussi au niveau du sérum normal (piste 1) et du liquide d'ascite sans activité anti-B. malayi (piste 6) démontre leur non spécificité.

Sur la surface de l'adulte de B. malayi (figure 8) nous obser-

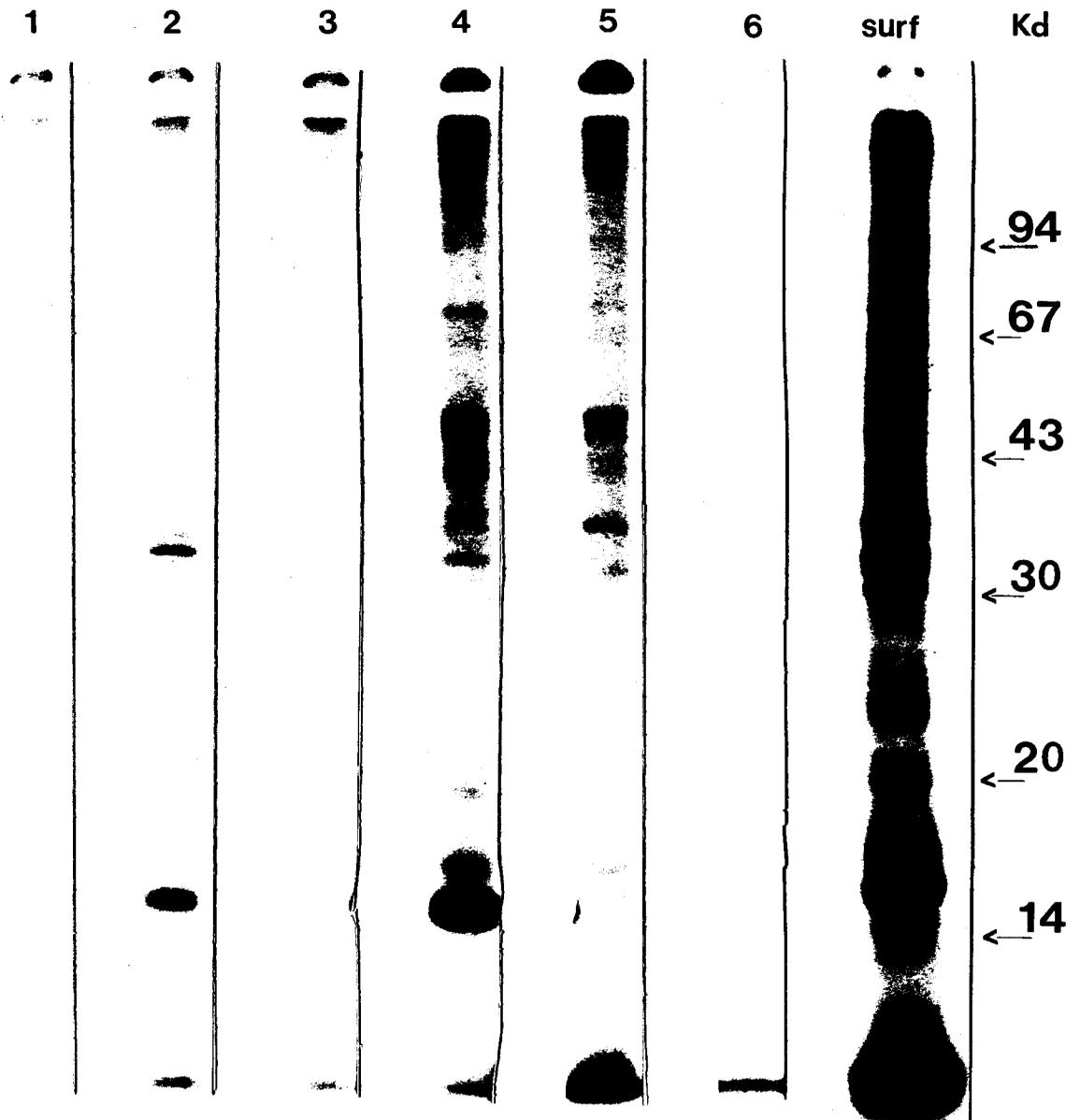


FIGURE 7

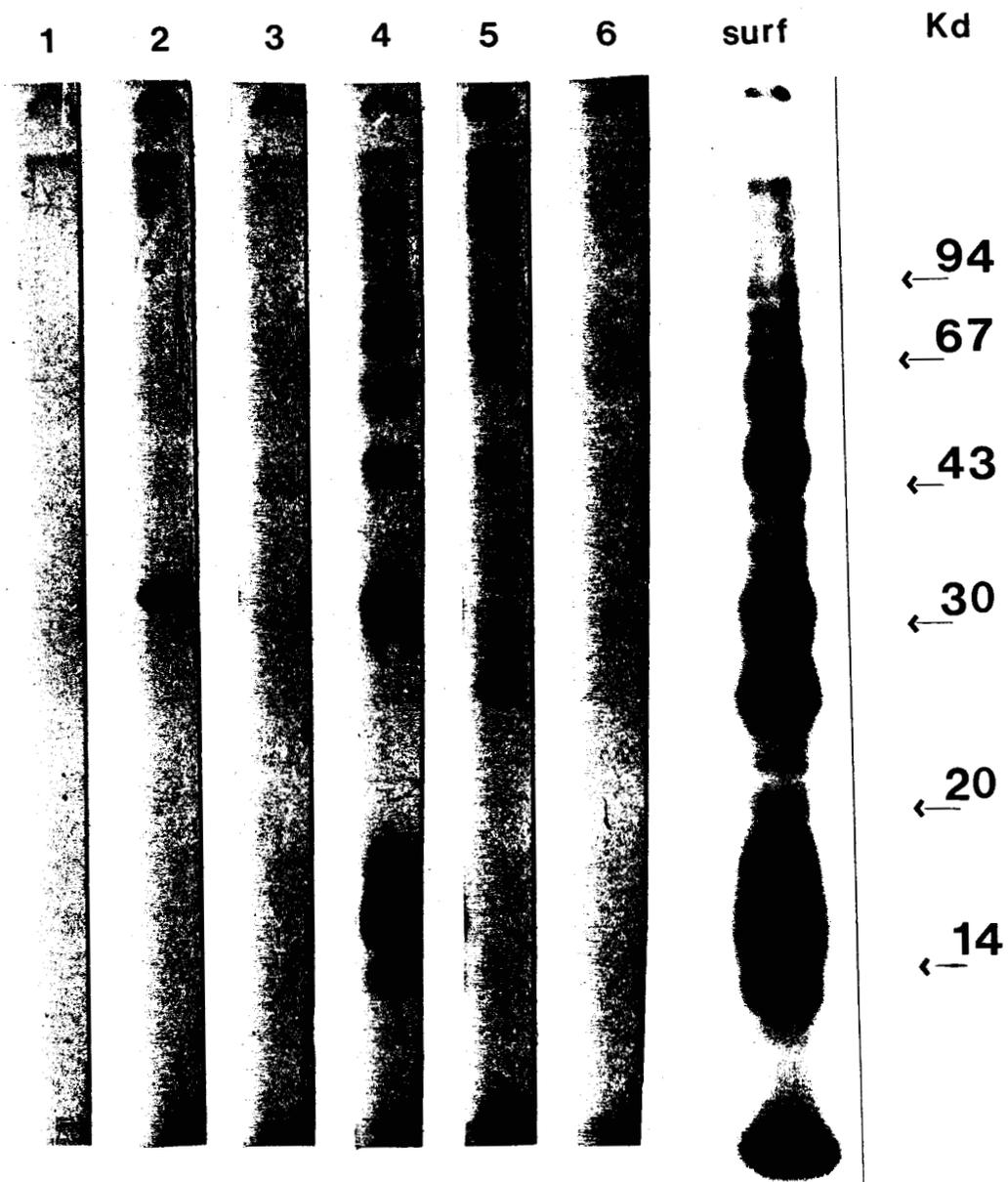


FIGURE 8

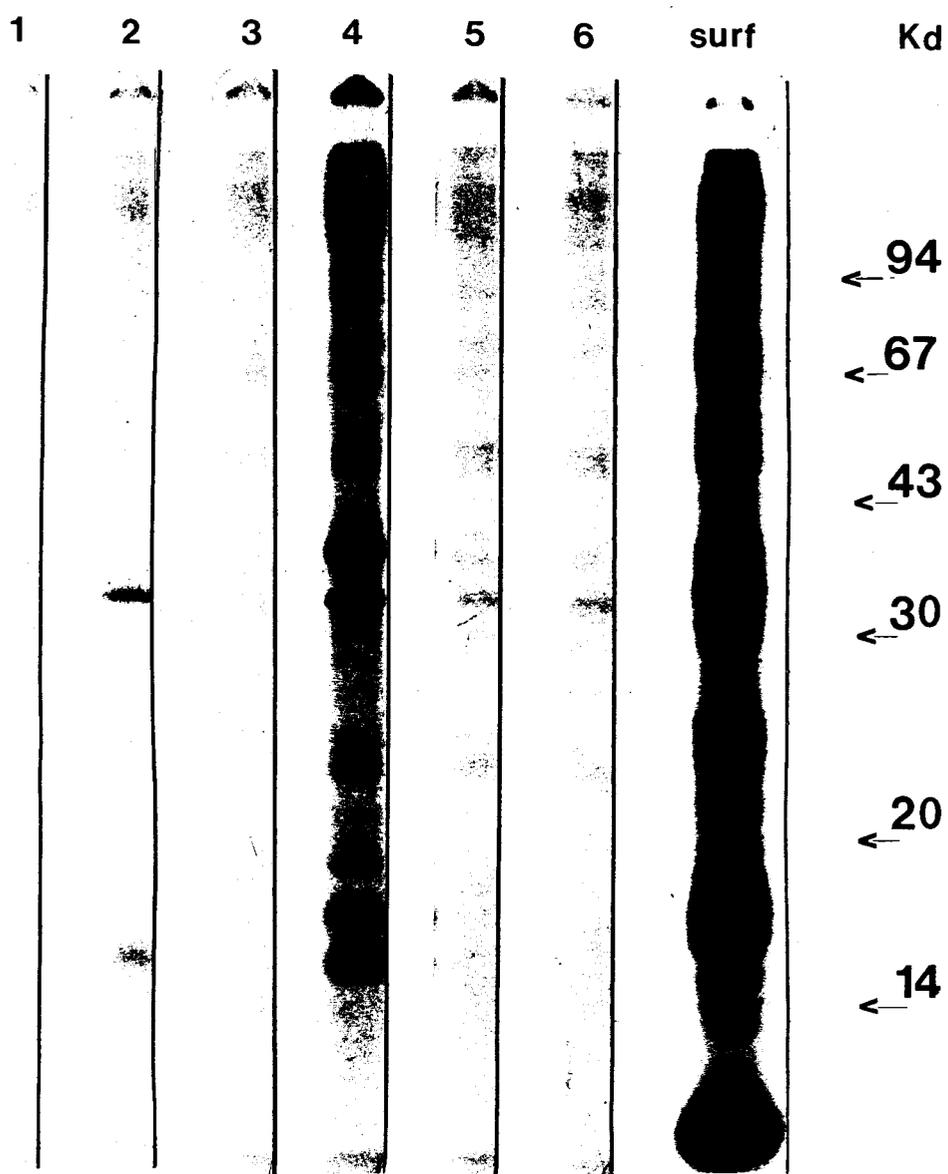


FIGURE 9

vons différentes bandes comprises dans la gamme de 26 et 113 Kd (piste 5) et sur la surface de la microfilaire de D. viteae. Ainsi, plusieurs molécules sont identifiées par l'anticorps monoclonal (piste 5), une d'entre elles ayant un poids moléculaire apparent de 110 Kd.

Dans ces mêmes figures (7, 8, 9,), nous pouvons observer que les sérums de souris ayant reçu des vers adultes (pistes 4) reconnaissent plusieurs molécules de surface sur les différents parasites (D. viteae et B. malayi). De même, les pistes 2 montrent les antigènes identifiés à l'aide de sérums de souris injectée avec des microfilaires. Certains de ces antigènes sont aussi reconnus par l'anticorps monoclonal. Par contre, les sérums de souris injectées avec des larves L₃ (pistes 3), ne semblent pas reconnaître de structures de surface.

En conclusion, les résultats de ces études suggèrent que la molécule de 110 Kd pourrait être commune aux stades microfilaires. Néanmoins, ceci devrait être vérifié par l'analyse des composants de surface de microfilaires d'espèces différentes, à l'aide de l'anticorps monoclonal.

4.4. Immunoprécipitation des antigènes de surface de la microfilaire de B. malayi, par les sérums des souris Balb/C "nude " et "nu⁺"

L'utilisation de souris "nude " (dépourvues de thymus) permet l'étude du rôle des lymphocytes T dans la réponse immune contre des parasites. Ainsi les travaux de Suswillo et al., (1980) et ceux de Vincent et al., (1982) en utilisant des souris "nude ", suggèrent que la réponse immune, qui confère une résistance à l'infection par B. pahangi, est dépendante du thymus.

