



RECEIVED

LES PROTEINES SÉRIQUES DANS LA FILARIOSE LYMPHATIQUE A WUCHERERIA BANCROFTI VAR. PACIFICA
ETUDE ELECTROPHORETIQUE ET DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE DES IMMUNOGLOBULINES A, M, G ET E¹

par

J. P. Moreau,² G. Cuzon, G. Pichon, D. Outin-Fabre et J. Lagraulet
avec la collaboration technique de N. Lefèbre et S. Lee Sang

Table des matières

	<u>Pages</u>
1. Etude électrophorétique	2
1.1 Matériel et méthodes	2
1.1.1 Recueil des sérums	2
1.1.2 Electrophorèse sur bande	2
1.1.3 Electrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide	2
1.2 Résultats	2
1.3 Discussion	3
1.3.1 Electrophorèse en bande	3
1.3.2 Electrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide	3
2. Dosage immunochimique des immunoglobulines A, M, G et E	4
2.1 Matériel et méthodes	4
2.2 Résultats	4
2.3 Discussion	5
3. Conclusion	6
Résumé	6
Remerciements	6
Références bibliographiques	6

¹ Travail de la Section des Laboratoires de Recherches, Institut de Recherches médicales "Louis Malardé", Papeete, Polynésie française (Directeur : J. Lagraulet).

² Assistant des Hôpitaux des Armées.

La pathogénie des manifestations cliniques de la filariose lymphatique est encore mal connue et suscite de nombreuses controverses. Cependant la participation de processus d'ordre immunopathologique semble unanimement admise. Mais la nature même de ces processus demande à être éclaircie. Une première approche du problème peut être tentée par l'étude des protéines sériques des filariens. Nous avons abordé cette étude sur deux plans : par l'analyse électrophorétique d'une part, par le dosage des immunoglobulines d'autre part. L'isolement relatif des îles de la Polynésie française et le fait qu'il n'existe dans ce territoire qu'une seule filariose humaine confère un intérêt particulier à cette étude.

1. ETUDE ELECTROPHORETIQUE

1.1 Matériel et méthodes

1.1.1 Recueil des sérums

L'étude a porté sur un groupe de 30 sujets filariens dont la microfilarémie variait de 5 à 200 microfilaires pour 20 mm³ de sang. Ces sujets à microfilarémie positive (Mf+) n'avaient jamais reçu de traitement par la diéthylcarbazine et aucun ne présentait de lésions chroniques. Un second groupe de 30 sujets cliniquement sains à microfilarémie négative (Mf-) a été constitué pour servir de témoin bien qu'aucun test biologique ne permette d'affirmer qu'ils n'aient jamais été infectés.

Tous ces sujets sont nés en Polynésie française, mais leur origine ethnique est variée.

1.1.2 Electrophorèse sur bande

Le sérum a été déposé à raison de deux microlitres sur des bandes d'acétate de cellulose de format 30 x 160 mm. La migration a été effectuée dans des cuves Elphor avec du tampon véronal/véronal sodique pH 8,6 sous une tension constante de 200 V en réglant l'intensité de départ sur 0,4 mA par cm. La durée de migration était de 65 minutes. Les bandes ont été colorées par le rouge Ponceau S et diaphanisées par le mélange acétate d'éthyle-acide acétique (3 vol./7 vol.) et analysées par intégrateur.

1.1.3 Electrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide

La technique initiale de Ornstein (1964) a été utilisée avec quelques modifications. Les sérums ont été déposés dans des gels de stockage de pH 6,7. Les gels de séparation avaient une concentration de 7 % d'acrylamide et un pH ajusté à 8,9. La migration a été effectuée dans une cuve Shandon à +4°C en appliquant pour chaque colonne une intensité constante de 5 mA pendant une heure. La tension variait de 80 à 240 V entre le début et la fin de la migration dont le front était repéré par du bleu de bromophénol. Les gels démoulés ont été colorés par le noir amide. La fixation et la coloration ont été assurées par une solution d'acide acétique à 10 %.

