

# UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

\*\*\*\*\*

ECOLE INTER-ETATS DES SCIENCES ET MEDECINE VETERINAIRES  
(E.I.S.M.V.)



ANNEE: 2006

N° 10

## ANALYSE DE LA REPONSE HUMORALE CHEZ LES MANDRILLS ET RECHERCHE D'INFESTATION NATURELLE PAR LA *LOA LOA* HUMAINE CHEZ LES PRIMATES NON-HUMAINS EN SEMI-LIBERTE AU CIRMF-GABON.

### THESE

Présentée et soutenue publiquement le 05 Juillet 2006 devant la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie de Dakar pour obtenir le Grade de

**DOCTEUR EN MEDECINE VETERINAIRE**

**(DIPLOME D'ETAT)**

Par

**Patrice MAKOULOUTOU**

**Né le 15 Mars 1979 à Bongolo (GABON)**

### JURY

**Président :**

**M. Emmanuel BASSENE**

Professeur à la Faculté de Médecine, de  
Pharmacie et d'Odonto - Stomatologie de Dakar

**Rapporteur de Thèse :**

**M. Louis Joseph PANGUI**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Membres :**

**M. Justin Ayayi AKAKPO**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**M. Moussa ASSANE**

Professeur à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Directeur de thèse :**

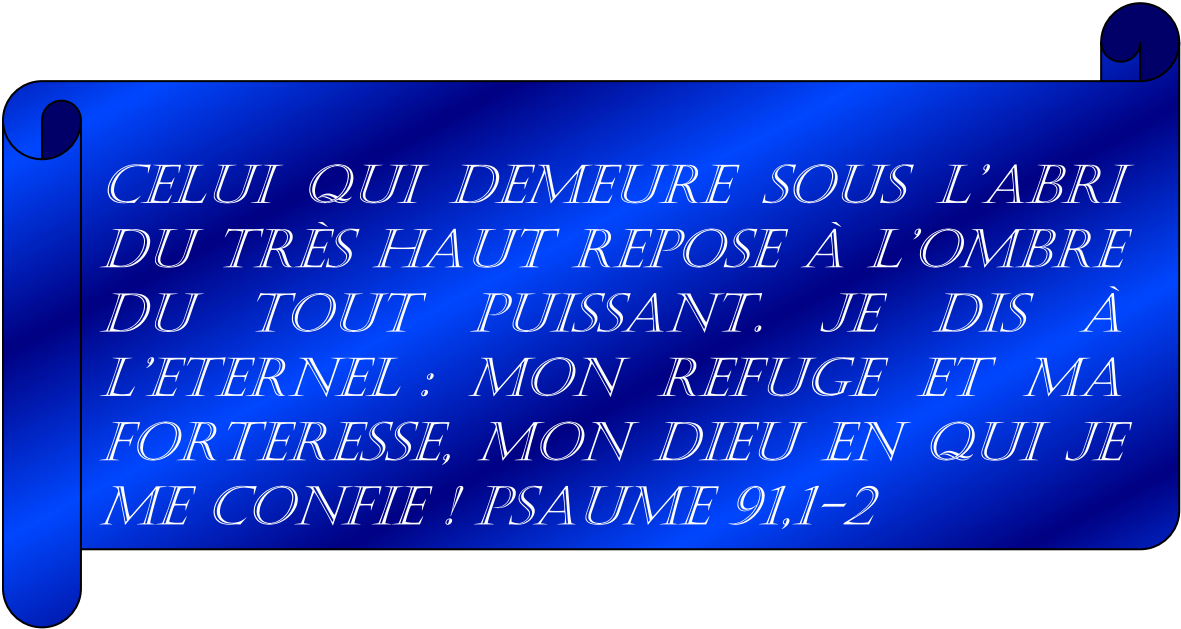
**M. Oubri Bassa GBATI**

Maître-assistant à l'E.I.S.M.V. de Dakar

**Co-Directeur de thèse :**

**M. Jean-Paul AKUE**

Docteur ès Parasitologie/Immunologie, Chercheur au CIRMF



*CELUI QUI DEMEURE SOUS L'ABRI  
DU TRÈS HAUT REPOSE À L'OMBRE  
DU TOUT PUISSANT. JE DIS À  
L'ÉTERNEL : MON REFUGE ET MA  
FORTERESSE, MON DIEU EN QUI JE  
ME CONFIE ! PSAUME 91,1-2*

# DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon Sauveur et Seigneur **Jésus-Christ de Nazareth** pour son amour incommensurable, ses bienfaits et pour avoir payé au prix de sa vie à la croix pour le salut de mon âme. Qu'il est beau de t'appartenir.

**A mes Parents** : je ne saurai trouvé les mots pour vous remercier pour ce que vous représentez pour moi et pour les énormes sacrifices consentis à mon endroit. Juste que Dieu vous bénisse.

**A Madame Marie MANGONDO** : Si tu n'avais été là je ne pense pas que ma vie serait ce qu'elle est aujourd'hui. Tu as tellement investi que je ne sais que te rendre en retour. Je prie que l'Eternel en qui nous croyons t'accorde d'être puissamment consolée. Saches que ce travail est le tien.

A « **Ya Willy** » (In memoriam): Je pensais que tu m'accompagnerais jusqu'à ce jour et j'aurais du fruit de ton investissement, malheureusement Dieu en a décidé autrement. Aujourd'hui encor je me remémore les moments passés ensemble et souffre de savoir que nous ne les aurons plus jamais. Je n'aurai donc jamais l'occasion de te remercier. Ainsi va la vie.

Au soleil qui illumine ma vie, le souffle de mon âme, le cœur de ma pensée, ma colombe et ma bien-aimée **Nidia MVANDI MAGNASSA** : trouve ici l'expression de mon amour, de la valeur de la reconnaissance de ton aide et surtout saches que tant que j'entendrai le chant du coq, je me battrais pour la concrétisation de nos projets.

A mes frères : **Paul, Gidel et Christian**

**A ma sœur Enfin** : Dieu a voulu que tu sois la seule et l'unique nous Lui sommes reconnaissants. Saches que je t'aime.

A mes filles : **Gloire, Fustene et Rita**

**Au couple BOUROBOU** : Je crois que votre joie est grande aujourd'hui puisque vos prières ont payé. Je ne saurai vous remercier assez pour tous les sacrifices consentis à mon endroit. Que Dieu vous le rende au centuple.

**A la famille MAKOSSO**

**Au Docteur Jean-Paul AKUE** : Près de vous, j'ai acquis une éducation aussi bien scientifique que morale. Ce que je suis aujourd'hui ne l'aurait été sans vous. Vous avez cru en moi et vous avez accepté de m'initier à la recherche fondamentale. Ce travail ainsi que moi-même sont le fruit de votre foi en la jeunesse. Que Dieu vous bénisse abondamment.

A Monsieur **Michel LOUNANGOU MAKOSSO**

**Au couple Valery MBONJO**

A l'assemblée du **Centre Biblique de BETSALEEL**

Au groupe **TORRENT** du Centre Biblique de BETSALEEL

Au Département éducation jeunesse du CBB

Aux jeunes des églises Béthanie de Tchibanga et de Franceville.

**A la Cellule des Gabonais Chrétiens au Sénégal**

Au Groupe Biblique Universitaire

**A mes proches : Achille, Joline, Neptune, Christian, Francis Roland, Saturnin, Bertille berthaize, Prime, Olivier, Mamouna, Loumy**

A mes amis du véto et d'ailleurs : **Berthe Amélie, Thècle, Vanessa, Ameganvi, Abdoul, Sully Smith, Gyslin, Cyprien, Firmin, BAD, Patrick NJONG, KWIN Flore, Viviane, Stella B4 Stéphane, Célio, Ya Fat, Mango, Jean Pierre, Adolphe, Djesther.**

A tous ceux qui n'ont pas été cités ici mais que je porte dans mon coeur

A tous mes Professeurs pour la qualité de l'enseignement

**Au Parrain de la 32<sup>e</sup> Promotion Colonel Vétérinaire Ndiaga GUEYE**

**A toute la 32<sup>e</sup> promotion, à notre Professeur Accompagnateur Papa EL Hassan DIOP**

Aux étudiants vétérinaires gabonais : **Lionel, Natacha, William, Barthélemy, Sandrine, Clara, Bertrand, Léonce et Stéphanie.**

A l'AEVEGA

A l'AEVD

A ma deuxième patrie le **Sénégal** pour la téranga

**A tous les jeunes de la Haute Banio (NDINDI)**

**A ma Patrie le GABON**

# REMERCIEMENTS

Ma reconnaissance va à l'endroit de :

- ☞ **Professeur Philippe BLOT**, Directeur Général du CIRMF qui a bien voulu m'accepter comme stagiaire dans l'un des services de la structure qu'il dirige où j'ai pu réaliser ce travail. Profonde gratitude.
- ☞ **Professeur Louis Joseph PANGUI**
- ☞ **Docteur Oubri Bassa GBATI**
- ☞ **Docteur Jean Paul AKUE** pour la qualité de l'encadrement, sa disponibilité, sa détermination, son dynamisme
- ☞ **Docteur Georgette Blampain AZZIBROUCK**
- ☞ **Monsieur Roger MBOU MOUTSIMBI et Hubert MOUKANA**
- ☞ **Docteur Jean Marie EKOMBA**
- ☞ **Docteur Thierry NKO'OKONO**
- ☞ **Docteur Firmin ATTIE MIEZAN**
- ☞ **Docteur Hervé VITOULEY SENA**
- ☞ **Docteur Stanly FON TEBUG**
- ☞ **Docteur Laure Rachel BEND**
- ☞ **Docteur Christel BOUOPDA**
- ☞ **Docteurs ICHAKOU**
- ☞ **Au personnel du Centre International de Recherches Médicales de Franceville**
- ☞ **Doris NKO SADI BIATCHO**
- ☞ **Christine Sandra NSE-ESSENG** pour sa disponibilité
- ☞ **Elie BADAÏ**
- ☞ **Bertrand MVE ONDO**

## A NOS MAITRES ET JUGES

### A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY

**Monsieur Emmanuel BASSENE**, Professeur à la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie de Dakar. Malgré vos multiples occupations, vous avez spontanément accepté de présider ce jury de thèse. Sincères remerciements et Hommage respectueux

### A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE

**Monsieur Louis Joseph PANGUI**, Professeur à l'EISMV de Dakar.  
Vous nous faites un grand honneur en acceptant de rapporter ce travail.  
Vos qualités humaines suscitent autour de vous confiance, sollicitude et respect. Votre simplicité et votre Humour Paternel nous ont marqué durant notre formation.  
Que Dieu vous bénisse.

### A NOTRE MAITRE ET JUGE

**Monsieur Justin Ayayi AKAKPO**, Professeur à L'EISMV de Dakar  
Vos qualités scientifiques, votre esprit critique et votre renommée font de vous une référence.  
Vous nous faites un grand honneur en participant à ce jury de thèse. Que l'Eternel Dieu vous bénisse.

### A NOTRE MAITRE ET JUGE

**Monsieur Moussa ASSANE**, Professeur à l'EISMV de Dakar  
Vos qualités scientifiques, votre goût du travail bien fait, votre dynamisme et votre sens de la communication nous ont séduits durant notre formation. Nous sommes honorés de vous compter parmi les membres de notre jury. Que Dieu vous bénisse.

### A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE

**Monsieur Oubri Bassa GBATI**, Maître Assistant à l'EISMV de Dakar  
C'est avec rigueur et dynamisme que vous avez suivi et structuré ce travail. Les moments passés avec vous nous ont permis de découvrir vos immenses qualités humaines. Que Dieu vous bénisse abondamment.

### A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE

**Monsieur Jean Paul AKUE**, Chef de l'Unité de recherche sur les filaires du CIRMF  
Vous avez initié, suivi et encadré ce travail. Depuis notre stage de troisième année vous avez pris le pari de nous encadrer et nous former. Votre rigueur, vos qualités scientifiques et votre simplicité nous ont séduits. Les mots manquent à notre vocabulaire pour vous dire merci. Que Dieu vous bénisse.

« Par délibération, la faculté et l'école ont décidé que les opinions émises dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner aucune approbation, ni improbation »

## ABREVIATIONS

**BSA** : albumine sérique bovine  
**CDP** : Centre de Primatologie  
**CIRMF** : Centre International de Recherches Médicales de Franceville  
**DEC** : diéthylcarbamazine  
**DS** : déviation standard  
**DNTP** : désoxynucléotide 5'triphosphate  
**DO** : densité optique  
**EDTA** : acide éthylène diamine triacétique  
**ha** : hectare  
**IFN- $\gamma$**  : interferon  $\gamma$   
**IFN- $\beta$**  : interferon  $\beta$   
**Ig** : immunoglobuline  
**IgG** : immunoglobuline de type G  
**IgE** : immunoglobuline de type E  
**IL** : interleukine  
**Jr**: Jour  
**kDa** : kilodalton  
**Km** : kilomètre  
**L3** : 3<sup>ème</sup> stade larvaire, larve infestante  
**mf**: microfilaire  
**ml** : millilitre  
**m** : mètre  
**NAI** : iodure de sodium  
**NaOH** : hydroxyde de sodium  
**NBT** : nitro blue tetrazolium  
**°C** : degré celsius  
**PBMC** : periphral blood mononuclear cell  
**PBS** : phosphate buffer saline  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**RPMI** : Rosa Parks Memorial Institute  
**SDS-PAGE** : sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis  
**TA**: température ambiante  
**T** : tween 20  
**TBE** : tampon tris-borate-EDTA  
**TBS** : tris buffered saline  
**TEMED** : N, N, N', N'-tetraméthylène diamine  
**TGF- $\beta$**  : transforming Growth Factor beta  
**Th1**: T helper 1  
**Th2** : T helper 2  
**TNF- $\alpha$**  : Tumour Necrosis Factor alpha  
 **$\mu$ g** : microgramme  
 **$\mu$ l**: microlitre  
 **$\mu$ m**: micromètre  
**%** : pourcentage



## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1** : Tampon TBE (10x)