Des larves infestantes de B. malayi, injectées en sous-cutané à des souris Balb/C "nu⁺", ne se développent pas; par contre les souris "nude " permettent le développement de ce parasite en vers adultes, lesquels produisent des microfilaires pouvant être observées dans la circulation (Haque, résultats non publiés).

Nous avons analysé vis-à-vis des antigènes de surface de la microfilare de B. malayi, les sérums des souris Balb/C "nude " et "nu⁺", ayant reçu des larves L₃ de B. malayi à différentes dates après l'infection.

Résultats

Les résultats de notre étude sont présentés dans la figure 10 , on observe que les sérums des souris "nu⁺" aux jours 15, 32 et 120 (respectivement pistes 5, 6, 7) reconnaissent l'antigène de 110 Kd présent à la surface de la microfilare de B. malayi. Par contre les sérums de souris "nude " aux mêmes jours d'infection (pistes 2, 3, 4) ne reconnaissent pas cet antigène. Nous avons choisi ces différentes dates après l'infection pour les raisons suivantes: le 15ème jour correspond approximativement à l'apparition des larves L₄, au jour 32 les larves L₄ se sont déjà transformées en larves L₅ et au 120ème jour on observe la présence à la fois d'adultes matures et de microfilaires sanguicoles. Ainsi, en suivant cette cinétique de l'infection, ceci nous a permis d'analyser des éventuels anticorps dirigés contre les différents stades du parasite dans le sérum de souris "nude ".

Nous observons aussi des bandes dans la zone de 50 Kd dans le sérum de souris "nude " et "nu⁺", ainsi que deux bandes entre 14 et 20 Kd dans les sérums de souris "nu⁺".