1.2 Résultats

L'électrophorégramme sur bande révèle que le pourcentage des albumines est de 61,9 chez les Mf+ et de 71,7 chez les Mf- (tableau 1). Inversement, la fraction globulinique est plus élevée chez les Mf+. Les fractions alpha 1 et 2 ne sont pas différentes. Les bêta-globulines sont légèrement augmentées chez les Mf+ avec un pourcentage de 8,1 contre 5,5 chez les Mf-. Mais la différence est surtout nette avec les gamma-globulines qui atteignent 21,1 % chez les Mf+ et seulement 13,6 % chez les Mf-. Cette différence est très hautement significative ($P < 10^{-9}$).

TABLEAU 1. ELECTROPHORESE SUR BANDE D'ACETATE DE CELLULOSE

	Albumines		Globulines							
			Alpha 1		Alpha 2		Bêta		Gamma	
	M*	S*	M	S	M	S	M	S	M	S
Mf-	61,9	6,5	1,03	0,05	5,9	1,07	8,1	1,81	21,1	4,5
Mf-	71,7	3,5	1,04	0,04	5,6	1,48	5,5	1,03	13,6	2,5

* M = moyenne
S = écart type.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide a permis d'observer pour l'ensemble des sérums étudiés un maximum de 22 anneaux. Le nombre moyen de ces anneaux chez les Mf+ est de 17,6. Il est de 14,7 chez les Mf-. Dans la zone des post-albumines, le nombre moyen des anneaux est de 6,4 pour les Mf+ et de 5,1 pour les Mf-. La différence est beaucoup plus nette dans la zone des gamma-globulines. Chez les Mf+, le nombre moyen d'anneaux est de 6; il est seulement de 3 chez les Mf-.

1.3 Discussion

1.3.1 Electrophorèse en bande

Celle-ci met en évidence une augmentation des bêta- et gamma-globulines. Les alpha 1 et 2 habituellement augmentées dans les processus de nécroses cellulaires pour les premières, dans les processus inflammatoires aigus ou chroniques pour les secondes, ne sont pas modifiées par rapport aux sujets sains. Les processus inflammatoires sont par conséquent mineurs ou inexistantes chez les filariens à microfilarémie positive. Une enquête sur les filariens éléphantiasiques donnerait sans doute des résultats différents, mais il est classique que de tels sujets n'aient pas de microfilaires dans le sang circulant.

L'augmentation des globulines intéresse donc en premier chef les fractions avec lesquelles migrent les globulines anticorps. Ces résultats confirment les données de l'unique étude électrophorétique effectuée chez des filariens dans une région où il n'existe qu'une seule espèce de filaire humaine. En effet, Dodin et col. (1965) avaient noté en 1965 à Madagascar chez cinq filariens lymphatiques à *W. bancrofti* une augmentation relative des globulines par rapport aux moyennes observées chez les autochtones. Une étude de Benex & Deschiens (1960) effectuée en Afrique tropicale montrait une augmentation des gamma-globulines par rapport aux moyennes habituelles. Il existait aussi une augmentation légère des alpha 2, mais l'enquête comportait des filariens à tous les stades évolutifs.

1.3.2 Electrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide

Cette technique de séparation des protéines est beaucoup plus fine que la précédente. Sa sensibilité est très grande puisqu'il suffit de 0,1 microgramme de protéine pour donner un anneau visible. En revanche, son interprétation est beaucoup plus délicate. En effet, le nombre d'anneaux varie en raison de variations génétiques de certaines protéines sériques, en particulier l'haptoglobine et la Gc globuline. Ces variations ont été étudiées en électrophorèse annulaire par Peacock et col. (1965).

Dans la zone des postalbumines, Peacock pense que la position des anneaux 2, 3 et 4 est en relation avec les variations Gc. Dans notre étude, il n'a pas été établi de différence dans la distribution de ces anneaux entre les groupes Mf+ et Mf-.

Par contre, dans la zone des gamma-globulines, où se trouvent les anneaux des types génétiques 2-2 et 2-1 d'haptoglobine, les anneaux sont plus nombreux chez les Mf+. Mais en l'absence d'un test à la benzidine (Smithies & Walker, 1955), il est pratiquement impossible de se prononcer sur les types génétiques, et ceci pour deux raisons. La première est l'interférence des anneaux a, b, c, dont la présence est variable. La seconde est que le nombre d'anneaux visibles dépend de la quantité absolue de chacune des fractions contenues dans le dépôt. Or, si le volume du dépôt a été constant, la quantité des différentes fractions protéiques était variable. Ceci peut expliquer que le nombre d'anneaux observés chez les Mf+ soit supérieur en moyenne au nombre d'anneaux observés chez les Mf-, puisque leur sérum a une teneur en globulines plus élevée.

