

**LES PROTÉINES SÉRIQUES  
DU FILARIEN LYMPHATIQUE  
A WUCHERERIA BANCROFTI VAR. PACIFICA.  
ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE  
ET DOSAGE IMMUNOCHIMIQUE  
DES IMMUNOGLOBULINES A, M, G ET E**

Par J. P. MOREAU (\*), G. CUZON, G. PICHON, D. OUTIN-FABRE et J. LAGRAULET  
Avec la collaboration technique de Mme N. LEPBEVRE et Mlle S. LEE SANG (\*\*)

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.

I. — Étude électrophorétique.

A. — MATÉRIELS ET MÉTHODES

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 mm<sup>3</sup> de sang. Ces sujets à microfilarémie positive (Mf+) n'avaient jamais reçu de traitement par la diéthylcarbamazine et aucun ne présentait de

(\*) Assistant des Hôpitaux des Armées.

(\*\*) Séance du 10 mai 1972

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° en 14579  
Cpte en B 165

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 infestés.

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

2. *Électrophorèse sur bande*

Le sérum a été déposé à raison de deux microlitres sur des bandes d'acétate de cellulose de format 30 × 160 mm. La migration a été effectuée dans des cuves Elphor avec du tampon veronal/veronal 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.

3. *Électrophorèse annulaire en gel de polyacrylamide*

La technique initiale de ORNSTEIN (1) 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 0/0 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 décolorés par l'Amidoschwarz. La fixation et la décoloration ont été assurées par une solution d'acide acétique à 10 0/0.

B. — 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 I). 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 0/0 chez les Mf+ et seulement 13,6 0/0 chez les Mf-. Cette différence est très hautement significative (P < 10<sup>-8</sup>).

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 —.

### C. — DISCUSSION

#### 1. Électrophorèse 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 microfaires 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 coll. (2) en 1965 à Madagascar avaient noté chez cinq filariens lymphatiques à *W. bancrofti* une augmentation relative des globulines par rapport aux moyennes observées chez les autochtones. Une étude de J. BÉNEX, R. DESCHIENS (3) 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.

#### 2. Électrophorèse 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 A. C. PEACOCK et coll. (4).

Dans la zone des post-albumines 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 et WALKER (4)) 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 immunochimique afin de préciser la nature des globulines responsables de l'augmentation des gamma globulines.

### II. — Dosage immunochimique des immunoglobulines A, M, G et E.

#### A. — MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les sérums ont été dilués selon une progression géométrique de raison 2. Pour le dosage des LgE 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 × 2,5 cm étaient coulés 2,5 ml d'une solution de gélose pure à 1,5 0/0 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 Ig A, M et G (Institut Pasteur, Paris) ou les sérums de chèvre anti If 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.

## B. — LES 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 loga-

TABLEAU I. — *Électrophorèse sur bande d'acétate 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

rithme-probit en portant en abscisses les dilutions par ordre décroissant et en ordonnées le total cumulatif des sérums. Ceci a permis de définir le taux moyen de chacune des Ig pour les deux groupes étudiés (Tableau II).

TABLEAU II. — *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 KARBEN. 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.

## C. — COMMENTAIRE

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 au 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 R. I. S. A. (radio immunosorbent assay) de WIDE et PORATH (6) ou test R. S. R. D. (radioactive single radial diffusion) de ROWE (7).

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 1.250 nanogrammes pour neuf sujets, à 2.500 pour 6, à 5.000 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.

JOHANSON et coll. (6) ont montré que outre l'asthme et les derma-

toses atopiques les infestations 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.

## 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.

## RÉSUMÉ

L'étude électrophorétique du sérum des filariens lymphatiques à *Wuchereria bancrofti* var. *pacifica* à microfilariémie 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.

## SUMMARY

The study by electrophoresis of sera of people who had a lymphatic filariasis by *Wuchereria bancrofti* var. *pacifica*, shows an incontestable increase of gamma globulins. These patients were carriers of microfilariae but had no chronic lesions and did not receive any treatments previously. The dosage of immunoglobulins reveals an increase of IgG and IgE.

Travail de la Section du Laboratoire de Biologie  
Institut de Recherches Médicales Louis-Malardé  
B. P. 30, Papeete, Polynésie française  
(Directeur, J. LAGRAULET)

REMERCIEMENTS. — Nous remercions le Docteur J. SEGONNE, Chef du Laboratoire de l'hôpital de Papeete, qui nous a fourni les sérums des sujets sains.

## RÉFÉRENCES

1. ORNSTEIN (L.). — Disc electrophoresis I. Background and Theory. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1964, 121 (2), 321-349.
2. DODIN (A.) et coll. — Étude électrophorétique et immunologique du sérum de filariens à *Wuchereria bancrofti* avant et après traitement par la diéthylcarbazine I. Étude électrophorétique et biologique. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1965, 58 (6), 1072-1079.
3. BENEX (J.) et DESCHIENS (R.). — Aspects électrophorétiques des protéines du sérum sanguin dans les filarioses à *Wuchereria bancrofti*. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1960, 53, 932, 935.
4. PEACOCK (A. C.) et coll. — Serum protein electrophoresis in acrylamide gel : patterns from normal human subjects. *Science*, 1965, 147, 1451-1453.
5. SMITHIES (O.) and WALKER (N. F.). — *Nature*, 1955, 176, 1265.
6. WIDE (L.) and PORATH (J.). — Radio immuno-assay of proteins with the use of Sephadex coupled antibodies. *Biochem. Biophys. Acta*, 1966, 130, 257.
7. ROWE (D. S.). Radioactive single radial diffusion : a method for increasing the sensitivity of immunochemical quantitation of proteins in agar gel. *Bull. Wld Hlth Org.*, 1969, 40 613.

DESCRIPTION DE *CULICOIDES PRETORIENSIS*  
ET *CULICOIDES OLYSLAGERI*, D'AFRIQUE DU SUD (\*)

Par M. KREMER et E. M. NEVILL  
[coll. tech. J. C. DELECOLLE].

Dans des captures faites au piège lumineux à Onderstepoort en décembre 1968 par l'un des auteurs, nous avons isolé parmi des espèces communes en Afrique, deux espèces nouvelles appartenant au groupe *accraensis*, et qui sont remarquables par les ailes et les hypopygiums.

Les exemplaires de cette capture constituent les types de la description.

Les paratypes de *C. pretoriensis* ont été capturés au piège lumineux à Onderstepoort, 1 ♂, 2 mars 1966 ; 3 ♂, 7 novembre 1966 ; 1 ♂, 21 novembre 1966 ; 4 ♂, décembre 1969 ; Windhoek, 1 ♂, 19 mars 1970 ; 1 ♂, 1<sup>er</sup> décembre 1970 ; Okahandja, 1 ♂, 1<sup>er</sup> janvier 1971 ; Gobabis, 1 ♂, 26 novembre 1970 ; Letaba Camp, 1 ♂, 24 janvier 1969.

Les paratypes de *C. olyslageri* ont été capturés à Wonderboom, Pretoria, trou d'arbre, 2 ♂, 14 août 1967 ; 4 ♂, 18 janvier 1968 ; Plaston, piège lumineux, 13 ♂, février 1971.

(\*) Séance du 10 mai 1972.