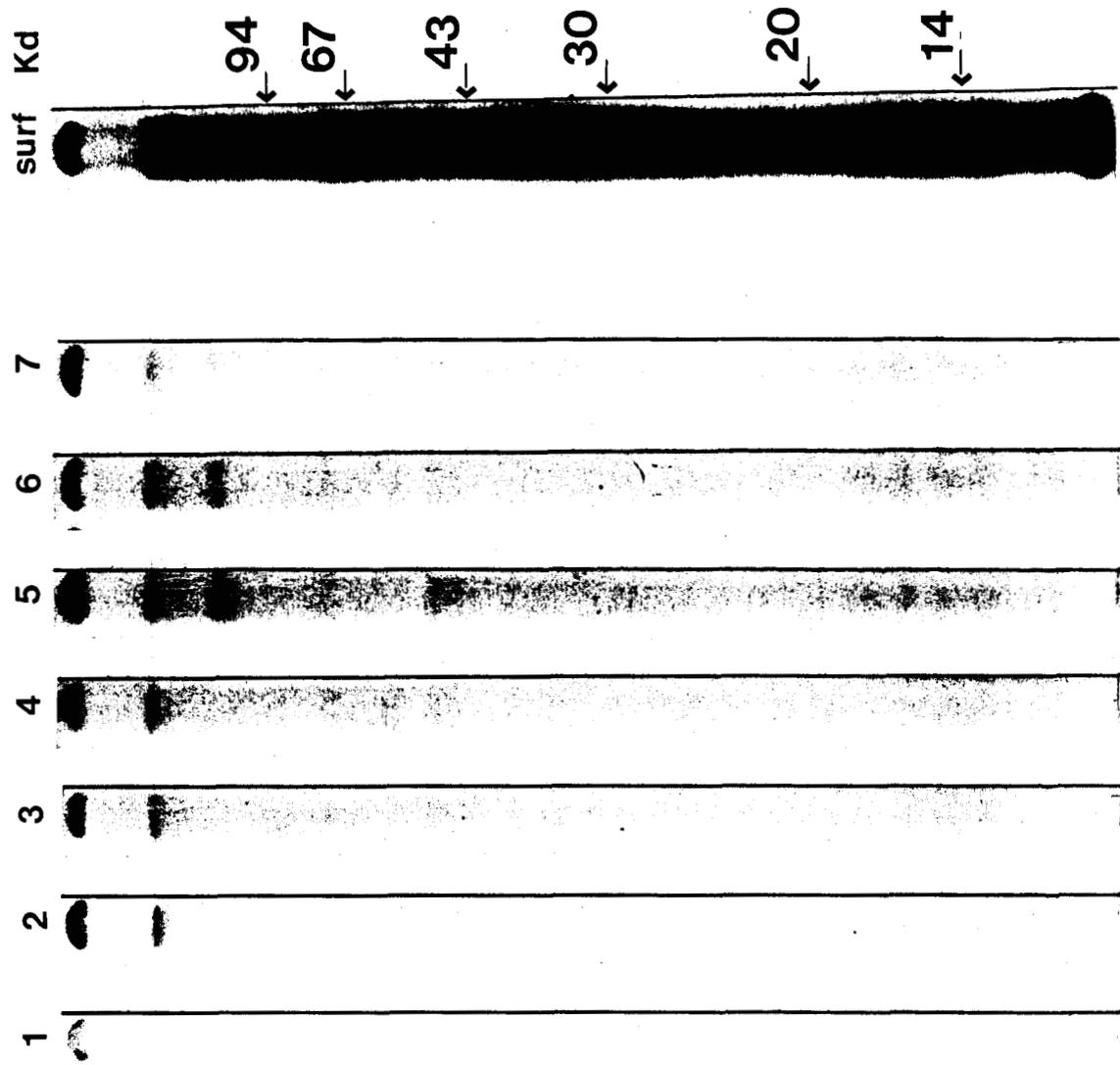


FIGURE 10

Discussion

Il est maintenant reconnu que certains lymphocytes T sont nécessaires à la production d'une grande partie des anticorps dans la réponse immune. Ainsi dans le domaine de l'immunologie certaines études in vitro (Kina et al., 1982; Rosenkoetter et al., 1984; Cahtleen et Waldmann, 1984) et d'autres travaux, utilisant des souris dépourvues de thymus (Davie et Paul, 1974, Braun et al., 1972), ont démontré la participation d'une certaine population des lymphocytes T (helper) dans la production d'immunoglobulines. Egalement, dans notre travail, nous pouvons observer que les sérums des souris "nude" ne contiennent pas d'anticorps dirigés contre l'antigène de 110 Kd. D'autre part nos résultats sont en corrélation avec les travaux de Suswillo et al., (1980, 1981) qui montrent que les souris deviennent susceptibles aux larves L₃ de B. pahangi quand elles sont dépourvues de thymus.

En conclusion nos résultats montrent que la production d'anticorps dirigés contre l'antigène de 110 Kd chez les souris Balb/C est dépendante des cellules T.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'importance de la surface des nématodes dans la réponse immunitaire de l'hôte a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Kazura et Grove, 1978; Mackenzie et al., 1978; Subrahmanyam et al., 1978; Haque et al., 1980). Les techniques actuelles de marquage à l'iode permettent l'analyse des antigènes de surface impliqués dans l'interaction hôte-parasite. Ainsi cette analyse sélective des composants de surface a permis d'observer que seulement un nombre limité d'antigènes sont marqués à la surface des nématodes (Maizels, 1982; Philipp et al., 1981a). Un exemple extrême a été observé dans le cas de la filaire Litomosoides carinii où seulement un composant majeur de 55 Kd est présent à la surface de l'adulte et de la larve L₃ de ce parasite (Philipp et al., 1984). Ce répertoire antigénique limité implique que ces antigènes peuvent être caractérisés et analysés pour leur immunogénicité.

Les sérums de patients et d'animaux infectés présentent fréquemment des réactions croisées avec différentes espèces filariennes ou d'autres nématodes. Donc, l'utilisation d'anticorps monoclonaux nous a semblé l'approche la plus appropriée pour l'étude des antigènes de surface. L'utilisation de l'anticorps monoclonal AA₃-44 de type IgM, nous a permis d'identifier à la surface de la microfilarie de B. malayi une molécule de 110 Kd, un des antigènes majeurs présents à la surface de la microfilarie. Les propriétés biologiques de cet anticorps monoclonal, laisseraient supposer que l'antigène de 110 Kd pourrait être impliqué dans l'immunité contre la microfilarie chez l'homme. Les résultats obtenus montrent son pouvoir immunogène puisqu'il est reconnu par les

anticorps présents dans l'infection naturelle par B. malayi. Cependant, ces anticorps n'ont pas mis en évidence un état d'immunité contre la microfilaire, en effet ils sont présents dans le sérum d'individus microfilarémiques. Nos résultats sont en corrélation avec les travaux de Grove et Davis, (1978) chez des patients infectés par W. bancrofti et ceux de Maizels et al., (1983) chez des malades infectés par B. timori, qui observent la présence d'anticorps dirigés contre la microfilaire dans le sérum d'individus microfilarémiques.

Dans le domaine de la filariose, plusieurs travaux montrent une similitude antigénique entre les différentes espèces filariennes et d'autres nématodes. Ainsi Forsyth et al., (1981) observent que les antigènes iodés à la surface de la microfilaire d'O. gibsoni, sont reconnus aussi par les anticorps du sérum de patients infectés par O. volvulus, W. bancrofti et S. japonicum. Canlas et Piessens, (1984), observent par l'utilisation de différents anticorps monoclonaux, des antigènes communs à B. malayi, D. immitis, T. spiralis et S. mansoni. D'une manière comparable, les analyses effectuées sur la surface de la microfilaire de B. malayi, à l'aide du sérum d'infection humaine et les sérums de souris infectées par D. viteae, montrent que l'antigène de 110 Kd n'est pas spécifique d'espèce mais qu'il serait spécifique de la classe des nématodes. Par contre l'identification par l'anticorps monoclonal AA₃-44 d'une molécule ayant un poids moléculaire apparent de 110 Kd à la surface de la microfilaire de D. viteae, suggère la possibilité

que cette molécule soit spécifique du stade microfilaire. Cette hypothèse doit être vérifiée par l'analyse des composants de surface des microfilaires d'espèces différentes.