**Annexe 2** : Tampon TBS (pH 7.4)

**Annexe 3** : Tampon de lavage pour ELISA et Western Blot(TBST)

**Annexe 4** : Tampon de saturation pour ELISA (TBS.T-BSA 5%)

**Annexe 5** : Tampon de dilution pour ELISA et Western Blot (TBS.T-BSA 1%)

**Annexe 6** : Tampon Carbonate pour ELISA (1x, pH 9.6)

**Annexe 7** : Tampon de Diéthanolamine pour ELISA (pH 9.6)

**Annexe 8** : Tampon de révélation à la phosphatase alcaline pour ELISA

**Annexe 9** : Solution Stock d'Acrylamide (30%)

**Annexe 10** : Gel de résolution 12,5%

**Annexe 11** : Gel de résolution 15%

**Annexe 12** : Gel de concentration (5%)

**Annexe 13** : Solution de chargement pour SDS-PAGE

**Annexe 14** : Tampon de migration de gel

**Annexe 15** : Solution de coloration de gel

**Annexe 16** : Solution de décoloration de gel

**Annexe 17** : Tampon de transfert pour Western Blot

**Annexe 18** : Tampon de révélation à la phosphatase alcaline pour Western Blot

## LISTE DES FIGURES

	<u>Pages</u>
<b><u>Figure 1</u></b> : Carte de distribution de la répartition de <i>Loa loa</i> en Afrique.....	17
<b><u>Figure 2</u></b> : Cycle de vie de <i>Loa loa</i> .....	18
<b><u>Figure 3</u></b> : Examen direct sur goutte épaisse de <i>Loa loa</i> .....	26
<b><u>Figure 4</u></b> : Examen direct des microfilaires sanguines.....	27
<b><u>Figure 5</u></b> : Cinétique des IgG spécifiques de microfilare <i>L. loa</i> chez les mandrills inoculés par différentes doses de larves <i>L3</i> .....	57
<b><u>Figure 6</u></b> : Reconnaissance des antigènes de microfilaires par un mandrill avec une infection Patente.....	58
<b><u>Figure 7</u></b> : Reconnaissance des antigènes de microfilaires dans une infection non patente....	59
<b><u>Figure 8</u></b> : Spécificité des antigènes de microfilare <i>Loa loa</i> .....	63
<b><u>Figure 9</u></b> : Cinétique de reconnaissance des antigènes de microfilaires par les mandrills Infectés.....	64

## LISTE DES PHOTOS

	<u>Pages</u>
<b><u>Photo 1</u></b> : Insecte vecteur de la <i>Loa loa</i> : le Chrysops.....	19
<b><u>Photo 2</u></b> : Œdème de Calabar siègeant sur le poignet droit.....	21
<b><u>Photo 3</u></b> : Extraction d'un ver adulte de <i>Loa loa</i> lors d'un passage oculaire.....	22
<b><u>Photo 4</u></b> : Vue aérienne du CIRMF.....	45
<b><u>Photo 5</u></b> : Vue aérienne du B4 et du CDP.....	46
<b><u>Photo 6</u></b> : <i>Mandrillus sphinx</i> dans la forêt clôturée du CDP.....	47
<b><u>Photo 7</u></b> : <i>Pan troglodytes</i> du CDP.....	48
<b><u>Photo 8</u></b> : <i>Macaca mulatta</i> du CDP en cage.....	48
<b><u>Photo 9</u></b> : <i>Macaca cynomolgus</i> du CDP en cage.....	48
<b><u>Photo 10</u></b> : <i>Cercocebus torquatus</i> du CDP en cage.....	48
<b><u>Photo 11</u></b> : <i>Cercopithecus solatus</i> du CDP dans la forêt clôturée du CDP.....	49
<b><u>Photo 12</u></b> : <i>Chlorocebus aethiops</i> du CDP en cage.....	49

## LISTE DES TABLEAUX

	<u>Pages</u>
<b><u>Tableau I</u></b> : Critères d'identification des microfilaires sanguines.....	25
<b><u>Tableau II</u></b> : Relation dose et réponse parasitologique.....	56
<b><u>Tableau III</u></b> : Résultat parasitologique chez les primates non-humains du CDP.....	60
<b><u>Tableau IV</u></b> : Résultat sérologique chez les primates non-humains du CDP.....	65

<u>SOMMAIRE</u>	<u>PAGES</u>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
<b>CHAPITRE I : Généralités sur les Filarioses humaines</b> .....	<b>5</b>
<b>I. Epidémiologie des filarioses</b> .....	<b>5</b>
<b>II. Cycle biologique des filarioses</b> .....	<b>7</b>
<b>III. Pathologie et symptomatologie filariennes</b> .....	<b>7</b>
<b>IV. Diagnostic des filarioses</b> .....	<b>9</b>
<b>V. Luttés contre le vecteur, la transmission du parasite de l’homme malade vers le vecteur et la morbidité/mortalité</b> .....	<b>11</b>
V.1. Lutte contre le vecteur.....	11
V.2. Lutte contre le passage du parasite de l’homme malade vers le vecteur .....	12
V.3. Lutte contre la morbidité/mortalité.....	13
<b>VI. Les zoonoses filariennes</b> .....	<b>13</b>
<b>CHAPITRE II : Filariose à <i>Loa loa</i></b> .....	<b>15</b>
<b>I. Généralités</b> .....	<b>15</b>
<b>II. Distribution et Cycle de vie</b> .....	<b>15</b>
II.1. Distribution.....	15
II.2. Cycle de vie .....	16
II.3. Le vecteur .....	16
<b>III. Symptomatologie, diagnostic, contrôle du vecteur et traitement</b> .....	<b>19</b>
III.1. Symptomatologie .....	19
III.1.1. Symptomatologie classique .....	19
III.1.2. Les complications .....	22
III.2. .... Diagnostic	23
III.2.1. Diagnostic direct de certitude .....	24
III.2.1.1 Mise en évidence des microfilaires.....	24
III.2.1.2 Mise en évidence des vers adultes ou macrofilaires .....	28
III.2.2. Diagnostic indirect de présomption .....	28
III.2.2.1 Hyperéosinophilie sanguine et niveaux d’IgE.....	28
III.2.2.2 Sérologie.....	28
III.2.2.3 Technique PCR.....	29
III.3. Contrôle du vecteur .....	30
III.4. Traitement .....	30
<b>IV. Existe t-il un réservoir animal de <i>Loa loa</i> ?</b> .....	<b>32</b>
<b>V. Quelques modèles expérimentaux pour la loase à <i>Loa loa</i></b> .....	<b>33</b>

<b>CHAPITRE III : Les réponses immunitaires dans les filarioses .....</b>	<b>35</b>
<b>I. Traits généraux de la réponse immunitaire .....</b>	<b>35</b>
<b>II. La réponse immune cellulaire.....</b>	<b>36</b>
<b>III. Les réponses humorales contre les infections filariennes : les anticorps .....</b>	<b>39</b>
<b>IV. Génomique et réponse immunitaire dans les filarioses. ....</b>	<b>41</b>
<b>V. La réponse immunitaire des primates non-humains à la filariose .....</b>	<b>42</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE I : Matériel et méthodes .....</b>	<b>44</b>
<b>I. Présentation du cadre d'étude.....</b>	<b>44</b>
<b>II. Matériel.....</b>	<b>47</b>
II.1. Sujets étudiés .....	47
II.1.1. Les mandrills ( <i>Mandrillus sphinx</i> ) .....	47
II.1.2. Les autres primates .....	47
II.2. Collecte des sérums des Primates .....	49
II.3. Collecte de différents stades parasitaires de <i>L. loa</i> .....	50
<b>III. Méthodologie.....</b>	<b>50</b>
III.1. Technique d'inoculation des mandrills.....	50
III.2. Mise en évidence de microfilaires dans le sang.....	51
III.2.1. L'examen direct.....	51
III.2.2. La leucoconcentration.....	51
III.3. Préparation des antigènes parasitaires bruts .....	51
III.4. Dosage des protéines .....	52
III.5. Technique Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	52
III.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	53
III.7. Western Blot.....	53
III.8. Analyse statistique des données .....	54
<b>CHAPITRE II : Résultats .....</b>	<b>55</b>
<b>I. Etudes de la réponse immunitaire dans le model <i>Mandrill sphinx/L. loa</i> .....</b>	<b>55</b>
I.1. La recherche des microfilaires .....	55
I.2. Analyse quantitative par ELISA de la réponse humorale.....	56
I.3. Analyse qualitative par Western blot .....	58
<b>II. Recherche des infections naturelles par la <i>Loa loa</i> humaine chez les primates non-humains du CDP..</b>	<b>60</b>
II.1. Recherche de la filaire <i>L. loa</i> à l'examen parasitologique direct.....	60
II.2. Caractérisation de deux méthodes sérologiques de diagnostic de <i>Loa loa</i> chez les primates.....	61
II.2.1. Caractérisation de deux méthodes sérologiques de diagnostic de <i>Loa loa</i> chez les primates . <b>Erreur ! Signet non défini.</b>	
II.2.1.1. La méthode ELISA .....	61
II.2.1.2. Deuxième méthode : le Western blot.....	62

II.3. Prévalence des Anticorps anti loa loa chez les primates non-humains du CDP .....	65
<b>CHAPITRE III : Discussion .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>74</b>

## RESUME

<b>DEDICACES</b> .....	iii
A mes frères : Paul, Gidel et Christian.....	iii
A mes filles : Gloire, Fustene et Rita .....	iii
A la famille MAKOSSO .....	iii
A Monsieur Michel LOUNANGOU MAKOSSO .....	iii
Au couple Valery MBONJO .....	iii
A l'assemblée du Centre Biblique de BETSALEEL .....	iv
Au groupe TORRENT du Centre Biblique de BETSALEEL.....	iv
Au Département éducation jeunesse du CBB.....	iv
Aux jeunes des églises Béthanie de Tchibanga et de Franceville. ....	iv
A la Cellule des Gabonais Chrétiens au Sénégal .....	iv
Au Groupe Biblique Universitaire.....	iv
A tous ceux qui n'ont pas été cités ici mais que je porte dans mon coeur .....	iv
A tous mes Professeurs pour la qualité de l'enseignement .....	iv
Au Parrain de la 32 <sup>e</sup> Promotion Colonel Vétérinaire Ndiaga GUEYE .....	iv
A toute la 32 <sup>e</sup> promotion, à notre Professeur Accompagnateur Papa EL Hassan DIOP.....	iv
A l'AEVEGA.....	iv
A l'AEVD.....	iv
A ma deuxième patrie le Sénégal pour la téranga.....	iv
A tous les jeunes de la Haute Banio (NDINDI).....	iv
A ma Patrie le GABON .....	iv
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	v
<b>A NOS MAITRES ET JUGES</b> .....	vi
A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DU JURY .....	vi
A NOTRE MAITRE ET RAPPORTEUR DE THESE.....	vi
A NOTRE MAITRE ET JUGE .....	vi
Monsieur Justin Ayayi AKAKPO, Professeur à L'EISMV de Dakar.....	vi

<b>A NOTRE MAITRE ET JUGE .....</b>	<b>vi</b>
<b>Monsieur Moussa ASSANE, Professeur à l'EISMV de Dakar .....</b>	<b>vi</b>
<b>A NOTRE MAITRE ET DIRECTEUR DE THESE .....</b>	<b>vi</b>
<b>Monsieur Oubri Bassa GBATI, Maître Assistant à l'EISMV de Dakar .....</b>	<b>vi</b>
<b>A NOTRE MAITRE ET CO-DIRECTEUR DE THESE .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>xv</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>4</b>
<b>CHAPITRE I : Généralités sur les Filarioses humaines .....</b>	<b>5</b>
<b>I. Epidémiologie des filarioses.....</b>	<b>5</b>
<b>II. Cycle biologique des filarioses .....</b>	<b>7</b>
<b>III. Pathologie et symptomatologie filariennes .....</b>	<b>7</b>
<b>IV. Diagnostic des filarioses .....</b>	<b>9</b>
<b>V. Luttés contre le vecteur, la transmission du parasite de l'homme malade .....</b>	<b>11</b>
<b>vers le vecteur et la morbidité/mortalité .....</b>	<b>11</b>
V.1. Lutte contre le vecteur.....	11
V.2. Lutte contre le passage du parasite de l'homme malade vers le vecteur .....	12
V.3. Lutte contre la morbidité/mortalité.....	13
<b>VI. Les zoonoses filariennes .....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE II : Filariose à <i>Loa loa</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>I. Généralités .....</b>	<b>15</b>
<b>II. Distribution et Cycle de vie .....</b>	<b>15</b>
II.1. Distribution.....	15
II.2. Cycle de vie .....	16
II.3. Le vecteur .....	16
<b>III. Symptomatologie, diagnostic, contrôle du vecteur et traitement .....</b>	<b>19</b>
III.1. Symptomatologie .....	19
III.1.1. Symptomatologie classique .....	19
III.1.2. Les complications .....	22
III.2. Diagnostic .....	23
III.2.1. Diagnostic direct de certitude .....	24
III.2.1.1 Mise en évidence des microfilaires.....	24
III.2.1.2 Mise en évidence des vers adultes ou macrofilaires .....	28
III.2.2. Diagnostic indirect de présomption .....	28
III.2.2.1 Hyperéosinophilie sanguine et niveaux d'IgE .....	28
III.2.2.2 Sérologie.....	28



III.2.2.3 Technique PCR.....	29
III.3. Contrôle du vecteur .....	30
III.4. Traitement .....	30
<b>IV. Existe t-il un réservoir animal de <i>Loa loa</i> ?.....</b>	<b>32</b>
<b>V. Quelques modèles expérimentaux pour la loase à <i>Loa loa</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>CHAPITRE III : Les réponses immunitaires dans les .....</b>	<b>35</b>
<b>filarioses.....</b>	<b>35</b>
<b>I. Traits généraux de la réponse immunitaire .....</b>	<b>35</b>
<b>II. La réponse immune cellulaire.....</b>	<b>36</b>
<b>III. Les réponses humorales contre les infections filariennes : les anticorps .....</b>	<b>39</b>
<b>IV. Génomique et réponse immunitaire dans les filarioses. ....</b>	<b>41</b>
<b>V. La réponse immunitaire des primates non-humains à la filariose .....</b>	<b>42</b>
<b>DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>43</b>
<b>CHAPITRE I : Matériel et méthodes .....</b>	<b>44</b>
<b>I. Présentation du cadre d'étude.....</b>	<b>44</b>
<b>II. Matériel.....</b>	<b>47</b>
II.1. Sujets étudiés .....	47
II.1.1. Les mandrills ( <i>Mandrillus sphinx</i> ).....	47
II.1.2. Les autres primates .....	47
II.2. Collecte des sérums des Primates .....	49
II.3. Collecte de différents stades parasitaires de <i>L. loa</i> .....	50
<b>III. Méthodologie.....</b>	<b>50</b>
III.1. Technique d'inoculation des mandrills.....	50
III.2. Mise en évidence de microfilaires dans le sang.....	51
III.2.1. L'examen direct.....	51
III.2.2. La leucoconcentration.....	51
III.3. Préparation des antigènes parasitaires bruts .....	51
III.4. Dosage des protéines .....	52
III.5. Technique Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) .....	52
III.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	53
III.7. Western Blot.....	53
III.8. Analyse statistique des données .....	54
<b>CHAPITRE II : Résultats.....</b>	<b>55</b>
<b>I. Etudes de la réponse immunitaire dans le model <i>Mandrill sphinx/L. loa</i> .....</b>	<b>55</b>
I.1. La recherche des microfilaires .....	55