En définitive, les techniques électrophorétiques demandent à être complétées par une étude immuno-chimique afin de préciser la nature des globulines responsables de l'augmentation des gamma-globulines.

2. DOSAGE IMMUNOCHEMIQUE DES IMMUNOGLOBULINES A, M, G ET E

2.1 Matériel et méthodes

Les sérums ont été dilués selon une progression géométrique de raison 2. Pour le dosage des IgE, les sérums ont été lyophilisés pour obtenir des concentrations 4/1 et 2/1. Le dosage a été effectué par une microtechnique de double diffusion en gélose (DDG) d'Ouchterlony. Sur des lames 7,5 x 2,5 cm étaient coulés 2,5 ml d'une solution de gélose pure à 1,5 % dans du tampon phosphate 0,15 M pH 7,1. Des puits de 2 mm de diamètre étaient creusés autour d'un puits central. La distance entre les trous était de 6 mm. Des puits périphériques recevaient les sérums à étudier. Dans les puits centraux étaient déposés les sérums spécifiques monovalents de lapin anti-Ig A, M et G (Institut Pasteur, Paris) ou les sérums de chèvre anti-Ig E (ICN). Le temps de diffusion en chambre humide à +25°C ± 2 était de 16 heures, suivi d'un lavage en eau physiologique pendant 24 heures. Après séchage à l'étuve à 37°C, la coloration était effectuée par le noir amide.

2.2 Résultats

Le taux limite retenu pour chaque sérum correspondait à la dilution la plus haute qui donnait un arc de précipitation. Pour les IgA, IgM et IgG, les résultats ont été reportés sur papier logarithme-probit en portant en abscisse les dilutions par ordre décroissant et en ordonnée le total cumulatif des sérums. Ceci a permis de définir le taux moyen de chacune des Ig pour les deux groupes étudiés (tableau 2).

TABLEAU 2. TAUX MOYENS DES IMMUNOGLOBULINES

	IgA	IgM	IgG
Mf+	1/59	1/9	1/590
Mf-	1/46	1/12	1/340

L'analyse statistique des résultats a été effectuée par la méthode de Karber. Le taux moyen des IgA est de 1/59 chez les Mf+ contre 1/46 chez les Mf- (différence non significative). Pour les IgM, le taux est de 1/9 pour les Mf+, de 1/12 pour les Mf- (différence significative, $P = 0,01$).

C'est avec les IgG que la différence est la plus nette. En effet, chez les Mf+, il atteint 1/590 contre 1/340 chez les Mf-. Il y a donc 1,7 fois plus d'IgG chez les Mf+ et cette différence est très hautement significative. ($P < 0,0001$).

En ce qui concerne les IgE, aucun des 30 sérums de Mf- n'a permis d'observer d'arcs de précipitation. Par contre, 18 sérums de Mf+ ont donné des arcs de précipitation, 9 avec les sérums concentrés quatre fois, 6 avec les sérums concentrés deux fois, 2 avec les sérums purs et enfin 1 avec une dilution au 1/2.

Il n'existe apparemment aucune corrélation entre le taux des IgE et le niveau de la microfilarémie.

2.3 Discussion

Au sein des globulines, les IgG sont augmentées d'une façon importante chez les Mf+. Elles sont responsables à elles seules de l'augmentation des gamma-globulines décelées par électrophorèse, puisqu'aussi bien le taux des IgM est légèrement plus élevé chez les Mf+.

Cette augmentation des IgG peut être interprétée comme la résultante d'une sollicitation constante du système immunitaire au cours de cette parasitose de longue durée. Mais cette stimulation n'apparaît pas très importante, puisque le taux est seulement 1,7 fois supérieur aux taux des Mf-.