D'autre part, comme d'autres auteurs (Maizels et al., 1982), nous avons remarqué l'existence de réactions croisées entre des antigènes de surface ayant des poids moléculaires différents. En effet, l'anticorps monoclonal reconnaît sur la surface de la microfilaire de D. viteae et l'adulte de B. malayi des antigènes de poids moléculaires différents, montrant en conséquence l'existence d'un même épitope sur ces antigènes.

Malgré ces réactions croisées, ceci n'exclue pas la possibilité de trouver des antigènes spécifiques d'espèce et de stade. D'ailleurs différents travaux indiquent la présence d'antigènes spécifiques de stade : Ponnudurai et al., (1974) par des études en fluorescence ont observé des antigènes spécifiques de stade microfilaire ou adulte de B. pahangi; de même Weiss et Tanner (1981) par la même technique observent des antigènes spécifiques de chacun des trois stades de D. viteae. Canlas et Piessens (1984) par l'utilisation des anticorps monoclonaux identifient des antigènes spécifiques de stade de B. malayi. Donc ces arguments laissent penser que l'analyse sélective des antigènes de surface à l'aide des anticorps monoclonaux doit permettre l'identification des molécules spécifiques des différentes espèces filariennes. D'autre part, il faut considérer que la technique de marquage utilisée pour notre étude a été orientée vers la mise en évidence des structures protéiques et préférentiellement celles possédant des résidus lysine. Ainsi, des autres composants antigéniques tel que des polysaccharides ou des glycolipides et même des protéines

dépourvues de résidus NH_2 libres, ne seront pas mis en évidence.

Enfin, nous nous sommes intéressés au rôle des lymphocytes T dans la réponse immune chez la souris vis-à-vis de l'antigène de 110 Kd. Ainsi la possibilité d'utiliser des souris Balb/C "nude" offre un bon modèle expérimental pour ces études. Le sérum de ces animaux après infection par des larves L_3 de B. malayi, ne précipite pas la molécule de 110 Kd; ce qui indique que la réponse immune vis-à-vis de cet antigène chez des souris Balb/C est dépendante des cellules T. Notre travail apporte donc, une nouvelle évidence du rôle des lymphocytes T dans l'élaboration de la réponse immune vis-à-vis des antigènes filariens. En effet, les travaux de Suswillo et al., (1980, 1981) chez des souris consanguines ("nude") infectées par B. pahangi ainsi que ceux de Haque et al., (1981) chez des rats athymiques infectés par D. viteae, montrent que l'absence des lymphocytes T chez ces animaux permet le développement de l'infection.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans notre étude montrent que l'utilisation d'anticorps monoclonaux permet d'identifier des déterminants antigéniques sur la surface de la microfilaire de Brugia malayi. L'antigène reconnu semble être un immunogène important étant donné qu'il est identifié par les anticorps présents dans les infections naturelles humaines par différentes espèces de filaires. Néanmoins, cet antigène ne semble pas être spécifique d'espèce dans le groupe des filaires, excluant la possibilité d'utiliser cet antigène dans un but de diagnostic de l'infection par des espèces filariennes. D'autre part, ceci pourrait représenter un avantage; en effet, comme par exemple dans les études sur les sporozoïtes du paludisme, l'obtention d'un antigène qui n'est pas spécifique d'espèce mais spécifique de stade, pourrait être un candidat pour l'élaboration d'un vaccin. Les résultats de nos études indiquent la possibilité que cet antigène soit spécifique de stade, n'étant détecté qu'au niveau de la surface de la microfilaire (L₁). Evidemment, cette hypothèse doit être confirmée par des études complémentaires.

- AGGARWAL, A., CUNA, W., HAQUE, A., DISSOUS, C., & CAPRON, A. (1984) Resistance against Brugia malayi microfilariae induced by a monoclonal antibody that promotes killing by macrophages and recognizes surface antigen(s). Immunology. (soumis à publication).
- AHMED, S.S. (1967) Studies on the laboratory transmission of subperiodic Brugia malayi and B. pahangi. I. The resistance of guinea pigs, rabbits and white mice to infection. Ann. Trop. Med. Parasit. 61, 93.
- AIYAR, S., ZAMAN, V. & HA, C.S. (1982) Mechanism of destruction of Brugia malayi microfilariae in vitro : the role of antibody and leucocytes. Acta Trop. 39, 225.
- AMBROISE-THOMAS, P. (1974) Immunological diagnosis of human filariasis : present possibilities, difficulties and limitations. (A review). Acta Trop. 31, 108.
- AMBROISE-THOMAS, P. (1980) In Immunological investigation of tropical diseases (Ed. V. Houba) Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 84.
- ANDERSON, R.I., FAZEN, L.E. & BUCK, A.E. (1975) Onchocerciasis in Guatemala. III. Daytime periodicity of microfilariae in the skin. Am. J. Trop. Med. Hyg. 24, 62.
- ASH, L.R. (1973) Chronic Brugia pahangi and Brugia malayi infections in Meriones unguiculatus. J. Parasit. 59, 442.
- ASH, L.R. & RILEY, J.M. (1970) Development of subperiodic Brugia malayi in the jird Meriones unguiculatus, with notes on infections in other rodents. J. Parasit. 56, 969.
- BALTAZARD, M., CHABAUD, A.G., MOFIDI, C. & MINOU, A. (1953) Une nouvelle filaire "de laboratoire". Ann. Parasit. Hum. Comp. 28, 388.
- BARTLETT, A., TURK, J., MACKENZIE, C.D., FUGESANG, H. & ANDERSON, J. (1978) Variation in delayed hypersensitivity in onchocerciasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 72, 372.
- BASCHONG, W., TANNER, M., BETSCHAT, B., RUDIN, W. & WEISS, N. (1982). Dipetalonema viteae : extraction and immunogenicity of cuticular antigens from female worms. Exp. Parasitol. 53, 262.

- BAZIN, H., CAPRON, A., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P. & PAUWELS, R. (1980) Effect of neonatal injection of anti- μ antibodies on immunity to schistosomes (*S. mansoni*) in the rat. *J. Immunol.* 124, 2373.
- BEAVER, P.C., ORIHEL, T.C. & JOHNSON, M.H. (1974) *Dipetalonema viteae* in the experimentally infected jird, *Meriones unguiculatus*. II. Microfilaraemia in relation to worm burden. *J. Parasit.* 60, 310.
- BOLTON, A.E. & HUNTER, W.M. (1973) The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem. J.* 133, 529.
- BRAUN, D. G., KINDRED, B. & JACOBSON, E. B. (1972) Streptococcal group A carbohydrate antibodies in mice. Evidence for strain differences in magnitude and restriction of the response, and for thymus dependence. *Eur. J. Immunol.* 2, 138.
- BRUN-MUNZINGER, R.A. & SOUTHGATE, B.A. (1977). Preliminary studies on the histochemical differentiation of strains of *Onchocerca volvulus* microfilariae in Togo. *Bull. Wld Hlth Org.* 55, 569.
- BRYCESON, A.D., VAN VEEN, K.S., ODULOJU, A.J. & DUKE, B.O.L. (1976) Antigenic diversity among *Onchocerca volvulus* in Nigeria, immunological differences between onchocerciasis in savanna and forest of Cameroon. *Clin. Exp. Immunol.* 24, 168.
- BUTTERWORTH, A.E., REMOLD, H.G., HOUBA, V., DAVID, J.R., FRANKS, D., DAVID, P.H. & STURROCK, R.F. (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* : mediation by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J. Immunol.* 118, 2230.
- BUTTERWORTH, A.E., STURROCK, R.F., HOUBA, V., MAHMOUD, A.A., SHER, A. & REES, P.H. (1975) Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256, 727.
- CANLAS, M. & PIESENS, W. (1984) Stage-specific and common antigens of *Brugia malayi* identified with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132 : 3138.
- CAPRON, A., GENTILINI, M. & VERNES, A. (1968) Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immunoélectrophorèse. *Path. Biol.* 16, 1039.