I.2. Analyse quantitative par ELISA de la réponse humorale.....	56
I.3. Analyse qualitative par Western blot .....	58
<b>II. Recherche des infections naturelles par la <i>Loa loa</i> humaine chez les.....</b>	<b>60</b>
<b>primates non-humains du CDP.....</b>	<b>60</b>
II.1. Recherche de la filaire <i>L. loa</i> à l'examen parasitologique direct.....	60
II.2. Caractérisation de deux méthodes sérologiques de diagnostic de.....	61
Loa loa chez les primates .....	61
II.2.1. La méthode ELISA .....	61
II.2.2. Deuxième méthode : le Western blot.....	62
II.3. Prévalence des Anticorps anti loa loa chez les primates non-humains du CDP .....	65
<b>CHAPITRE III : Discussion .....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>71</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>74</b>

## Introduction

La filariose à *Loa loa* est une helminthiase cutanéomuqueuse du fait de la localisation des vers adultes sous la peau et sanguicole (séjour dans le sang des microfilaires). Elle infecte une population estimée à plus de trois millions (3 000 000) en Afrique (**GENTILLINI et DUFLO, 1982**). Il existe aussi une espèce de *Loa simienne* qui infecte *Mandrillus leucophaeus* et *Mandrillus sphinx*. Chez l'homme, la *Loa loa* provoque des oedèmes de Calabar, prurits, douleurs articulaires, inflammation de la conjonctive oculaire lors du passage des vers adultes *Loa loa*. Dans les cas graves, des atteintes rénales, cardiaques peuvent être observées (**ANDY et al., 1981**). Il n'existe que deux (2) médicaments utilisés dans le traitement de la loase : L'ivermectine et la Diethylcarbamazine (DEC) (**OTTESEN et al., 1990**). Cependant, les deux médicaments ne sont surtout actifs que sur les microfilaires et non sur les vers adultes. De plus, l'usage de ces médicaments a révélé dans plusieurs cas des effets secondaires graves tel que l'encéphalite mortelle, une hémorragie dans la conjonctive oculaire. Or l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) envisage l'éradication des filarioses à l'aide de ces deux médicaments. Il devient donc important de comprendre les mécanismes qui aboutissent à l'encéphalite si l'on veut installer une chimiothérapie de masse.

La pathogenèse des encéphalites à *Loa loa* est mal connue (**BOULESTEIX et CARME, 1986**) quoiqu'il ait été démontré que c'est surtout les densités élevées de microfilaires qui provoquent l'encéphalite à *Loa loa*. *Mandrillus sphinx* pourrait constituer un bon modèle d'étude à ce sujet d'autant qu'il est l'hôte de la forme nocturne de *Loa loa* et qu'il a été infecté expérimentalement avec succès par la *Loa loa* humaine. Il a été aussi démontré que l'ablation de la rate pourrait entraîner l'augmentation des densités (>50 000 mf/ml) de microfilaires chez le *mandrill* (**ORIHÉL et EBERHARD, 1985**) comme celles observées chez les hommes susceptibles de développer une encéphalite. De plus l'espèce humaine diurne et l'espèce animale nocturne peuvent s'hybrider chez un hôte simien (**DUKE, 1964**). Bien que les vecteurs de l'espèce humaine (*Chrysops silacea*, *C. dimitiata*) soient

différents de ceux de l'espèce simienne (*C. langi*, *C. centurionis*), il reste cependant concevable que l'homme puisse être infecté par l'espèce simienne ou un hybride, ce qui expliquerait les différences de réaction lors du traitement par la DEC ou l'ivermectine. La question d'un réservoir animal de *Loa loa* reste donc entière, de plus la plupart des primates sont protégés. Or la pression exercée sur leur habitat naturel par l'homme pour des raisons économiques et les impératifs de conservation de la nature impose que l'on s'intéresse à leur santé. Des marqueurs sérologiques capables de détecter une infection par la *Loa loa* sont donc nécessaires pour élucider certains points. De plus c'est dans les modèles animaux de filaire que l'existence d'une immunité protectrice a été clairement démontrée à l'aide de larves irradiées (**AKUE et al., 2003**). Les modèles expérimentaux présentent en plus l'avantage d'être contrôlés du début à la fin contrairement aux infections humaines où ni la date exacte de l'infection, ni le nombre de larves reçues par l'hôte humain, encore moins la durée de l'infection ne sont déterminés. Tout cela rend l'interprétation des résultats sérologiques difficiles chez l'homme.

La recherche d'une infection par examen microscopique bien que spécifique reste peu sensible pour la loase. L'identification de marqueurs sérologiques de la *L. loa* chez les primates est préconisée afin de poser un diagnostic spécifique de cette parasitose chez les primates. La mise en évidence d'une transmission naturelle de *L. loa* chez les primates aurait des conséquences sur la notion de réservoir naturel (zoonose), les programmes de lutte contre cette filaire et la politique de conservation de ces espèces de primates.

Il résulte donc de nos travaux les objectifs spécifiques suivants :

1. mesurer la quantité d'IgG spécifiques pendant et après une infection par la *Loa loa* chez les *Mandrills* infectés expérimentalement par différentes quantités de vers adultes ou larves infestantes (L3) ;
2. identifier les différents antigènes reconnus par les IgG au cours d'une infection dans une étude longitudinale ;

3. rechercher les infections naturelles par la *Loa loa* humaine chez les primates non-humains du Centre de Primatologie.

Pour ce faire, nous avons présenté dans une première partie, une revue bibliographique portant sur les filarioses humaines. Dans cette partie, nous avons évoqué dans un premier chapitre les généralités sur les filarioses humaines. Le second chapitre sur la synthèse bibliographique traite de la filariose à *Loa loa*. Le troisième chapitre de cette partie est consacré à la connaissance des réponses immunitaires dans les filarioses.

La deuxième partie intitulée « étude expérimentale » est consacrée à la présentation des protocoles de travail utilisés. Les résultats qui en découlent sont discutés.

## **PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# CHAPITRE I : Généralités sur les Filarioses humaines

## I. Epidémiologie des filarioses

Les filarioses sont des parasitoses endémiques dans les zones tropicales. Elles sont dues à des vers ronds ou nématodes vivipares : les filaires en raison de leur taille et leur forme qui font penser à un fil. Elles ont en commun : des réactions sérologiques de groupe et une sensibilité à la Diéthylcarbamazine (DEC), mais avec une symptomatologie propre à chaque filariose, un hôte intermédiaire spécifique et une distribution géographique particulière (AUBRY, 2005). A ce jour, on compte neuf (9) espèces filariennes infectant l'homme : *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Brugia timori*, *Onchocerca volvulus*, *Monsonella streptocerca*, *Monsonella perstans*, *Monsonella ozzardi*, *Monsonella rodhaini*. Selon la localisation des vers adultes chez l'hôte humain, on distingue : les filaires lymphatiques (*W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. timori*), les filaires cutané-dermiques (*L. loa*, *O. volvulus*) et les filaires des séreuses (*M. perstans*, *M. streptocerca*, *M. ozzardi*) (GENTILLINI et al, 1982). Sur 3,3 milliards de personnes exposées au risque d'infection, environ 300 millions dans le monde en sont atteints (OMS, 1984). Chez deux espèces, *W. bancrofti* et *B. malayi*, les vers adultes vivent dans les vaisseaux et ganglions lymphatiques de l'hôte humain. Les microfilaires dans l'ensemble, circulent dans le sang la nuit et stagnent dans les organes profonds le jour. Les vers adultes de *L. loa* vivent dans le derme, tandis que les microfilaires vivent dans le sang. Les microfilaires de l'espèce *O. volvulus* ne quittent pas le derme et les vers adultes vivent dans le derme, libres ou pelotonnés dans des nodules fibreux, alors que les microfilaires libérées dans les nodules circulent dans les vaisseaux lymphatiques et le tissu sous cutané, sans périodicité particulière. Pour les espèces *M. perstans* et *M. ozzardi*, les microfilaires circulent dans le sang, tandis que les microfilaires de *M. streptocerca* circulent dans le suc dermique.

Sur le plan de la répartition géographique :

- ❖ la loase à *L. loa* se rencontre dans les régions forestières de l'Afrique équatoriale

- ❖ les Brugiases à *Brugia sp.* sévissent essentiellement en Inde, Chine et en Asie du Sud
- ❖ les Wuchererioses à *W. bancrofti* se trouvent essentiellement en Asie, en Afrique et dans le pacifique oriental
- ❖ l'Onchocercose à *O. volvulus* réside surtout en Afrique occidentale, Amérique centrale, Nord de l'Amérique du sud et ponctuellement au Yémen
- ❖ les Mansonelloses à *M. perstans* en Afrique occidentale, au Nord de l'Amérique centrale et du Sud
- ❖ les mansonelloses à *M. ozzardi* sont localisées en Amérique centrale et du Sud, et les mansonelloses à *M. streptocerca* en Afrique centrale (OMS, 1992).

Au Gabon, cinq (5) espèces de filaires ont été identifiées chez l'homme : *Loa loa* (RICHARD-LENOBLE et KOMBILA, 1979), *Onchocerca volvulus* (RICHARD-LENOBLE et al, 1983), *Monsonella perstans* (RICHARD-LENOBLE et al, 1980b) ; *Monsonella streptocerca* et *Monsonella rodhaini* (RICHARD-LENOBLE et al, 1988b).

Les filaires du genre *Monsonella* sont très peu ou pas pathogènes pour l'homme. Par contre *O. volvulus* et *L. loa* sévissent de manière endémique et posent de graves problèmes au niveau socio-économique et donc, sont des paramètres importants en santé publique dans les populations atteintes.

La transmission de ces filaires à l'hôte humain n'est jamais directe mais requiert le passage par différents hôtes vecteurs que sont des insectes piqueurs ou suceurs.

- ❖ Chez *W. bancrofti* et *B. malayi*, l'affection est transmise par la piqûre d'un moustique vecteur infecté (*Culex*, *Anophèle*, *Aedes*, *Mansonia*)
- ❖ Les mouches vectrices dans la transmission de l'*O. volvulus* sont des simulies
- ❖ Chez *L. loa*, l'insecte vecteur est *Chrysops*
- ❖ Le vecteur chez *Monsonella* est *Culicoïdes*



Tous ces vecteurs sont des hôtes intermédiaires chez lesquels s'effectue une partie du cycle parasitaire. L'être humain en est l'hôte définitif.

Les filaires femelles sont vivipares et donnent naissance directement à des larves. Seuls les vers adultes femelles sont hémato-phages, car ils trouvent dans le sang des substances essentielles pour le développement de l'œuf.

## **II. Cycle biologique des filarioses**

L'insecte suceur ou piqueur s'infecte en ingérant au cours d'un repas sanguin, les microfilaries d'un être humain parasité. Les microfilaries poursuivent leur développement chez l'insecte grâce à une série de transformations ou mues. Elles acquièrent ainsi leur pouvoir infestant sous forme de L3 qui migrent vers les pièces buccales du vecteur et sont ainsi susceptibles d'être transmis à un nouvel hôte (définitif) lors d'un prochain repas sanguin. Les larves L3 subissent alors chez l'hôte humain, d'autres mues pour évoluer vers le stade adulte. Les adultes mâles et femelles s'accouplent et ces femelles donnent naissance à de nouvelles générations de microfilaries. La production de ces microfilaries marque la boucle complète de cycle. Les filaires adultes ont une durée de vie longue chez l'hôte humain (10-15 ans en moyenne).

## **III. Pathologie et symptomatologie filariennes**

Les infections filariennes sont plus morbides que directement mortelles. Elles peuvent être responsables de graves infirmités et d'une nuisance considérable, allant des simples prurits à la cécité en passant par des oedèmes allergiques et des lésions cutanées diverses.

Les manifestations sont étendues :

- ❖ pour les filaires lymphatiques : la phase aiguë se traduit par l'occlusion partielle ou totale de la circulation dans les vaisseaux lymphatiques et les ganglions. Il s'agit généralement d'inflammations (Lymphangites aiguës) accompagnées ou

non de fièvres épisodiques nocturnes, d'oedèmes douloureux, de lymphangites des membres à développement centrifuge et récidivant associés à des adénites satellites (Adénolymphangites). L'Etat chronique se traduit par l'hypertrophie cutanée, la stagnation lymphatique qui provoque les hydrocèles et finalement l'éléphantiasis du scrotum, du pénis ou des membres inférieurs, supérieurs et les varices lymphatiques ou lymphangiectasies (**GENTILLINI, 1981**). La présence de microfilaires dans les capillaires pulmonaires provoque parfois des manifestations asthmatiformes.