Le résultat le plus intéressant a été obtenu avec les IgE. On sait que le taux normal est de 100 à 700 nanogrammes/ml. Ces concentrations sont par conséquent très au-dessous du seuil limite de détection des anticorps par la précipitation en gélose qui est de 5 microgrammes/ml. C'est pourquoi cette technique n'est guère utilisée pour l'étude des IgE qui nécessite la mise en œuvre de techniques autoradiographiques comme le test RISA (radio immunosorbent assay) de Wide & Porath (1966) ou test RSRD (radioactive single radial diffusion) de Rowe (1969).

Pour augmenter la sensibilité de la technique de précipitation en gélose utilisée dans notre étude, nous avons concentré quatre fois les sérums par lyophilisation (une concentration plus importante n'est pas réalisable, même après délipidation des sérums). Dans de telles conditions, nous avons obtenu des précipités avec 18 sérums de Mf+. En se basant sur la limite inférieure de sensibilité de la technique, on peut estimer approximativement que le taux des IgE dans ces sérums était supérieur à 1250 nanogrammes pour neuf sujets, à 2500 pour 6, à 5000 pour 2 et enfin à 10 000 pour le dernier.

Ainsi, la simple concentration par lyophilisation a permis la détection d'IgE chez 18 filariens à microfilarémie positive par la technique de diffusion en gélose.

Johansson et coll. (1970) ont montré que, outre l'asthme et les dermatoses atopiques, les infections parasitaires sont responsables de l'augmentation des IgE et la filariose lymphatique ne fait pas exception. L'existence de manifestations à type d'hypersensibilité immédiate a depuis longtemps été observée au cours de cette maladie. La participation d'IgE paraît donc devoir être admise dans la pathogénie de ces manifestations.

3. CONCLUSION

Chez les Mf+ indemnes d'atteintes cliniques chroniques et avant tout traitement, il existe une augmentation nette des gamma-globulines. Une étude plus fine par électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide confirme l'augmentation des globulines, mais ne permet pas la mise en évidence d'anneaux protéiniques caractéristiques chez les Mf+.

Le dosage immunologique révèle une augmentation des IgG et des IgE. La participation des IgE dans les manifestations à type d'hypersensibilité immédiate au cours de la filariose lymphatique paraît certaine. Ceci ne veut pas dire qu'elles soient seules en cause. En effet, nous avons vu qu'il existe chez les Mf+ une augmentation des IgG et il est possible qu'une fraction de ces dernières soit des anticorps anaphylactisants de type hétérocytotrophique.

RESUME

L'étude électrophorétique du sérum des filariens lymphatiques à Wuchereria bancrofti var. pacifica à microfilarémie positive, indemnes de lésions chroniques et avant tout traitement, révèle une augmentation très nette des gamma-globulines. Le dosage des immunoglobulines met en évidence l'augmentation des IgG et des IgE.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr J. Segonne, Chef du laboratoire de l'hôpital de Papeete, qui nous a fourni les sérums des sujets sains.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bonex, J & Deschiens, R. (1960) Aspects électrophorétiques des protéines du sérum sanguin dans les filarioses à Wuchereria bancrofti. Bull. Soc. Path. Exot., 53, 932-935
- Dodin, A. et col. (1965) Etude électrophorétique et immunologique du sérum de filariens à Wuchereria bancrofti avant et après traitement par la diéthylcarbazine. I. Etude électrophorétique et biologique. Bull. Soc. Path. Exot., 58, 1072-1079
- Johansson, S. G. O. et col. (1970) Some factors influencing the serum IgE levels in atopic diseases. Clin. exp. Immunol., 6, 43-47
- Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and Theory. Ann. New York Acad. Sci., 121, 321-349
- Peacock, A. C. et col. (1965) Serum protein electrophoresis in acrylamide gel: patterns from normal human subjects. Science, 147, 1451-1453
- Rowe, D. S. (1969) Radioactive single radial diffusion: a method for increasing the sensitivity of immunochemical quantitation of proteins in agar gel. Bull. Wld Hlth Org., 40, 613
- Smithies, O. & Walker, N. F. (1955) Genetic control of some serum proteins in normal humans. Nature, 176, 1265
- Wide, I. & Porath, J. (1966) Radio immuno-assay of proteins with the use of Sephadex coupled antibodies. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 130, 257