- CATHLEEN, P. & WALDMAN, H. (1984) T cell help mechanisms in the in vitro antibody response : the role of linked and non-linked recognition interaction. *Immunology* 51, 343.
- COURT, J.P. & STOREY, D.M. (1981) Shared antigens between Litomosoides carinii and its hosts Sigmodon hispidus and Mastomys natalensis. *Tropenmed. Parasit.* 32, 161.
- CROSS, J.H., PARTONO, F., HSU, M.Y.K., ASH, L.R. & OEMIJATIS, S. (1979) Experimental transmission of Wuchereria bancrofti to monkeys. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28, 56.
- CRUICKSHANK, J.K., PRICE, K.M., MACKENZIE, C.D., SPRY, C.J.F. & DENHAM, D.A. (1983) Infection of inbred and nude (athymic) rats with Brugia spp. *Parasit. Immunol.* 5, 527.
- D'ALENSANDRO, D.A. & KLEI, T.R. (1976) Evidence for immunodepression of syrian hamsters and mongolian jirds by Dipetalonema viteae infections. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68, 72.
- DAVEAU, C. & AMBROISE-THOMAS, P. (1982) Sero-diagnostic de l'onchocercose par micro-ELISA face à des antigènes homologues somatiques et métaboliques (excrétés-sécrétés). Comparaison à l'immunofluorescence indirecte. *Méd. Trop.* 42, 513.
- DAVIE, J. M., & PAUL, W. E. (1974) Role of T lymphocytes in the humoral response. I. Proliferation of B lymphocytes in thymus deprived mice. *J. Immunol.* 113, 1438.
- DE BUEN, S. (1971) Onchocerciasis. In Pathology of Protozoal and helminthic diseases. (R.A. Marcial-Rojas, Ed.) Williams and Wilkins Co., Baltimore, p. 880.
- DENHAM, D.A. (1980) Vaccination against filarial worms using radiation-attenuated vaccines. *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 7, 105.
- DENHAM, D.A., PONNUDURAI, T., NELSON, G.S., GUY, F. & ROGERS, R. (1972a). Studies with Brugia pahangi. I. Parasitological observations on primary infections of cats (*Felis catus*). *Int.J. Parasit.* 2, 239.

- DENHAM, D.A., PONNUDURAI, T., NELSON, G.S., ROGERS, R. & GUY, F. (1972b) Studies with Brugia pahangi. II. The effect of repeated infection on parasite levels in cats. *Int. J. Parasit.* 2, 401.
- de SAVIGNY, D. & TIZZARD, I.R. (1977) Toxocara larva migrans : the use of larval secretory antigens in haemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody tests. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 71.
- des MOUTIS, I., OUAISSI, A., GRZYCH, J.M., YARZABAL, I., HAQUE, A. & CAPRON, A. (1983) Onchocerca volvulus detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 533.
- DUKE, B.O.L. (1960) Studies on loasis in monkeys. II. The population dynamics of the microfilariae of Loa loa in experimentally infected drills (Mandrillus leucophaeus). *Ann. Trop. Med. Parasit.* 54, 15.
- EL-SADU, W.M., AIKAWA, M. & GREENE, B.M. (1983) In vitro immune mechanisms associated with clearance of microfilariae. *J. Immunol.* 130, 428.
- FENG, L.C. (1937) Attempt to immunize dogs against infection with Dirofilaria immitis Leidy, 1856. *Festschrift Nocht (1937) Herausgegeben vom Institut für Schiffs - und Tropenkrankheiten, Hamburg*, p. 140.
- FOX, E.G. & SCHACHER, J.F. (1976) A comparison of syngenic laboratory rat strains as hosts for Brugia pahangi. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 70, 523.
- FORSYTH, K. P., COPEMAN, D. B., ANDERS, R., & MITCHELL, G.F., (1981) The major radioiodinated cuticular antigens of Onchocerca gibsoni microfilariae are neither species nor onchocerca specific. *Acta Trop.* 38, 343.
- FORSYTH, K.P., COPEMAN, D.B. & MITCHELL, G.F. (1982) Purification of Onchocerca gibsoni microfilariae. *Int. J. Parasit.* 12, 53.

- GREENE, B.M., TAYLOR, H.R. & AIKAWA, M. (1981) Cellular killing of microfilariae of Onchocerca volvulus : eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J. Immunol.* 127, 1611.
- GROVE, D.I., DAVIS, R.S. (1978) Serological diagnosis of Bancroftian and Malayan filariasis. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 27, 508.
- GROVE, D.I., DAVIS, R.S. & WARREN, K.S. (1979) Brugia malayi microfilaraemia in mice : a model for the study of the host response to microfilariae. *Parasitology.* 79, 303.
- GROVE, D.I. & FORBES, I.J. (1979) Immunosuppression in bancroftian filariasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.* 73, 23.
- GUSMAO, R., STANLEY, A.M. & OTTESEN, E.A. (1981) Brugia pahangi : immunologic evaluation of the differential susceptibility to filarial infection in inbred Lewis rats. *Exp. Parasitol.* 52 , 147.
- HAQUE, A., AGGARWAL, A., CUNA, W., OVLAQUE, G., CESBRON, J.Y. & CAPRON, A. (1984) The use of monoclonal antibodies in studies of filarial parasite antigens. In Proceedings of the Congress on standardization and control of biologicals produced by recombinant DNA Technology (Joint IABS/WHO Meeting in Geneva), Academic Press, New York (in press).
- HAQUE, A., CAMUS, D., OGILVIE, B.M., BAZIN, H. & CAPRON, A. (1981) Dipetalonema viteae infective larvae reach reproductive maturity in rats immunodepressed by prior exposure to Schistosoma mansoni or its products and in congenitally athymic rats. *Clin. Exp. Immunol.* 43, 1.
- HAQUE, A. & CAPRON, A. (1982) Transplacental transfer of rodent microfilariae induces antigen-specific tolerance in rats. *Nature.* 229, 361.
- HAQUE, A. & CAPRON, A. (1984) *Filariasis : Antigens and Immunity* (Ed. Dr T.W. Pearson, Publisher : Marcel Dekker, Inc. New York and Basel).
- HAQUE, A., CAPRON, A., OUAISSI, A., KOUEMENI, L., LEJEUNE, J.P., BONNEL, B. & PIERCE, R. (1983) Immune unresponsiveness and its possible relation to filarial disease. *Contr. Microbiol. Immunol.* 7, 9.