- ❖ pour l'onchocercose, les symptômes cliniques se répartissent en 3 syndromes :
  - ✦ le syndrome cutané avec des dermatites, des lésions cutanées prurigineuses aiguës ou chroniques (gale filarienne) tels que les prurits dus à la présence des microfilaires dermiques ;
  - ✦ le syndrome nodulaire : les vers adultes vivent soit libres sous la peau ou enfermés dans les nodules fibreux sous le derme, et provoquent des onchocercomes indolores ;
  - ✦ le syndrome oculaire : la migration des microfilaires vers la chambre antérieure de l'œil à travers la cornée entraîne la formation de kératites et l'atteinte de la chambre postérieure provoquant des lésions pouvant évoluer vers la cécité d'où le nom de « cécité des rivières » ;
  - ✦ le « Sowda » est une forme particulière des onchocercoses qui sévissent au Yémen. L'onchodermatite-Sowda est une onchodermatose localisée, unilatérale, hyperactive, et prurigineuse. Elle associe des lésions de grattage de l'œdème et des aspects croûteux de surinfection sur une peau présentant souvent des zones pigmentées et des pachydermies ;
  
- ❖ pour la *L. loa* : Présence de prurits généralisés, d'oedèmes allergiques fugaces et migratoires (dits de Calabar) siégeant sur les membres supérieurs et paupières, reptation sous-cutanée du ver adulte (1 cm/heure), passage du ver

#### IV. Diagnostic des filarioses

Le diagnostic des filarioses est avant tout fondé sur la reconnaissance des signes cliniques caractéristiques de l'espèce et sur l'examen microscopique permettant la mise en évidence des microfilaires dans le sang veineux périphérique (*L. loa*, *W. bancrofti*, et *M. perstans*), par des biopsies cutanées exsangues (*M. streptocerca* et *O. volvulus*), ou dans la chambre antérieure de l'œil (*M. streptocerca*). Ce diagnostic direct et spécifique est insuffisant. Il ne permet pas de déceler les formes de filarioses occultes fréquemment rencontrées en zone d'endémie filarienne.

Pour une proportion élevée de patients dits amicrofilarémiques, la sérologie prend alors toute son importance par la mise en évidence d'anticorps sériques ou d'antigènes circulants. En effet, il existe communément deux (2) catégories de test sérologique pour le diagnostic indirect des filarioses basé soit sur la recherche d'antigène, soit sur la recherche d'anticorps.

- ❖ Le test basé sur la recherche d'antigène circulant par la confrontation à un anticorps monoclonal fixé sur un support solide. Ces tests sont peu quantitatifs et révèlent la présence d'une infection active. Il existe par exemple deux tests ELISA qui ont été développés. Ils détectent la présence d'antigènes sériques des vers adultes de *W. bancrofti*. Parmi ces tests ELISA, il y'a l'anticorps monoclonal IgG Og4C3 identifié par **MORE** et **COPERMAN (1990)** et qui est dirigé contre un ver adulte d'*O. gibsoni*, une filaire animale. Un autre anticorps monoclonal (AD12) dirigé contre l'antigène de ver adulte de *Dirofilaria immitis*, filaire canine (**WEIL, 1987b**), donne des résultats équivalents à **Og4C3** pour la détection de *W. bancrofti* (**CHANTEAU et al., 1994**). Le test le

plus récent (ICT diagnostic Australie) est un test individuel par immunochromatographie qui utilise une carte sur laquelle est fixé l'anticorps monoclonal (AD12) pré-marqué à l'or colloïdal. Cela permet de détecter les antigènes circulants de *W. bancrofti* dans le sang ou dans le sérum des individus **(WEIL et al., 1987a)**. La stabilité et la sensibilité de ces tests sont excellentes puisqu'ils détectent plus de 99% des individus porteurs de microfilaries et en font une arme efficace dans l'évaluation du niveau d'endémie et le contrôle des programmes de lutte. Des études ont montré que 20 à 40% des individus amicrofilarémiques ont des antigènes circulants, donc susceptibles d'abriter des vers adultes avec ou sans microfilaries **(WEIL et al., 1987a)**.

- ❖ Les tests basés sur la détection des anticorps dans le sérum des individus reposent sur la détection d'anticorps sécrétés par l'hôte, à l'aide d'antigènes fixés sur un support solide. Ces antigènes peuvent être homologues, hétérologues excrétés ou sécrétés. Ces tests peuvent être quantitatifs (ELISA) ou qualitatifs (Western Blot, Co-Electrosynérèse et Immunofluorescence indirect). Cependant, leur interprétation pose un problème dans la mesure où les anticorps résiduels peuvent être détectés longtemps après une infection. Par conséquent, il est difficile de dire à partir de ces tests si une infection est active ou passive. De plus les réactions croisées entre nématodes rendent l'interprétation des résultats délicate sauf si des arcs spécifiques correspondants aux complexes Antigènes Anticorps sont identifiés (Co-ES). Les IgG4 ont été décrits comme marqueurs de l'infection active filarienne, dans les cas des filarioses lymphatiques **(LAI et OTTESEN, 1983)**, de l'onchocercose **(LUCIUS et al., 1992)** et de la loase **(AKUE et al., 1994)**.

Aujourd'hui, de nombreuses études en cours tendent à améliorer la sensibilité des techniques et la spécificité par une meilleure connaissance et par l'extraction de fractions antigéniques validées. Certaines d'entre elles font appel à des antigènes recombinants **(LUCIUS et al., 1992)**.

Des tests PCR basés sur la détection de l'ADN circulant spécifique à chaque espèce de filaire ont été développés pour *B. malayi* (LIZOTTE et al., 1994), *W. bancrofti* (ZHONG et al., 1996), *O. volvulus* (ZIMMERMAN et al., 1994) ; et dans la loase le test 15r3-PCR développé par TOURE et al. (1997).

## **V. Lutttes contre le vecteur, la transmission du parasite de l'homme malade vers le vecteur et la morbidité/mortalité**

### **V.1. Lutte contre le vecteur**

Il n'y a pas eu de programme de lutte anti vectorielle propre à la filariose mais des programmes surtout contre les vecteurs du paludisme et de la trypanosomiase.

Le premier grand programme de lutte contre une filariose, l'onchocercose en Afrique de l'Ouest (OCP), a été lancé en 1974. Ce programme décidé par l'OMS avec la participation de 11 pays, avait dans sa première phase une mission de lutte contre les vecteurs par l'usage abondant d'insecticides le long des rivières et l'épandage aérien de larvicides sur les gîtes larvaires. Dans le cas de la filariose lymphatique, le contrôle des vecteurs consiste en l'utilisation des insecticides d'origine biologique, adaptés au traitement des cours d'eau à débit rapide, *Bacillus phaericus* ( empêchant les larves de s'oxygéner ), *Bacillus thuringiensis* H-14 avaient été utilisés (OMS, 1992). La suppression des eaux stagnantes constitue aussi un moyen de lutte.

La limitation de la transmission des filaires pourrait consister en la protection individuelle contre les piqûres des vecteurs simulies, moustiques et des mouches, grâce à un port de vêtements protecteurs recouvrant tout le corps, à l'utilisation des répulsifs et à un environnement corrigé. A cela, on peut ajouter une lutte passive et l'emploi des moustiquaires imprégnées d'insecticides.

## V.2. Lutte contre le passage du parasite de l'homme malade vers le vecteur

Elle est essentiellement basée sur la chimie antiparasitaire. Celle-ci a été dominée par la DEC (Notézine<sup>ND</sup>) dont les effets microfilaricides sur plusieurs types de filaires ont été prouvés (**HEWITT et al., 1947**). Par contre elle n'a pas que peu d'effet en courte cure sur l'adulte *d'O. volvulus* (**HAWKING, 1979**), sur celui de *L. loa* (**RICHARD-LENOBLE et al., 1988**). D'autre part, le traitement par la DEC, microfilaricide d'action rapide peut entraîner des effets secondaires graves dont un risque d'encéphalite lors du traitement de la loase chez les forts porteurs de microfilaires sanguines (**BOULESTEIX et CARME, 1986**) et de l'onchocercose (**MAZOTTI, 1948**).

En 1988, la deuxième phase du programme OCP consistait en un traitement de masse de l'onchocercose par l'Ivermectine (**MECTISAN<sup>ND</sup>**). A cause du succès remarquable de l'OCP, du point de vue santé, économie et développement, un deuxième programme de lutte contre l'onchocercose a été lancé en 1995. Ce programme africain de lutte contre l'onchocercose, appelé APOC (African Program for Onchocerciasis Control) a pour but de mettre en place sur une période de 12 ans des systèmes durables de distribution d'ivermectine à grande échelle sous directive communautaire. Ce programme couvre 19 pays ne faisant pas partie de l'OCP.

L'ivermectine (**MECTISAN<sup>ND</sup>**) s'est avéré être un bon microfilaricide avec une bonne tolérance chez les patients, en prévenant des lésions cutanées et sans effets secondaires notables (**OTTESEN et CAMPBELL, 1994**). De plus, de nombreuses études ont montré l'efficacité et la tolérance de l'ivermectine notamment contre l'onchocercose (**AWADZI et al., 1986**) et contre la filariose de Bancroft (**OTTESEN et al., 1990**). Pour la *Loa loa*, **RICHARD-LENOBLE et al. (1988)** ont montré une réduction de 88% de la densité de microfilaires. Plus tard, **CHIPPAUX et al. (1998)** signalent plusieurs cas d'effets secondaires graves chez les patients forts porteurs de microfilaires *L. loa*, après traitement par l'ivermectine au cours de campagne de distribution de masse au Cameroun.

Les stratégies recommandées par l'OMS dans le cadre de l'élimination de la filariose lymphatique, actuellement basées sur le traitement de masse de l'ensemble de la communauté humaine d'une zone de transmission (**OTTESEN et al., 1997**) sont les suivantes : un traitement annuel constitué soit d'une bithérapie associant ivermectine et DEC ou ivermectine et albendazole, soit d'une monothérapie avec la DEC seule. Un autre schéma communautaire a déjà été utilisé avec efficacité : c'est l'utilisation pendant 6-12 mois du sel de table contenant de la DEC (**GELBAND, 1994**).

### **V.3. Lutte contre la morbidité/mortalité**

Dans le cas de la filariose lymphatique, pour améliorer la qualité de vie des sujets atteints de la forme chronique de la maladie (éléphantiasis ou hydrocèle), la détérioration régulière des régions atteintes et leur traitement par des brossages et l'utilisation fréquente de pommade à base d'antibiotiques peuvent réduire considérablement la surinfection de la peau et, du même coup, limiter l'étendue des lésions lymphatiques éléphantiasiques.

## **VI. Les zoonoses filariennes**

Quelques filaires transmises de l'homme à l'animal et de l'animal à l'homme ont été désignées sous le nom de filaire zoonotique. En effet, lorsqu'un réservoir animal existe, cela rend difficile les programmes de contrôle et de lutte contre les filarioses. Plusieurs cas de zoonoses ont été rapportés en Afrique, en Amérique, en Europe, en Asie et en Australie (**DISSANAIKE, 1979**). Parmi eux, *Dirofilaria immitis*, qui a pour hôte naturel les carnivores (chien et chat), infecte aussi l'homme ; *Brugia malayi*, avec pour hôtes naturels les carnivores et les singes passe vers l'homme et vice-versa. Quant à *Monsonella rodhaini*, filaire spécifique du chimpanzé, elle a été découverte pour la première fois chez l'homme au cours d'une enquête épidémiologique faite au Gabon (**BRUMPT, 1904**).

Malgré l'existence de quelques infections zoonotiques, le passage des parasites filariens humains dans les modèles expérimentaux de laboratoire reste cependant

difficile. Toutefois, à partir de ces zoonoses on peut développer des modèles en laboratoire pour comprendre les caractéristiques de l'infection filarienne et les processus immunologiques qui en découlent.

C'est dans cette optique que **DUKE et al. (1960)** ont pour la première fois, utilisé l'espèce mandrill (*Mandrillus leucophaeus*) pour reproduire le cycle de la *L. loa* humaine. De même, *Ancanthocheilonema vitae* a été expérimentalement adapté dans son hôte naturel au laboratoire, le merione (*Merione libycus*) par **WORMS et al. (1961)**. **WONG et al. (1974)** ont utilisé *D. immitis* dans son hôte naturel, le chien. **OOTHUMAN et al. (1979)** et **DENHAN et al. (1983)** ont utilisé *B. pahangi* dans son hôte, le chat pour des études immunologiques et de chimiothérapie. Mis à part le parasite *Brugia*, la gestion du réservoir animal de parasites est peu prise en considération dans les programmes de lutte contre les endémies filariennes humaines.



## **CHAPITRE II : Filariose à *Loa loa***

### **I. Généralités**

La filaire *Loa loa*, est le parasite agent de la loase qui a été pour la première fois observée et extraite de l'œil d'une esclave africaine sur l'île de Saint-Domingue par **MONGIN (1770)**. En 1864, **GUYON** retrouva ce ver au Gabon. Ce n'est qu'en 1904 que cette maladie a été décrite en détail en Afrique (**BRUMPT, 1904**). Bien que découverte aux Antilles, cette maladie n'existe qu'en Afrique (**GENTILLINI et DUFLO, 1982**). La filariose à *L. loa* est une helminthiase cutanéomuqueuse du fait de la localisation des vers adultes sous la peau et sanguicole (séjour dans le sang des microfilaires) (**FAIN, 1969**). Près de 3 millions d'individus vivant dans les zones endémiques sont infectés par *L. loa* (**FAIN, 1978**). Cette infection touche aussi bien les populations autochtones que les expatriés qui viennent vivre dans ces zones (**FAIN, 1978**). Cette prévalence, basée sur la présence de microfilaire dans le sang des individus, n'est qu'une sous-estimation de la vraie prévalence. En effet, il est admis que la proportion des sujets amicrofilarémiques (sans microfilaires dans le sang), mais présentant des signes d'infections loasiques, est 3 fois plus élevée (**FAIN, 1978**).

### **II. Distribution et Cycle de vie**

#### **II.1. Distribution**

La *L. loa* est une filaire strictement africaine dont la distribution est limitée et principalement présente dans les forêts pluviales et tropicales de l'Afrique Centrale et Occidentale : Bénin, Nigeria, Cameroun, République Centrafricaine, République Démocratique du Congo, Congo Brazzaville, Guinée Equatoriale, Gabon, Angola et le Nord de l'Ouganda (**figure 1**). Dans ces zones endémiques, la loase constitue la troisième cause de consultation en milieu rural (**RICHARD-LENOBLE et al., 1983**). De ce fait, cette affection est considérée actuellement comme un important problème de santé publique.

## II.2. Cycle de vie

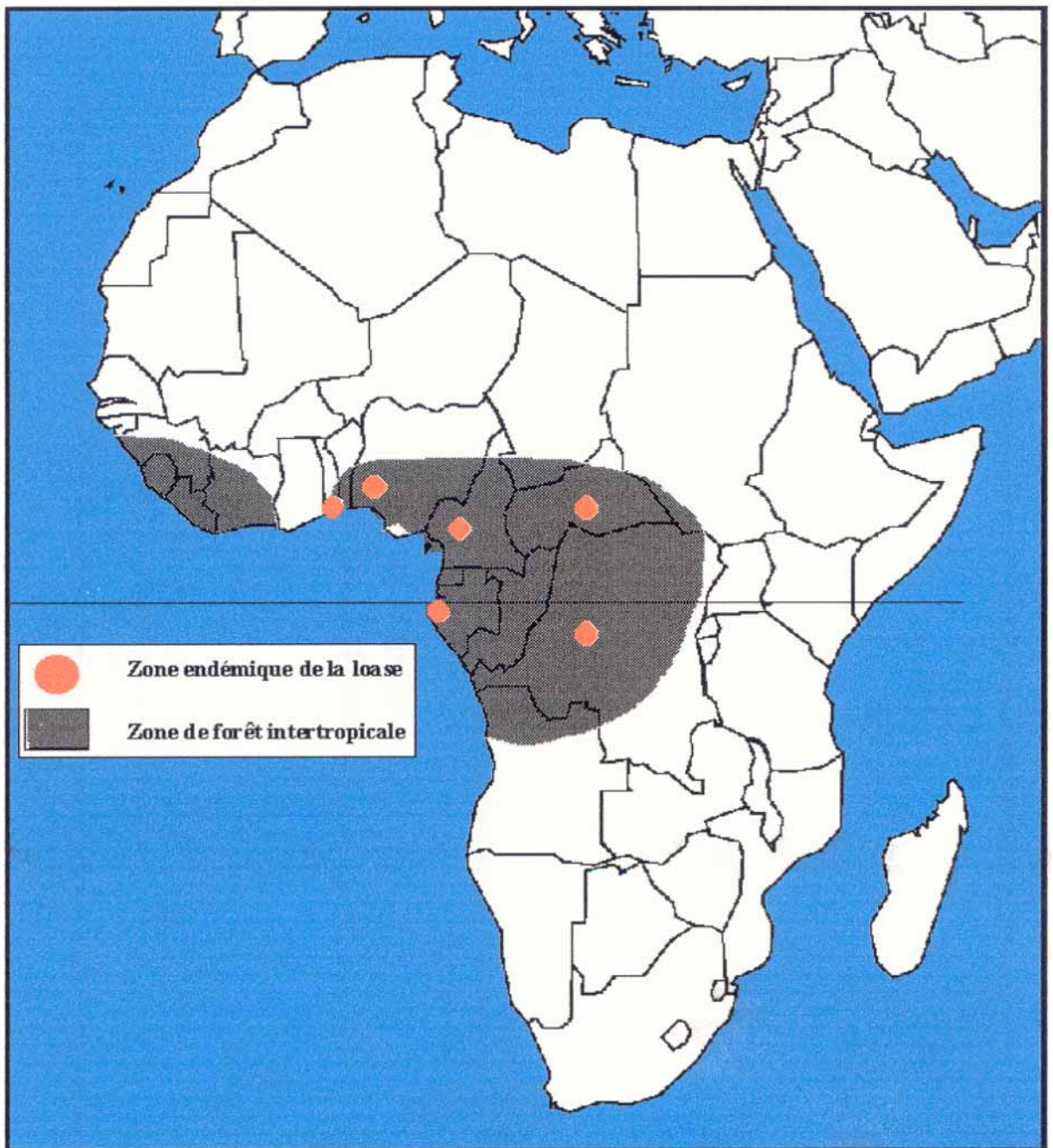
Le cycle de vie de *L. loa* (**figure 2**) commence lorsqu'au cours d'un repas sanguin chez un malade, le *Chrysops* femelle absorbe les microfilaires. Celles-ci subissent alors un développement normal dans le tube digestif du vecteur en 7-14 jours pour devenir ensuite des larves infestantes de troisième stade (L3). Au cours d'un nouveau repas sanguin, l'insecte femelle pique un nouvel hôte et dépose par l'intermédiaire de sa trompe des larves infestantes accumulées au niveau de sa lèvre inférieure. Les larves L3 pénètrent activement à l'endroit de la lésion et gagnent les tissus sous-cutanés. Après une période de maturation de 3-6 mois, elles se transforment finalement en vers adultes sexués. Ces derniers vivent dans le tissu sous-cutané pour l'essentiel.

Au cours de sa reproduction sexuée, la femelle *L. loa* fécondée, émet périodiquement des microfilaires qui circulent dans le sang périphérique de l'hôte, suivant une périodicité diurne (**ANDY et al., 1981**). En effet, les microfilaires se concentrent activement la nuit dans les vaisseaux des organes profonds (poumons). Quelques unes vont gagner périodiquement le courant sanguin, provoquant des microfilarémies dont les pics sont diurnes. Ingerées par un *Chrysops*, dont le maximum d'activité coïncide avec les pics de microfilarémie, elles assureront la pérennité de l'infection dans une population, en évoluant en larve L3. La longévité ou la durée de vie du ver adulte peut atteindre une dizaine d'années.

## II.3. Le vecteur

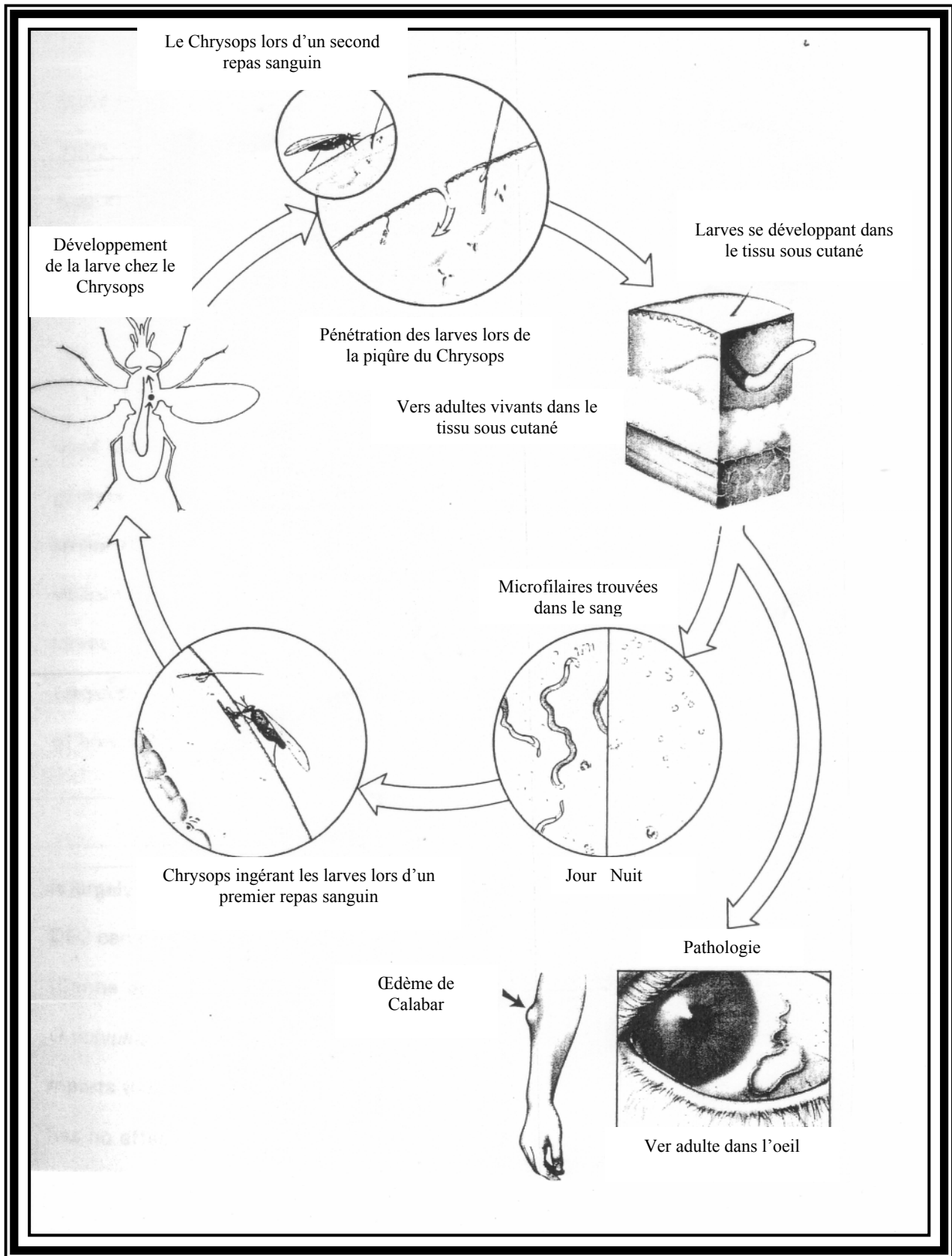
La loase humaine causée par la filaire *L. loa*, est principalement transmise à l'être humain par la piqûre d'un taon, du genre *Chrysops* (**photo 1**). Les *Chrysops* sont très abondants dans la canopée des forêts. Ces insectes piqueurs de la famille des Tabanidés, ont une activité diurne. Il existe principalement deux (2) espèces de *Chrysops* : *C. silacea* (plus présent dans les villages) et *C. dimidiata* (plus important dans les forêts et les plantations). Chez ces espèces, seule la femelle est hématophage,

elle pique pendant la journée avec une activité maximale vers midi. Chez l'homme infecté, on a remarqué que les microfaires apparaissent dans le sang périphérique vers 10h, avec un maximum de leur fréquence vers 13-15h pour ensuite disparaître la nuit vers 20-22h. Cette périodicité est vérifiée quand un individu présente des habitudes régulières de veille et de sommeil (FAIN et MAERTENS, 1973).



Source : Ralph M., 1975

**Figure 1** : Carte de distribution de la répartition de la *Loa loa* en Afrique



Source : AKUE, 1995

Figure 2 : Cycle de vie de *Loa loa*



Source : AKUE, 1995

**Photo 1 : *Chrysop* : Insecte vecteur de *Loa loa***

### **III. Symptomatologie, diagnostic, contrôle du vecteur et traitement**

#### **III.1. Symptomatologie**

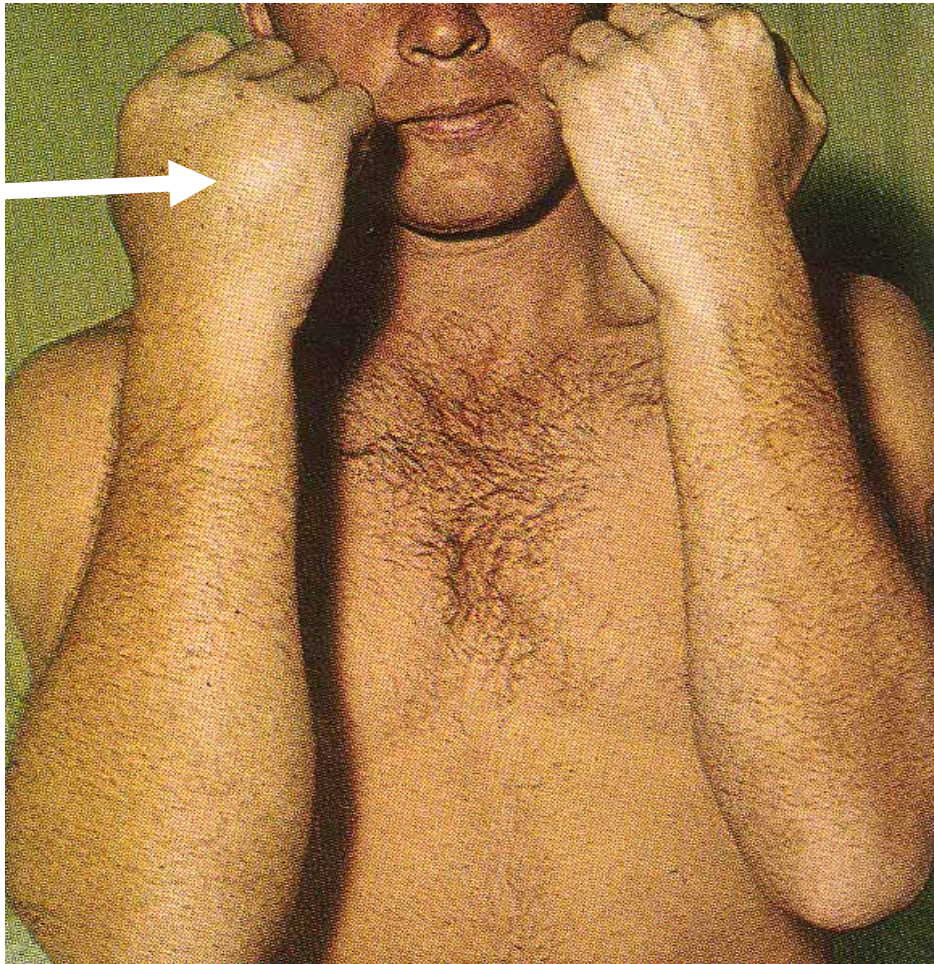
##### **III.1.1. Symptomatologie classique**

La loase a longtemps été considérée comme une affection bénigne, aux conséquences pathologiques négligeables. On note, aussi bien chez les sujets en zone d'endémie que chez des sujets ayant transité dans ces régions, de nombreux et fréquents cas de microfilarémie asymptomatique. L'apparition des premiers signes cliniques se produit après une phase d'incubation muette de plus de 3 mois. Quatre symptômes groupés peuvent survenir :

- ❖ **le prurit** : il peut apparaître sur n'importe quelle partie du corps : bras, thorax, visage, épaules. Cette apparition pousse souvent le malade à la consultation médicale et reste un élément de diagnostic d'orientation dans les zones exemptes d'onchocercose ;
  
- ❖ **l'œdème de Calabar** : la filaire *L. loa* se déplace sous la peau par reptation et provoque des réactions d'irritation et des réactions allergiques avec formation de nodules oedémateux : oedèmes de Calabar (du nom d'une localité du Nigeria, ancien Biafra). Ces oedèmes sont de taille variable et apparaissent spontanément en se fixant aux mains, aux poignets, aux coudes et au thorax (**Photo 2**). Ces oedèmes sont fugaces, migrateurs et peuvent durer de quelques heures à quelques jours ; ils peuvent aussi revenir plus tard soit au même endroit, soit ailleurs. Lors de sa migration à travers les différentes parties du corps, le ver adulte peut apparaître spontanément sous la peau ou bien sous la conjonctive pour être visible ;
  