- HAQUE, A., CHASSOUX, D., OGILVIE, B.M. & CAPRON, A. (1978) Dipetalonema viteae infection in hamsters : enhancement and suppression of microfilariemia. *Parasitology*. 76, 77.
- HAQUE, A., CUNA, W., AGGARWAL, A. & CAPRON, A. (1984) Recognition of tolerogen by antisera from animals harbouring transparentally transferred microfilariae. *Nature*. (soumis à publication).
- HAQUE, A., JOSEPH, M., OUAISSI, A., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1980) IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilariae of Dipetalonema viteae *in vitro*. *Clin. Exp. Immunol.* 40, 487.
- HAQUE, A., LEFEBVRE, M.N., OGILVIE, B.M. & CAPRON, A. (1978a) Dipetalonema viteae in hamsters : effect of antiserum or immunization with parasite extracts on production of microfilariae. *Parasitology* 76, 61.
- HAQUE, A., OGILVIE, B.M. & CAPRON, A. (1981) Dipetalonema viteae : Response of spleen cells in experimental mouse filariasis to mitogens and antigens. *Exp. Parasitol.* 52, 25.
- HAQUE, A., OUAISSI, A., JOSEPH, M., CAPRON, M. & CAPRON, A. (1981) IgE antibody in eosinophil and macrophage-mediated *in vitro* killing of Dipetalonema viteae microfilariae. *J. Immunol.* 127, 716.
- HAQUE, A., OUAISSI, A., SANTORO, F., des MOUTIS, I. & CAPRON, A. (1982) Damage to infective larvae of Dipetalonema viteae (Filarioidea) mediated by rat eosinophil and macrophage adherence : Involvement of alternative pathway of complement. *J. Immunol.* 129, 2219.
- HAQUE, A., WORMS, M.J., OGILVIE, B.M. & CAPRON, A. (1980b) Dipetalonema viteae : Microfilariae production in various mouse strains and in nude mice. *Exp. Parasitol.* 49, 398.
- HAWKING, F. (1967) The Twenty-four hour periodicity of microfilariae : biological mechanisms responsible for its production and control. *Proc. R. Soc. Series B* 169 : 59.
- HEDGE, E.C. & RIDLEY, D.S. (1977) Immunofluorescent reactions with microfilariae. I. Diagnostic evaluation. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 304.

- HIGASHI, G.I. & CHOUDHURY, A.B. (1970) In vitro adhesion of eosinophils to infective larvae of Wuchereria bancrofti. *Immunology* 19, 65.
- HUNTER, W. M. & GREENWOOD, F. C. (1962) Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 194, 495.
- JOHNSON, P.A., MACKENZIE, C.D., SUSWILLO, R.R., DENHAM, D.A. (1981) Serum-mediated adherence of feline granulocytes to microfilariae of Brugia pahangi in vitro. Variations with parasite maturation. *Parasite Immunol.* 3, 69.
- JOSHI, V.V., UDWADIA, F.E. & GADGIL, R.K. (1969) Etiology of tropical eosinophilia. A study of lung biopsies and review of published reports. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18, 231.
- KAGAN, I.G. & NORMAN, I. (1974) In Manual of clinical microbiology (E.H. Bennet, E.H. Spaulding & J.P. Tiaunt, Eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C. p. 645.
- KAZURA, J.W. & DAVIS, R.S. (1982) Soluble Brugia malayi microfilarial antigens protect mice against challenge by an antibody-dependent mechanism. *J. Immunol.* 128, 1792.
- KAZURA, W. & GROVE, D.I. (1978) Stage-specific antibody-dependent eosinophil-mediated destruction of Trichinella spiralis. *Nature*. 274, 588.
- KINA, T. & KATSURA, N.Y. (1982) T-Cell regulation of pockweed-mitogen-induced polyclonal immunoglobulin production in mice. *Immunology* 46, 575.
- KLEI, T.R., ENRIGHT, F.M., BLANCHART, D.B. & UHL, S.A. (1982) Effects of presensitization on the development of lymphatic lesions in Brugia pahangi-infected jirds. *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 31, 280.
- KOBAYASHI, J., MATSUDA, H., FUJITA, K., SAKAI, T. & SHINODA, K. (1969) Mode of action of diethylcarbamazine on cotton rat filaria. *Jap. J. Parasit.* 18, 563.
- KRONVALL, G., GREY, H.M. & WILLIAMS, R.C. (1970) Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins. *J. Immunol.* 105, 1116.

- KRISHNASWAMI, A.K. & PATTANAYAK, S.P. (1959) Unsuccessful attempts at active immunization of dogs against Dirofilaria repens infection. Bull. Natl. Soc. India Malar. 7, 31.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680.
- LANGONE, J. (1980) Radioiodination by use of the Bolton-Hunter and related reagents. Methods in Enzymology. 70, 221.
- McGREEVY, P.B., RATIWAYANTO, S., TUTI SUKAR, McGREEVY, M.M. & DENNIS, D.T. (1980) Brugia malayi : Relationship between anti-sheath antibodies and microfilaraemia in natives living in an endemic area of South Kalimantan, Borneo. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 553.
- MACKENZIE, C.D. (1980) Eosinophil leukocytes in filarial infections. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74 (suppl), 51.
- MACKENZIE, C.D., PRESTON, P.M., OGILVIE, B.M. (1978) Immunological properties of the surface of nematodes. Nature 276, 826.
- MACKENZIE, C.D., RAMALHO-PINTO, F.J., MACLAREN, D.J. & SMITHERS, S.R. (1977) Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of Schistosoma mansoni in vitro. Clin. Exp. Immunol. 30, 97.
- MACKENZIE, C.D., PRESTON, P.M., OGILVIE, B.M. (1978) Immunological properties of the surface of nematodes. Nature 276, 826.
- MAIZELS, R.M., PARTONO, F., OEMIJATI, S., DENHAM, D.A. & OGILVIE, B.M. (1983) Cross-reactive surface antigens on three stages of Brugia malayi, B. pahangi and B. Timori. Parasitology 87, 249.
- MAIZELS, R.M., MEGHJI, M. & OGILVIE, B.M. (1983a) Restricted sets of parasite antigens from the surface of different stages and sexes of the nematode Nippostrongylus brasiliensis. Immunology 48, 107.
- MAIZELS, M., PARTONO, F., OEMIJATI, S. & OGILVIE, B.M. (1983) Antigenic analysis of Brugia timori, a filarial nematode of man : initial characterization by surface radioiodination and evaluation of diagnostic potential. Clin. exp. Immunol. 51, 269.

- MAIZELS, R.M., PHILIPP, M., DASGUPTA, A. & PARTONO, F. (1984) Human serum albumin is a major component on the surface of microfilariae of Wuchereria bancrofti. *Parasite Immunol.*, 6, 185.
- MAIZELS, R.M., PHILIPP, M. & OGILVIE, B.M. (1982) Molecules on the surface of parasitic nematodes as probes of the immune response in infection. *Immunol. Rev.* 61, 109.
- MANSON, P. (1888) On the periodicity of filarial migration to and from the circulation. *China Imperial Maritime Customs Reports* 22, 63.
- MARCOULLIS & GRASBECK, R. (1976) Preliminary identification and characterization of antigen extracted from Onchocerca volvulus. *Tropenmed. Parasit.* 27, 314.
- MEHTA, K., SINDU, R.K., SUBRAHMANYAM, D., HOPPER, K., NELSON, D. & RAO, C.K. (1981) Antibody-dependent cell-mediated effects in bancroftian filariasis. *Immunology* 43, 117.
- MEHTA, K., SINDHU, R.K., SUBRAHMANYAM, D. & NELSON, D.S. (1980) IgE-dependent adherence and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to Litomosoides carinii microfilariae. *Clin. Exp. Immunol.* 41, 107.
- MEHTA, K., SUBRAHMANYAM, D. & SINDHU, R.K. (1981) Immunogenicity of homogenates of the developmental stages of Litomosoides carinii in albino rats. *Acta Trop.* 38, 319.
- MITCHELL, G.R., ANDERS, R.F., BROWN, G.V., HANDMAN, E., ROBERTS-THOMSON, I.C., CHAPMAN, C.B., FORSYTH, K.P., KAHL, L.P. & CRUISE, K.M. (1982) Analysis of infection characteristics and antiparasite immune responses in resistant compared with susceptible hosts. *Immunol. Rev.* 61, 137.
- MURATA, H. (1939) Immunologische studien über Dirofilaria immitis. *Fakuoka Acta Med.* 32, 945.
- NOEL, A., HAQUE, A., BONNEL, B., TORPIER, G. & CAPRON, A. (1984) Neutrophil mediated killing of Dipetalonema viteae microfilariae : simultaneous presence of IgE, IgG antibodies and complement is required. *Immunology* 51, 585.