- ❖ **le passage sous la conjonctive** : c'est un phénomène spectaculaire, et relativement fréquent. La filaire parvient ainsi jusqu'à l'œil et pénètre jusqu'à la conjonctive ou sous la peau de la paupière. Cela s'accompagne de larmoiement, de sensation d'un corps étranger intraoculaire ; le ver peut même changer d'œil en cheminant sous la peau de la racine du nez ; cette traversée conjonctivale est brève mais une intervention rapide de l'ophtalmologiste permet l'extirpation facile du ver (**Photo 3**). Ce syndrome apporte la preuve de l'infection par *L. loa*, au même titre que la mise en évidence des microfilaires ;
  
- ❖ **le passage sous-cutané du ver adulte** : il se traduit par un fourmillement désagréable et un prurit localisé. Le ver apparaît alors sous une forme palpable, mobile pouvant se déplacer d'un centimètre environ par minute. La durée de la migration, avant que le ver ne plonge en profondeur, est très souvent courte, rarement plus d'une heure. Cet incident est fréquent lors du traitement par la

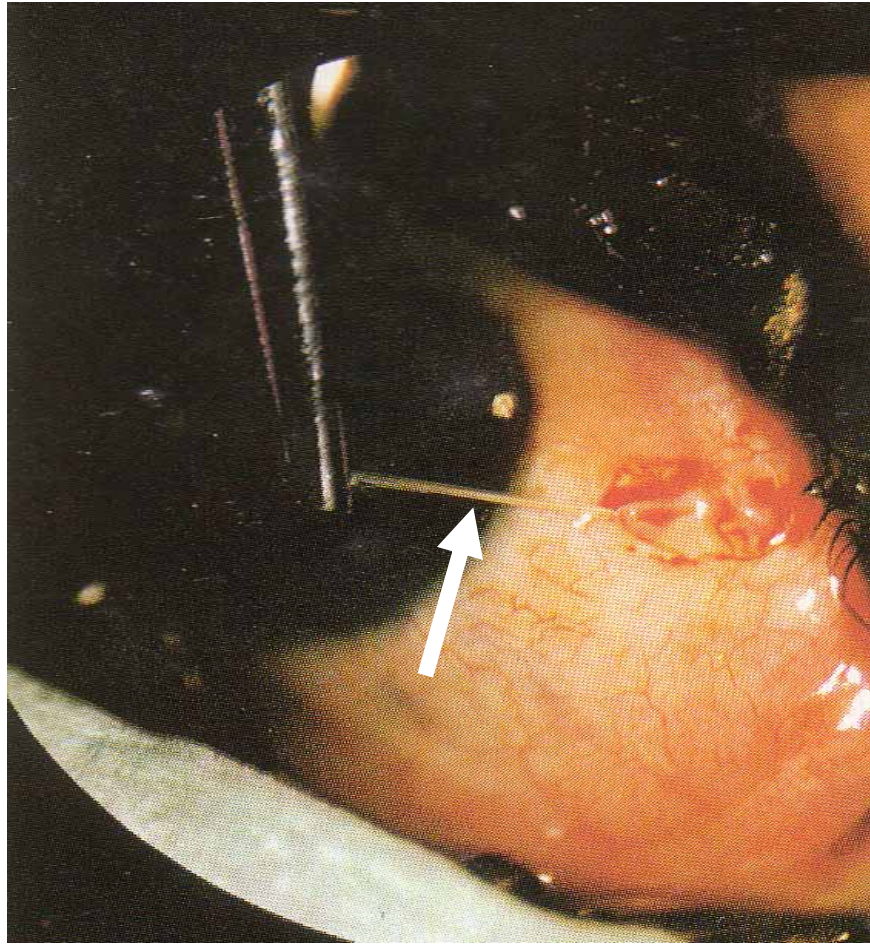
Diéthylcarbamazine (DEC). Les vers adultes remontent à la surface de la peau sous l'effet du médicament.

La présence de tous ces signes cliniques spécifiques permet de porter un diagnostic de présomption qui ne pourra être confirmé que par la mise en évidence du parasite. Classiquement, l'infection loasique s'accompagne d'une hypergammaglobulinémie, d'une hyperéosinophilie et d'un taux élevé d'IgE responsable des symptômes allergiques (CARME, 1983).



Source : AKUE, 1995

**Photo 2 : Œdème de Calabar siégeant sur le poignet droit**



Source : AKUE, 1995

**Photo 3 : Extraction d'un ver adulte de *L. loa* lors d'un passage oculaire**

### **III.1.2. Les complications**

Dans ce type d'infection, certaines complications peuvent survenir. Elles sont fréquentes, insidieuses et à long terme. Ces complications font de la loase une maladie systémique qui influe de façon directe sur la santé publique des populations vivant en zone d'endémie.

- ❖ **Les complications neurologiques** : On note l'apparition des encéphalites. Toutefois, avant d'attribuer cette complication à la loase, il faut d'abord écarter toute affection intercurrente pouvant survenir au cours d'une maladie dont la durée (longévité des vers) peut dépasser 15 ans. Il y a un fait établi :



l'encéphalite est déclenchée ou aggravée par un traitement intempestif par la DEC, lorsque la microfilarémie est très intense. La lyse massive et brutale des microfilaires peut engendrer des accidents et des complications neurologiques parfois dramatiques (NUTMAN *et al*, 1988). Un suivi médical strict lors de ce traitement est donc à préconiser.

- ❖ **Les complications cardiaques** : ces complications surviennent à long terme. Elles sont observées chez des sujets présentant une éosinophilie sanguine élevée et prolongée (GENTILLINI *et DUFLO*, 1982). Elles sont représentées par l'endocardite pariétale fibroblastique éosinophilique de Loeffler. C'est le tableau d'une insuffisance cardiaque globale.
  
- ❖ **Les complications rénales** : des néphropathies ont été décrites dans la loase (CRUEL *et al.*, 1997). Il est souvent difficile d'affirmer que celle-ci est seule en cause dans leur genèse ; on remarque néanmoins, l'apparition de la protéinurie après plusieurs années d'infestation parasitaire, la présence de nombreuses microfilaires dans les glomérules et les capillaires du tissu interstitiel, l'élévation transitoire de la protéinurie au début du traitement spécifique et l'amélioration parfois constatée après traitement, plaident en faveur de cette relation. La mise en évidence par immunofluorescence d'antigènes filariens complexés ou non à des anticorps, dans les dépôts extramembraneux, est un argument en faveur de cette dernière hypothèse.

### III.2. Diagnostic

Les méthodes de diagnostic d'une filariose à *L. loa* reposent sur une approche directe de certitude et une approche indirecte de présomption.

### III.2.1. Diagnostic direct de certitude

#### III.2.1.1 Mise en évidence des microfilaires

Elle repose sur la microscopie standard. Le sang périphérique est prélevé pendant la journée, du fait de la périodicité diurne de la loase humaine. Les microfilaires sont recherchées à l'état frais dans une goutte de sang placée entre lame et lamelle, ou bien après coloration au Giemsa sur frottis mince ou goutte épaisse (**CARME, 1983**). Dans le cas d'une faible parasitémie, il est avant tout nécessaire de concentrer les microfilaires par leucoconcentration (**HO THI et PETITHORY, 1963**). La **figure 4**, montre un diagnostic différentiel à partir d'un échantillon de sang parasité coloré au Giemsa.

Notons que la recherche de microfilaires peut également se faire par QBC (Quantitative Buffer Coating).

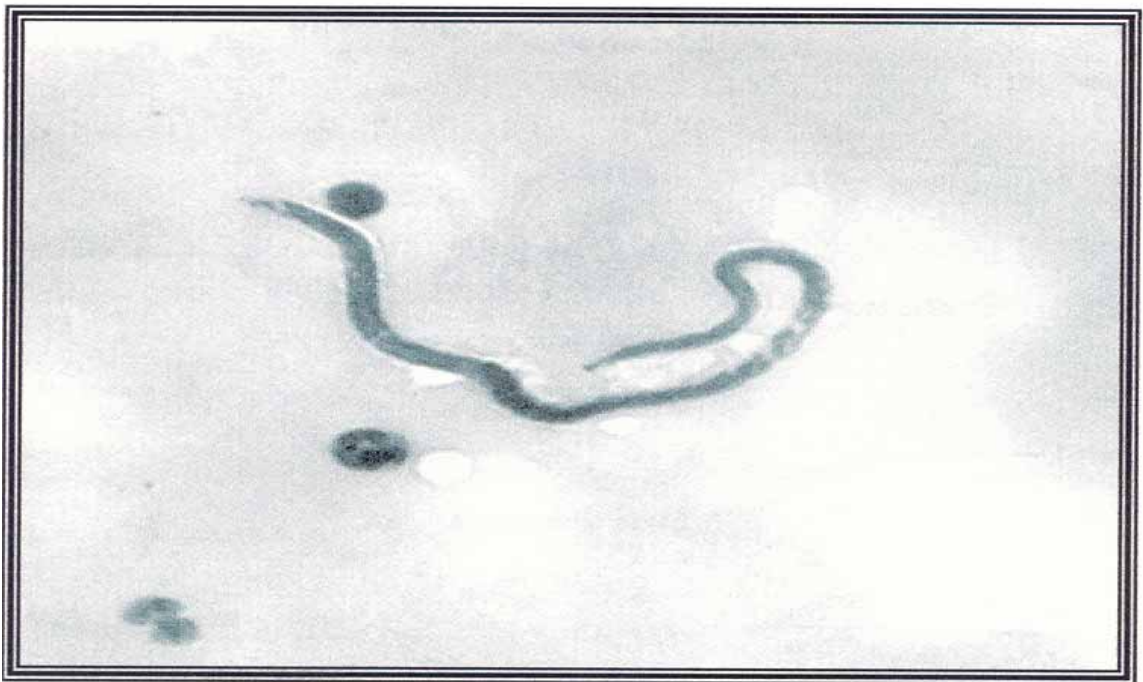
Généralement, pour l'identification des microfilaires de *L. loa* au microscope, à partir d'un échantillon sanguin, il est important de tenir compte de leur grande taille, de la présence d'une gaine courte et peu colorée, de la présence de noyaux somatiques gros et serrés. Le **tableau I** ci-dessous, résume les critères d'identification des microfilaires sanguines. Sur la **figure 5**, sont présentés les principaux critères de différenciation des microfilaires à l'examen direct après coloration.

**Tableau I** : Critères d'identification des microfilières sanguines

	Micro filaire	Taille en mm	Gaine	Espace Céphalique	Noyaux	Corps de Manson	Période
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Sang	300/8	Oui	Court	Petits, séparés	Visible unique	Nuit
<i>Brugia malayi</i>	Sang	250-300/6-8	Oui	Long	Petits ovoïdes serrés	Visible, 3 masses	Nuit
<i>Loa loa</i>	Sang	300/8	Oui, peu colorée	Long	Gros, ovoïdes	Non coloré	Jour
<i>Monsonella perstans</i>	Sang	200/5	Non	Très court	Petits, serrés	Non coloré	Sans
<i>Monsonella ozzardi</i>	Sang/derme	200/5	Non	Très court	Gros, espacés	Non coloré	Sans
<i>Monsonella streptocerca</i>	Derme	200/5	Non	Très court	Gros, espacés	Non coloré	Sans
<i>Onchocerca volvulus</i>	Derme	250-300/10	Non	Long	Gros, serrés	Non coloré	Sans



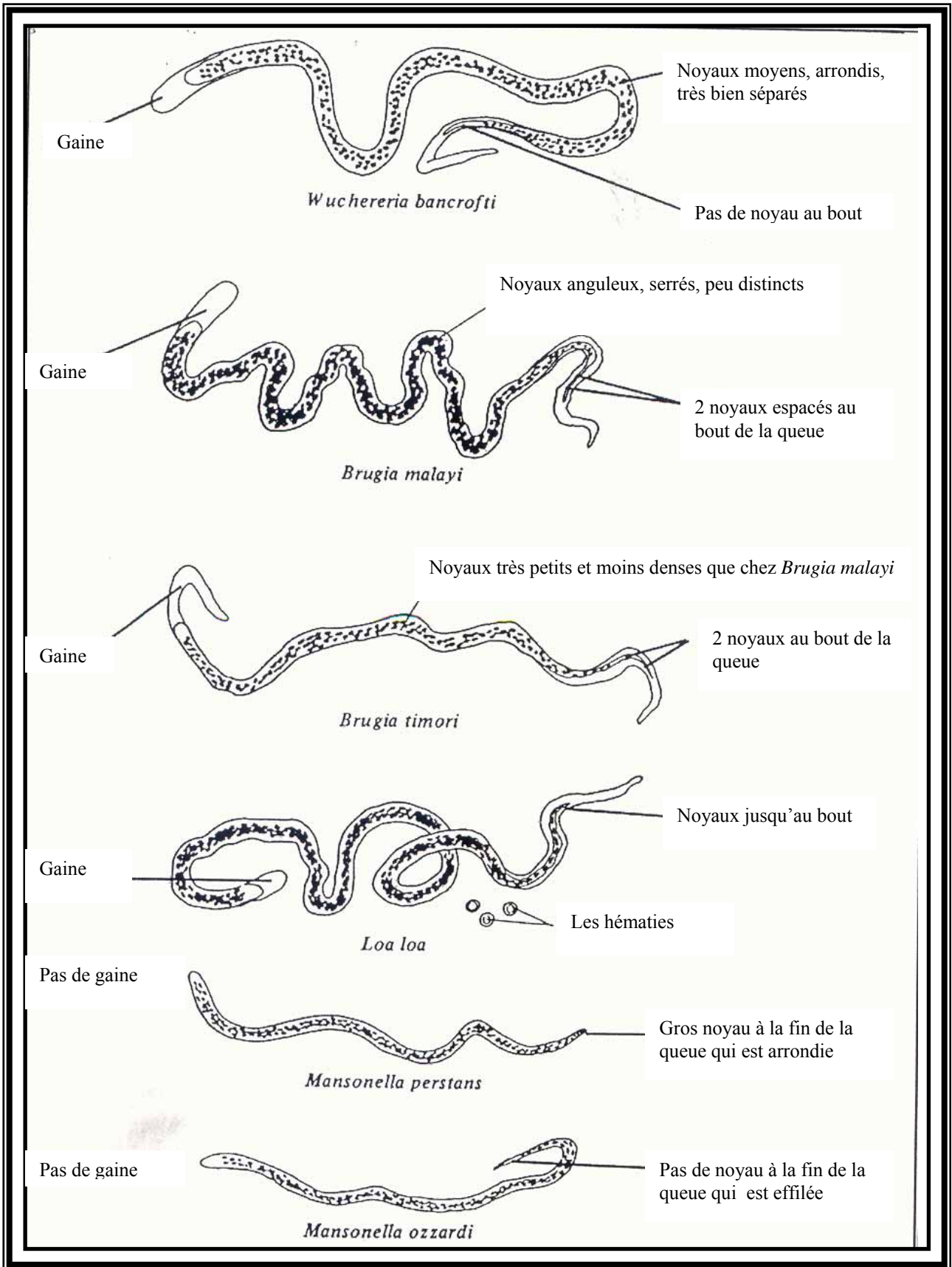
Microfilaire de *L. loa*



Microfilaire de *M. perstans*

Source : AKUE, 1995

**Figure 3** : Examen direct sur goutte épaisse de *L. loa*. Présence d'une gaine souvent mal colorée au Giemsa. Diagnostic différentiel des microfilaries de *M. perstans* (filaires non pathogènes pour l'homme, mais souvent associées à *L. loa*).