- OGILVIE, B.M. (1979) Protozoan and helminth infections of the small intestine. In Tropics in gastroenterology. S.C. Truelove & C.P. Willoughby (Eds), p. 227. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- OGILVIE, B.M. & JONES, V.E. (1971) Nippostrongylus brasiliensis. A review of immunity and the host/parasite relationship in the rat. Exp. Parasitol. 29, 138.
- OGILVIE, B.M. & LOVE, R.J. (1974) Cooperation between antibodies and cells in immunity to a nematode parasite. Transplant. Rev. 19, 147.
- OGILVIE, B.M., PHILIPP, M., JUNGERY, M., MAIZELS, R.M., WORMS, M.J. & PARKHOUSE, R.M.E. (1980) The surface of nematodes and the immune response of the host. In The host invader interplay (H. Van den Bossche, Ed.), p. 99, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- OTTESEN, E.A., WELLER, P.F., HECK, L. (1977) Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. Immunology 33, 413.
- OUAISSI, A., KOUEMENI, L., HAQUE, A., RIDEL, P., SAINT ANDRE, P. & CAPRON, A. (1981) Detection of circulating antigens in Onchocerciasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30, 1211.
- OUCHTERLONY, D. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy 5, 1.
- PACHECO, G. (1974) Relationship between the number of circulating microfilariae and the total population of microfilariae in a host. J. Parasit. 60, 814.
- PARKHOUSE, R.M.E., PHILIPP, M. & OGILVIE, B.M. (1981) Characterisation of surface antigens of Trichinella spiralis infective larvae. Parasite Immunol. 3, 339.
- PEREZ, H. (1974) Investigation on the mechanism of protective immunity to S. mansoni in the rat. Ph. D. Thesis, Brunel University, Uxbridge, Middlesex, England.

- PHILIP, M., TAYLOR, P.M., PARKHOUSE, R.M.E. & OGILVIE, B.M. (1981a) Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode Trichinella spiralis. J. Exp. Med., 154, 210.
- PHILIP, M., WORMS, M.J., McLAREN, D.J., OGILVIE, B.M., PARKHOUSE, R.M. & TAYLOR, P.M. (1984) Surface protein of a filarial nematode : a major soluble antigen and a host component on the cuticle of Litosomosoides carinii. Parasite Immunol. 6, 63.
- PHILLIPS, S.M., REID, W.A. & SADUN, E.H. (1977) The cellular and humoral immune response to S. mansoni in inbred rats. II. Mechanisms during reexposure. Cell. Immunol. 28, 75.
- PIESSENS, P.F., McGREEVY, P.B., RATIWAYANTO, S., McGREEVY, M., PIESSENS, P.W., KOIMAN, I., SAROSO, J.S. & DENNIS, D.T. (1980) Immune responses in human infections with Brugia malayi : correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29, 563.
- PIESSENS, W.F. & BELDEKAS, M. (1979) Diethylcarbamazine enhances antibody-mediated cellular adherence to Brugia malayi microfilariae. Nature 282, 845.
- PONNUDURAI, T., DENHAM, D.A., NELSON, G.S. & ROGERS, R. (1974) Studies with Brugia pahangi 4. Antibodies against adult and microfilarial stages. J. Helminthol. 48, 107.
- PORTARO, J.K., BRITTON, S., ASH, L.R. (1976) Brugia pahangi : depressed mitogen reactivity in filarial infections in the jird, Meriones unguiculatus. Exp. Parasitol. 40, 438.
- RAMACHANDRAN, P.C. (1975) Attempts at immunization against Malayan filariasis using X-irradiated infective larvae. In Nuclear techniques in helminthology research. International Energy Agency, Vienna, p. 101.
- RAMACHANDRAN, C.P. (1970) Attempts to immunize domestic cats with X-irradiated infective larvae of sub-periodic Brugia malayi. I. Parasitological aspects. S.E. Asian J. Trop. Med. Publ. Hlth 1, 78.

- RAMAKRISHNAN, S.P., SINGH, D. & KRISHNASWAMI, A.K. (1962) Evidence of acquired immunity against microfilaria of Litomosoides carinii in albino rats with mice-induced infection. *Ind. J. Malar.* 16, 263.
- RAO, Y.V.B.G., MEHTA, K. & SUBRAHMANYAM, D. (1977) Litomosoides carinii: effect of irradiation on the development and immunogenicity of the larval forms. *Exp. Parasitol.* 43, 39.
- RIDLEY, D.S. & HEDGE, C.E. (1977) Immunofluorescent reactions with microfilariae. 2. Bearing on host-parasite relations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 522.
- ROSE, G., BIGUET, J. & ROX, F. (1966) Application d'une réaction d'hémagglutination au diagnostic de l'onchocercose. *Rev. Hyg. Med. Soc.* 14, 383.
- ROSENKOETTER, M., REDER, A., OGER, J. & ANTEL, J. (1984) T cell regulation of polyclonal induced immunoglobulin secretion in humans. *J. Immunol.* 132, 1779.
- RUDIN, W., TANNER, M., BAUER, P. & WEISS, N. (1980) Studies on Dipetalonema viteae (filarioidea). 5. Ultrastructural aspects of the antibody-dependent cell-mediated destruction of microfilariae. *Tropenmed. Parasit.* 31, 194.
- SCHACHER, J.F. (1973) Les différents types de cycles évolutifs chez les filaires. *WHO/FIL/73*, 104.
- SCHACHER, J.F. (1974) Laboratory models in filariasis: non rodent final host models. *WHO/FIL/74*, 120.
- SCHILLER, E.L., d'ANTONIO, R. & MARROQUIN, M.F. (1980) Intradermal reactivity of excretory and secretory products of onchocercal microfilariae. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1215.
- SILVERMAN, P.H. (1970) Vaccination: progress and problems. *In Immunity to parasitic animals* (G.J. Jackson, R. Herman & I. Singer, Eds) 2, 1165.
- SIM, K.B.L., KWA, B.H. & MAK, J.W. (1982) Immune responses in human Brugia malayi infections: serum-dependent cell-mediated destruction of infective larvae in vitro. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76, 362.