**Source:** Tropical health technology learning bench aid series and wall chards, Cambridge, UK

**Figure 4 :** Examen direct des microfilaries sanguines

### **III.2.1.2 Mise en évidence des vers adultes ou macrofilaires**

Au cours d'une observation clinique, les vers adultes sont repérés lors de leur passage sous le tégument ou bien lors de leur cheminement sous-conjonctival. Sous la conjonctive, il est possible de les extraire à l'aide d'un vaccino-style, d'une pince fine ou après scarification. Cette opération est plus difficile lorsque le passage est sous-cutané.

La présence d'oedèmes allergiques et récidivants (oedèmes de Calabar) et de prurit constitue un diagnostic d'orientation.

## **III.2.2. Diagnostic indirect de présomption**

### **III.2.2.1 Hyperéosinophilie sanguine et niveaux d'IgE**

L'hyperéosinophilie est pratiquement constante et sans caractère particulier. Les niveaux élevés d'IgE sont un marqueur général et classique d'infection à helminthe.

### **III.2.2.2 Sérologie**

#### **❖ Tests basés sur la détection d'anticorps**

La loase s'accompagne d'un taux élevé d'immunoglobulines spécifiques, à la base du diagnostic sérologique. Plusieurs essais ont été faits pour estimer la prévalence réelle de la loase par la détection des anticorps IgM et IgG totaux dirigés contre les antigènes filariens hétérologues (**NOIREAU et al., 1987**) et contre les antigènes excrétés homologues (**RICHARD-LENOBLE et al., 1983**). Cette méthode avait suscité de l'espoir et avait pris de l'importance surtout dans la détection des formes occultes de la loase. Mais, très vite il a été constaté que les tests basés sur le dosage des IgG totaux présentaient un risque de surestimation de la prévalence de l'infection, en raison des réactions croisées pouvant exister avec les antigènes d'autres nématodes, et par le fait que les IgG totaux ne discriminent pas une infection ancienne d'une infection active.

D'autres études sur le dosage des sous classes d'IgG ont révélé la prédominance des IgG4 au cours de l'infection due à *L. loa* ainsi que leur spécificité pour les antigènes à faibles poids moléculaires 15-30 kDa (**EGWANG et al., 1990**). Ces auteurs ont également montré que le taux d'IgG4 spécifique est un indicateur de l'infection active de *L. loa*. Cependant, le diagnostic est incapable de dire s'il s'agit des IgG4 des vers adultes, de microfilaries ou de larves L3. Par ailleurs, la spécificité de cette sérologie dirigée contre les antigènes *L. loa* a été établie à 93.7% chez des individus co-infectés par les filaires *L. loa* et *M. perstans* (**AKUE et al., 1994**).

Le diagnostic est grandement amélioré par la détection des anticorps IgG4 contre les antigènes de vers adultes par la technique ELISA (**AKUE et al., 1994**).

Il faut noter que la synthèse des IgG4 nécessite une stimulation chronique et la persistance de l'antigène (**FAIN, 1981**).

#### ❖ Tests basés sur la détection d'antigènes circulants

Au niveau de la loase, ce test n'est pas encore très bien développé, par faute d'anticorps monoclonaux. En effet, **JAOKO et al. (1995)** ont montré qu'il était possible de diagnostiquer une infection de *Loa loa* par la détection d'antigènes circulants dans les sérums des sujets avec *Loa loa*. Cependant, la forte présence des réactions croisées à *M. perstans* limite l'utilisation de ce test. De même, aucune corrélation n'a été trouvée entre les niveaux d'antigènes et la densité des microfilaries.

### III.2.2.3 Technique PCR

Récemment, **TOURE et al. (1997)** ont développé un outil PCR nichée (double PCR) pour la détection d'ADN circulant. Cet outil est basé sur l'exploitation de la séquence spécifique de la région répétée (15r3) du gène qui code pour la protéine 15kDa de *L. loa* (**AJUH et al, 1995**). Si ce test s'est révélé spécifique, il n'est cependant pas très sensible. En effet, l'utilisation de cet outil par **DJIKEUSSI (1997)** sur des échantillons de sang provenant de Dienga, un village au Sud-Est du Gabon

auprès des individus avec une infection patente de *L. loa*, n'a mis en évidence que 10% de sujets microfilarémiques. De plus, ce test utilise une technologie trop sophistiquée, encore chère pour un laboratoire du Sud.

### **III.3. Contrôle du vecteur**

L'éradication ou l'arrêt de la transmission vectorielle est difficilement envisageable dans les zones d'endémie. Les vecteurs *Chrysops*, impliqués dans la transmission de la loase sont abondants dans la canopée des forêts. La lutte contre ces vecteurs ne peut concerner que les imagos, compte tenu de la grande dispersion des gîtes larvaires dans la forêt. En effet, la destruction de larves par l'épandage d'insecticides à grande échelle, est d'une efficacité illusoire. L'assèchement des gîtes est également irréalisable. L'interception des *Chrysops* dans les villages pourrait être assurée par le piégeage, même si un modèle performant de piège reste à être créé.

### **III.4. Traitement**

Durant de nombreuses années, le traitement de la loase a reposé sur un seul produit, la Diéthylcarbamazine (DEC) plus accessible donc plus couramment prescrite. C'est un puissant microfilaricide, mais qui n'agit que sur les microfilaires circulantes ; d'où la nécessité de répéter régulièrement ce traitement. Son mécanisme d'action est inconnu. En effet, chez certains patients microfilarémiques, la DEC peut entraîner, par son action de destruction rapide de microfilaires, des effets secondaires (somnolence, vertige, asthénie) et des complications, telles que la méningo-encéphalite chez un sujet porteur d'une forte charge de microfilaires (classiquement supérieure à 50.000 mf/ml de sang) (FRANCKE *et al.*, 1991). Ces complications sont la conséquence d'une réaction allergique fulminante due à la lyse massive et brutale des microfilaires sanguines (FAIN, 1978) et/ou de l'obstruction des capillaires cérébraux par les parasites morts (NEGESSE *et al.*, 1985).



La prise de la DEC nécessite une grande prudence dans son utilisation. La parade consisterait à une installation progressive du traitement en association avec un anti-histaminique et un corticoïde.

L'ivermectine qui a été introduite depuis peu dans la thérapie de cette filariose, apparaît actuellement comme le médicament de choix, principalement en raison de sa facilité d'utilisation (dose unique). Ce traitement s'est avéré moins efficace sur les microfilaires de *L. loa* par rapport aux microfilaires d'*O. volvulus* (**RICHARD-LENOBLE et al., 1988**). Néanmoins, dans la lutte contre la loase, elle permet une réduction de 80% en moyenne de la microfilarémie, et présente chez la plupart des sujets atteints, porteurs modérés de microfilaires peu d'effets secondaires, le plus souvent bénins (**RICHARD-LENOBLE et al., 1988**). En général, ce médicament est bien toléré, mais il peut poser des problèmes dans les pays d'Afrique Centrale où coexistent les trois filarioses (*L. loa*, *O. volvulus* et *M. perstans*) et chez les très forts porteurs de microfilaires *L. loa*. En effet, dans ces pays, certains patients peuvent être infectés par les trois espèces filariennes en même temps. Bien que les études de traitement de patients co-infectés par *L. loa* et *O. volvulus* et/ou *M. perstans*, menées au Gabon par **RICHARD-LENOBLE et al. (1988)** n'aient signalé aucun problème grave. **GARDON et al. (1995)** ; **BOUSSINESQ et al. (1998)** ont signalé qu'à dosage égal d'ivermectine, les études réalisées au Cameroun chez des sujets microfilarémiques (> 10 000 mf/ml), ont permis de constater l'apparition d'effets secondaires particulièrement sévères, allant même jusqu'à la mort. Ce constat suscite donc une grande prudence, lors de l'utilisation de ce médicament, surtout dans les campagnes de distribution communautaire de base réalisées hors contrôle médical. Au cours des traitements de masse pour l'onchocercose, dans les zones où coexistent la loase et l'onchocercose, la responsabilité de la loase dans le développement des effets secondaires, avait déjà été suspectée (**CHIPPAUX et al., 1993**). Une relation entre forte microfilarémie et apparition d'effets secondaires, parfois sévères, a été de nouveau mise en évidence avec ce médicament (**DUCORPS et al., 1995**). Ces effets devraient emmener à modifier les programmes de lutte pour la chimiothérapie de masse envisagés par l'OMS et d'accentuer la surveillance médicale à la suite des

premières distributions de médicaments dans ces zones où de forts porteurs de microfilaires *L. loa* existent.

#### **IV. Existe t-il un réservoir animal de *Loa loa* ?**

Dans les conditions naturelles, les *Chrysops* se nourrissent sur l'homme mais également sur le bétail. En effet, dans les conditions expérimentales, les *Chrysops*, comme nombreux insectes hématophages, se gorgent aussi bien sur les singes que sur divers rongeurs. On observe toutefois des préférences d'hôtes. En dépit de nombreuses recherches orientées sur le réel réservoir animal de *L. loa*, le problème de son existence se pose toujours et ce fait n'est pas encore complètement résolu.

En 1920, **TREADGOLD** a décrit, sous le nom de *Loa papionis*, une nouvelle espèce de filaire trouvée chez des babouins (*Papio cynocephalus*) de la Guinée Equatoriale. Cette espèce était différente de *L. loa*, par les dimensions plus grandes du ver adulte et par la périodicité nocturne des microfilaires. **SANDGROUND (1936)**, en examinant des filaires récoltées chez un gorille capturé en République Démocratique du Congo (RDC), arrive à la conclusion qu'elles étaient identiques à *L. loa*. Il estime que *Loa papionis* décrite par **TREADGOLD** est également une *L. loa*. De même, d'autres filaires désignées comme étant une filaire *L. loa* ont été signalées par **GORDON et al. (1950)** puis par **DUKE et al. (1958)** chez trois espèces de singes très répandues dans la forêt pluviale du Sud-Ouest du Cameroun. La fréquence de filaires chez diverses espèces de singes, ressemblant étroitement à *L. loa* rend vraisemblable l'existence d'un réservoir simien pour cette filaire. Cependant, en réalisant l'infestation expérimentale des singes, il a été montré que la filaire *L. loa* simienne était transmise exclusivement par *Chrysops langi* et *Chrysops centurionis*, deux espèces de taon à activité crépusculaire qui fréquentent la canopée et qui ne piquent pas l'homme (**DUKE, 1955**).

De même, l'analyse des repas sanguins des vecteurs *C. dimidiata* et *C. silacea* a montré que 89-90 % de sang étaient d'origine humaine et non simienne (**GOUTEUX et al., 1989**). En pratique, les singes ne seraient donc pas un réservoir efficace de la *L.*

*loa* humaine. Des observations encore plus nombreuses dans différents foyers de la loase sont nécessaires avant de pouvoir certifier que l'homme est réellement l'unique réservoir de cette filaire (FAIN, 1978). Cela est d'autant plus important que *Mandrillus sphinx* est susceptible à l'infection expérimentale par la *Loa loa* humaine.

## V. Quelques modèles expérimentaux pour la loase à *Loa loa*

Dans les conditions naturelles, les deux types de parasites (simien et humain) évoluent chacun dans des complexes « hôte-parasite-vecteur » qui leur sont propres. Ce qui rend d'ailleurs improbable tout échange entre eux (FAIN, 1978).

Certaines espèces de filaires humaines, malgré leur spécificité d'hôte peuvent être expérimentalement transmises à des animaux.

Ainsi, plusieurs tentatives d'infestation des primates non-humains ont été réalisées dans le passé, à l'aide du stade larvaire L3 de *L. loa*. Certaines espèces se sont révélées permissives : le drill (*Mandrillus leucophaeus*) (DUKE, 1957), les babouins (*Papio anubis*) et les patas (*Erythrocebus patas*) (ORIHÉL et EBERHARD, 1985), les rhésus (*Macaca mulatta*) (ORIHÉL et EBERHARD, 1985) et les mandrills (*Mandrillus sphinx*) (PINDER et al., 1994). Ces travaux ont permis de conclure que le *mandrill* était un bon hôte expérimental pour la filaire *L. loa* humaine. Les études réalisées sur les modèles expérimentaux animaux permettent non seulement de mieux connaître les relations hôte-filaires mais apportent aussi des informations essentielles dans la lutte contre certaines maladies.

Par exemple, l'infection expérimentale du *mandrill* par la loase humaine conduit à une caractérisation parasitologique et immunologique proche de celle observée lors de l'infection naturelle chez l'homme.