- STOLL, N.R. (1961) The Worms : can we vaccinate against them ? Am. J. Trop. Med. Hyg. 10, 293.
- SUBRAHMANYAM, D., MEHTA, K., NELSON, D.S., RAO, Y.B.V.G. & RAO, C.K. (1978) Immune reactions in human filariasis. J. Clin. Microbiol 8, 228.
- SUCHARIT, S. & W.W. Macdonald (1973) Brugia pahangi in small laboratory animals : attempts to increase susceptibility of white rats to Brugia pahangi by host selection. S.E. Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 4, 71.
- SUSWILLO, R.R., DOENHOFF, M.J. & DENHAM, D.A. (1981) Successful development of Brugia pahangi in T-cell deprived CBA mice. Acta Trop. 38, 305.
- SUSWILLO, R.R., OWEN, D.G. & DENHAM, D.A. (1980) Infections of Brugia pahangi in conventional and nude (athymic) mice. Acta Trop. 37, 327.
- TANNER, M. & WEISS, N. (1981b) Dipetalonema viteae (Filarioidea) : evidence for a serum dependent cytotoxicity against developing third and fourth stage larvae in vitro. Acta Trop. 38, 325.
- TANNER, M. & WEISS, N. (1978) Studies on Dipetalonema viteae (Filarioidea) II. Antibody dependent adhesion of peritoneal exudate cells to microfilariae in vitro. Acta Trop. 35, 151.
- THOMPSON, J.P., CRANDALL, R.B., CRANDALL, C.A. & NEILSON, J.T. (1979) Clearance of microfilariae of Dipetalonema viteae in CBA/N and CBA/H mice. J. Parasitol. 65, 966.
- TOWNSON, S., BIANCO, A.E. & OWEN, D. (1981) Attempts to infect small laboratory animals with the infective larvae of Onchocerca lienalis. J. Helminthol. 55, 247.
- VAN MARCK, E.A.E., HAQUE, A. & GIGASE, P.L.J. (1983) Liver cirrhosis in hamsters infected with Dipetalonema viteae. In Contr. Microbiol. Immunol. (P.L. Gigase & E.A.E. Van Mark, Eds.), S. Karger, Basel, p. 245.
- VINCENT, A.L., SODEMAN Jr, W.A. & WINTERS, A. (1980) Development of Brugia pahangi in normal and nude mice. J. Parasitol. 66, 448.

- VINCENT, A.L., VICKERY, A.C., WINTERS, A. & SODEMAN, W.A. (1982) Life cycle of Brugia pahangi (Nematoda) in nude mice, C3H/HcN (nu/nu). *J. Parasitol.* 68, 553.
- VOELKER, J.R. & GARMS, R. (1972). Zur Morphologie unbekannter Filarienlarven aus dem Onchocercose-Übertrager Simulium damnosum und aus S. Kenyae in Liberia und zur Frage der möglichen Endwirte. *Z. Tropenmed. Parasit.* 23, 285.
- WAKELIN, D. (1978) Immunity to intestinal parasites. *Nature (Lond)* 273, 617.
- WARREN, K.S. (1973) Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man : immunology or ecology ? *J. Inf. Dis.* 127, 595.
- WATSON, J.M. (1960) In *Medical Helminthology* (Twindal & Cox, Eds.), London, Baillière, p. 81.
- WEBB, J.K.G., JOB, C.K. & GAULT, E.W. (1960) Tropical eosinophilia : demonstration of microfilariae in lung, liver and lymph nodes. *Lancet* *i*, 835.
- WEIL, G.J., HURSAIN, R., KUMARASWAMI, V., TRIPATHY, S.P., PHILLIPS, K.S. & OTTESEN, E.A. (1983) Prenatal allergic sensitization to helminth antigens in offspring of parasite-infected mothers. *J. Clin. Invest.* 71, 1124.
- WEISS, N. (1978) Dipetalonema viteae : In vitro blastogenesis of hamster spleen and lymph node cells to phytohemagglutinin and filarial antigens. *Exp. Parasitol.* 46, 283.
- WEISS, N. (1978) Studies on Dipetalonema viteae (Filarioidea). I. Microfilaraemia in hamsters in relation to worm burden and humoral immune response. *Act. Trop.* 35, 137.
- WEISS, N. & TANNER, M. (1981) Immunogenicity of the surface of filarial larvae (Dipetalonema viteae). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 179.
- WEISS, N. & TANNER, M. (1979) Studies on Dipetalonema viteae (Filarioidea). 3. Antibody-dependent cell-mediated destruction of microfilariae in vivo. *Tropenmed. Parasit.* 30, 73.

- WELLER, P.F. (1978) Cell-mediated immunity in experimental filariasis : lymphocyte reactivity to filarial stage-specific antigens and to B- and T-cell mitogens during acute and chronic infections. *Cell. Immunol.* 37, 369.
- WONG, M.M. (1964) Studies on microfilaraemia in dogs. II. Levels of microfilaraemia in relation to immunologic responses of the host. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 13, 66.
- WONG, M.M., FREDERICKS, H.J. & LAVOPIERRE, M.M. (1974) Dirofilaria immitis : fate and immunogenicity of irradiated infective stage larvae in beagles. *Exp. Parasitol.* 35, 465.
- WONG, M.M. & GUEST, M.F. (1969) Filarial antibodies and eosinophilia in human subjects in an endemic area. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 63, 796.
- WONG, M. M., & SUTER, P. F. (1979) Indirect fluorescent antibody test in occult dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 40, 414.
- WORMS, M.J. (1972) Circadian and seasonal rhythms in blood parasites. In Behavioural aspects of parasite transmission (E.U. Canning and C.A. Wright, Eds), *Zool. J. Linn. Soc.* 51 (Suppl. I), 53.
- WORMS, M.J. (1972) The course of microfilaraemia in primary infections of Dirofilaria immitis and D. repens in dogs. C.R. 1er Multicolloque Européen de Rennes, 324.
- WORMS, M.J., TERRY, R.J. & TERRY, A. (1961) Dipetalonema viteae filarial parasite of the jird Meriones libycus. I. Maintenance in the laboratory. *J. Parasitol.* 47, 963.
- YARZABAL, L., PETRALANDA, I., ARANGO, M., LOBO, L. & BOTTO, C. (1983) Acid phosphatase patterns in microfilariae of Onchocerca volvulus of the upper Orinico basin, Venezuela. *Tropenmed. Parasit.* 34, 109.



LES RÉSULTATS OBTENUS DANS NOTRE ÉTUDE MONTRENT QUE L'UTILISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX PERMET D'IDENTIFIER DES DÉTERMINANTS ANTIGÉNIQUES À LA SURFACE DE LA MICROFILAIRE DE BRUGIA MALAYI. L'ANTIGÈNE RECONNU SEMBLE ÊTRE UN IMMUNOGÈNE IMPORTANT, ÉTANT DONNÉ QU'IL EST IDENTIFIÉ PAR LES ANTICORPS PRÉSENTS DANS LES INFECTIONS NATURELLES HUMAINES PAR DIFFÉRENTES ESPÈCES DE FILAIRES (BRUGIA MALAYI, ONCHOCERCA VOLVULUS ET LOA LOA). NÉANMOINS, CET ANTIGÈNE NE SEMBLE PAS ÊTRE SPÉCIFIQUE DANS LE GROUPE DES FILAIRES, EXCLUANT LA POSSIBILITÉ D'UTILISER CET ANTIGÈNE DANS UN BUT DE DIAGNOSTIC AU NIVEAU DES ESPÈCES FILARIENNES. PAR CONTRE, NOS ÉTUDES PRÉLIMINAIRES AVEC DES SÉRUMS DE SOURIS EXPÉRIMENTALEMENT IMMUNISÉES PAR DIFFÉRENTS STADES ÉVOLUTIFS DE DIPETALONEMA VITAE ET SURTOUT PAR L'UTILISATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL AA₃-44, INDIQUENT LA POSSIBILITÉ QUE CET ANTIGÈNE SOIT SPÉCIFIQUE DU STADE MICROFILAIRE, N'ÉTANT DÉTECTÉ QU'AU NIVEAU DE LA SURFACE DE LA MICROFILAIRE (L₁). IL SEMBLE QUE CET ANTIGÈNE (110 Kd) RECONNU PAR L'ANTICORPS MONOCLONAL AA₃-44 AURAIT UN RÔLE DANS L'IMMUNITÉ CONTRE LA MICROFILAIRE DE B. MALAYI LORS DES INFECTIONS EXPÉRIMENTALES CHEZ LA SOURIS.

MOTS CLÉS : NÉMATODES - FILAIRES - ANTIGÈNES DE SURFACE - ANTICORPS MONOCLONAL - SÉRUM DE PATIENTS FILARIENS.

* * * * *