Les caractéristiques de l'infection par la loase humaine chez ces espèces sont similaires à celles décrites chez l'homme : une périodicité diurne, une pré-patence (période précédant l'apparition des microfilaires dans le sang périphérique) d'environ 150 jours, un pic de microfilarémie aux alentours de 200 jours, une stabilisation puis

une décroissance progressive de la microfilarémie après environ 280 jours ; on note aussi la présence d'animaux fortement, moyennement et faiblement microfilarémiques, illustration des différents statuts parasitaires chez l'homme. En dépit de ces nombreuses similitudes avec l'homme, il n'y a chez les *mandrills* ni apparition d'œdème de Calabar, ni passage oculaire d'un ver adulte, ni prurit et d'hyperéosinophilie. On note aussi le rôle primordial de la rate dans le contrôle de la microfilarémie, ce qui différencie l'infection expérimentale dans ce modèle de l'infection humaine naturelle. Ensuite un autre paramètre important à considérer, c'est que les *mandrills* ne vivent pas en milieu de transmission continue, cumulative comme l'homme.

## **CHAPITRE III : Les réponses immunitaires dans les filarioses**

### **I. Traits généraux de la réponse immunitaire**

Plusieurs auteurs ont montré qu'en général, les différents tableaux de l'infection filarienne dépendent des réponses immunitaires de l'hôte (**OTTESEN et al, 1977**). Le spectre de l'infection peut être caractérisé par quatre grands statuts parasitaires :

- ❖ les sujets microfilarémiques asymptomatiques : statut regroupant les individus porteurs de microfilaires, sans manifestations aiguës ou chroniques de la maladie ; les réponses immunologiques de ce groupe sont les plus faibles par rapport aux autres groupes ;
- ❖ les sujets symptomatiques : statut des individus ayant des réponses immunitaires anti-filariennes et inflammatoires responsables de manifestations cliniques très variées, accompagnées des allergies réactionnelles, aiguës ou chroniques ;
- ❖ les sujets amicrofilarémiques : Statut d'individus vivant en zone d'endémie où ils sont fortement exposés aux piqûres de vecteurs infectés, mais sans être porteurs de microfilaires, avec des réactions immunologiques antifilariennes élevées. Cette population hétérogène, regroupe les individus ayant une infection occulte (présence du ver adulte sans microfilaires), et ceux sans symptôme clinique, communément appelés « contrôles endémiques ou résistants au développement du parasite » ; les personnes amicrofilarémiques constituent un groupe très important dans la loase où les études épidémiologiques menées sur une population du Sud-Est du Gabon par **VAN HOEGAERDEN et al. (1987)**, ont montré que 80% des sujets amicrofilarémiques présentent des anticorps spécifiques à *L. loa*.

- ❖ les sujets à éosinophilie tropicale pulmonaire : ce statut concerne les individus sans microfilaires au niveau du sang périphérique, mais caractérisés par des affections pulmonaires chroniques, des niveaux élevés d'anticorps spécifiques et d'IgE responsables d'une réponse allergique localisée dans les capillaires pulmonaires.

## II. La réponse immune cellulaire

Les deux types de réponse immunitaire classique, à savoir la réponse cellulaire et la réponse humorale, interviennent dans la réaction hôte/ filaires. Les études immunitaires menées dans le cadre de la filariose ont montré que la réponse immunitaire est caractérisée par :

- ❖ une réduction importante de la prolifération *in vitro* des lymphocytes T des individus microfilarémiques en réponse aux antigènes filariens (**NUTMAN et al., 1987b**) ; des études encore préliminaires sur la réponse cellulaire à l'infection par *L. loa*, ont montré que le statut amicrofilarémique est corrélé à une réponse T helper CD4, caractérisée par une forte prolifération lymphocytaire en réponse aux antigènes spécifiques, une production de cytokines de type Th1 ainsi qu'un très fort taux de cytokines de types Th2 sécrétées par les mêmes PBMC en réponse à une stimulation antigénique spécifique (**PIESSENS et al., 1980**). En revanche le statut microfilarémique est accompagné d'une suppression de la réponse T helper. Ceci suggère une ressemblance relative entre les filaires.
- ❖ une faible production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B des sujets microfilarémiques (**NUTMAN et al., 1987a**)

Ces résultats indiquent que les lymphocytes B et T des individus microfilarémiques, se trouvent dans un état d'anergie caractérisé par leur incapacité à produire suffisamment d'anticorps spécifiques et à proliférer en réponse aux antigènes filariens.

Une des hypothèses retenues pour expliquer la réduction de la réponse immunitaire chez les sujets microfilarémiques serait qu'on assiste là, à un état d'immunosuppression exercé par les lymphocytes T suppresseurs / cytotoxiques CD8+ (**MOSMANN et COFFMAN, 1989**).

Cependant, **NUTMAN et al. (1987b)** ont mené une expérience où la délétion des cellules TCD8+ n'a eu aucun effet sur l'anergie parasitaire spécifique ; ceci indique donc que l'immunosuppression à elle seule, n'explique pas la perte de la réponse immunitaire au sein du groupe d'individus microfilarémiques.

Lors d'une étude réalisée à l'aide de *Brugia malayi*, **YAZDANBAKSH et al. (1993b)** ont constaté que la réduction de la réponse proliférative des lymphocytes T en réponse aux antigènes filariens ne concernait pas uniquement les individus microfilarémiques, mais aussi une proportion importante d'individus appartenant à d'autres groupes cliniques. Ceci laisse penser qu'en dehors du stade microfilarémique, les autres stades de développement du parasite, dont les vers adultes, peuvent également être responsables de l'anergie constatée.

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour l'anergie observée dans les infections filariennes :

- ❖ **WEIL et al. (1983)** proposent le phénomène de tolérance après l'exposition in utero aux antigènes filariens ; cela a été suggéré par le fait que les anticorps IgE, IgM, qui ne traversent pas la barrière placentaire, ont été trouvés dans le cordon ombilical d'environ 50% de bébés nés de mères infectées ; cette étude est appuyée par l'étude contradictoire de **STEEL et al. (1994)**, qui a montré que les lymphocytes T des enfants, nés de mères qui avaient été identifiées comme microfilarémiques 22 ans auparavant, avaient une réduction de la prolifération vis à vis des antigènes filariens. Cependant, le niveau d'anticorps anti-filariens de ces enfants n'était pas différent de celui des enfants nés de mères amicrofilarémiques. Le fait que les niveaux d'anticorps soient

comparables entre les enfants nés de mères ayant des statuts parasitaires différents, montre qu'il y a une dissociation entre la réponse cellulaire et humorale. En conséquence, la théorie de la tolérance n'explique pas tout le phénomène observé.

- ❖ **MAIZELS et LAURENCE (1991a)** ont proposé le mécanisme de la tolérance périphérique. Ce mécanisme est basé sur le fait que, malgré les bas niveaux d'IL-2, d'IFN $\gamma$  (**URBAN et al., 1991**) et, en dépit de l'absence d'une prolifération de lymphocytes T, les individus microfilarémiques ont tout de même de hauts niveaux d'IgG4.
- ❖ **YAZDANBAKSH et al. (1993a)** ont proposé une hypothèse alternative, « l'épuisement clonal », qui pourrait expliquer la baisse de la réponse immunitaire chez les individus microfilarémiques.

Au cours d'une étude analysant l'état d'activation des cellules T, les niveaux de CD25 (récepteur d'IL-2) et CD27 ont été mesurés dans le sérum d'individus filariens. On observe que lorsque le niveau de CD25 reste identique dans tous les groupes, le niveau du récepteur CD27 soluble apparaît plus élevé chez les microfilarémiques et chez les individus atteints d'éléphantiasis, par comparaison au groupe d'individus vivant en zone d'endémie, ne présentant aucun signe d'infection dit « sujets résistants ». Ces observations indiquent donc que les cellules lymphocytaires sont activées, malgré l'absence de réponse T (prolifération de cytokines) constatée dans le groupe des microfilarémiques. Des études de plus en plus nombreuses montrent que cette baisse n'est pas uniquement liée à la présence de microfilaires. En effet, il existe d'autres mécanismes responsables de ce phénomène, tels que les facteurs externes comme l'intensité de la transmission. **AKUE et al. (2002)** ont en effet démontré que le niveau de la réponse immunitaire diminue avec une augmentation de la transmission.

Par ailleurs, **DOETZE et al. (2000)** ont décrit une lignée cellulaire de type Th3 caractérisée par une sécrétion de l'interleukine 10 (IL-10) et de la cytokine TGF $\beta$ .



Selon les auteurs, cette lignée serait responsable de la baisse de la réponse cellulaire observée chez les sujets microfilarémiques.

Ceci démontre que le phénomène de suppression ou de baisse de la réponse cellulaire est multifactoriel.

### **III. Les réponses humorales contre les infections filariennes : les anticorps**

Etant donné que chaque immunoglobuline possède ses propres propriétés, il est logique de penser que toutes les immunoglobulines ne participent pas de la même façon dans la réponse à une infection filarienne. On observe par exemple que les IgG traversent le placenta, alors que les autres isotypes ne le font pas. Parmi les sous-classes d'IgG, certains comme les IgG1 et IgG3 sont plus efficaces dans le mécanisme de fixation du complément ou bien aux leucocytes, par rapport aux IgG2. Cette dernière, en effet ne se fixe pas au complément, et faiblement aux leucocytes.

On observe en général cinq grandes tendances dans les profils de réponse anticorps face à une infection filarienne :

- ❖ l'élévation de certains isotypes en corrélation avec la résistance à l'infection.

Dans cette optique, il a été démontré que les niveaux d'IgE contrôlent l'infection filarienne (**HUSSAIN et al., 1981**) et qu'il existe une association entre les niveaux d'IgG3 et l'immunité contre l'onchocercose (**GHOGOMU et al., 2002**) ou une relation entre les IgG1 et la baisse de la densité de microfilaires dans la loase (**AKUE et al., 1997**) ;

- ❖ l'élévation des anticorps dit « bloquants »

Les individus microfilarémiques asymptomatiques, ayant des réponses prolifératives réduites, ont tendance à avoir des niveaux d'IgG4 élevés (**OTTESEN et al., 1985b**). L'hypothèse émise est la suivante : étant donné que peu de personnes exhibent une réponse allergique vis à vis de l'infection filarienne, l'hypersensibilité provoquée par l'IgE est probablement modulée ou

bloquée par les hauts niveaux d'IgG4 chez certains individus. Cette idée est basée sur le fait que les IgG4 spécifiques filariens naturellement produits, bloquent in vitro l'histamine relarguée par les basophiles de patients infectés (**OTTESEN et al., 1981**). De plus, les expériences menées en Western Blot, sur la reconnaissance d'antigènes filariens (**HUSSAIN et OTTESEN, 1986**), ont montré que les IgG4 et IgE avaient reconnu les mêmes antigènes, par ailleurs, **TSANG et al. (1991)** ont montré que dans les infections à *O. volvulus*, les isotypes IgG4 et IgG1 pourraient agir comme anticorps bloquants contre les IgG3 ;

❖ L'élévation des anticorps en relation avec le développement des pathologies

Chez des patients onchocerciens (onchocercose-dermatite), les niveaux élevés d'IgG3 semblent être associés à la pathologie (**CABRERA et al., 1988**). Des rapports d'étude sur les filarioses lymphatiques ont permis à **MAIZELS et al. (1988)** d'avancer l'hypothèse selon laquelle les niveaux élevés d'IgG1, IgG2 et IgG3 seraient associés à la pathologie. **KURNIAWAN et al. (1993)** ont aussi montré que dans les infections dues à *B. malayi*, les niveaux d'IgE, sont 4 fois plus élevés chez les individus porteurs d'éléphantiasis par rapport aux microfilarémiques asymptomatiques ; d'autre part, les taux d'IgG4 semblent 3 fois plus bas chez les individus porteurs d'éléphantiasis que chez les individus microfilarémiques asymptomatiques. Cette étude confirme donc que l'équilibre IgG4/IgE pourrait être important pour l'issue de la pathologie ;

❖ l'élévation des anticorps dans les infections actives

A coté de son rôle possible de blocage d'anticorps, le taux d'IgG4 spécifique semble bien corrélérer avec l'infection active (**OTTESEN et al., 1985b**) aussi bien dans les infections à *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* et à *Loa loa*.

❖ Anticorps dans les mécanismes effecteurs :

Le mécanisme pour éliminer ou détruire un nématode a été décrit. De façon générale, la mort d'un parasite de genre nématode résulte des effets conjugués

d'une cellule effectrice (granulocytes neutrophiles, granulocytes éosinophiles et monocytes) et des molécules telles les immunoglobulines ou protéines du complément (**OTTESEN et al., 1977**). D'autre part, certains travaux immunologiques indiquent que les anticorps IgG et IgE, seraient impliqués dans le contrôle de la microfilarémie, par l'intermédiaire d'un mécanisme de cytotoxicité. Ce mécanisme est connu sous le nom de « antibody dependent cellular cytotoxicity » (ADCC). En effet, **PINDER et al. (1992)** ont démontré dans la loase que les sérums de sujets amicrofilarémiques étaient capables de lyser *in vitro* les microfilaires de *L. loa* par cytotoxicité anticorps-dépendant (ADCC), alors que ce phénomène n'était pas observé avec les sérums de sujets microfilarémiques.

L'inactivation du complément empêche le mécanisme de destruction de microfilaires de se produire, suggérant de ce fait l'implication directe du complément dans cette réaction. Cependant, l'utilisation du complément seul, sans le sérum des amicrofilarémiques ne permet pas l'élimination des microfilaires ; ceci confirme donc le rôle des anticorps dans ce phénomène de cytotoxicité.

#### **IV. Génomique et réponse immunitaire dans les filarioses.**

Plusieurs molécules ont été identifiées dans les différents stades de développement des filaires. Ces molécules étaient soit immunodominantes, soit associées à la pathologie et d'autres à la résistance vis à vis du parasite. C'est ainsi que **NANDURI et KAZURA (1989)** ont identifié une molécule de 97 kDa par Western Blot sur les extraits de microfilaires et des vers adultes. Cet antigène a permis de réduire la microfilarémie de 40-60% chez les souris immunisées. Dans la loase, une molécule de 31 kDa a été identifiée comme immunodominante à la surface des vers adultes (**EGWANG et al., 1988**). Cette molécule serait l'homologue de la 30 kDa de *Brugia sp.* identifiée comme étant une glutathion peroxydase (**TANG et al., 1996**).

De même, une molécule de 15kDa identifiée comme étant un allergène potentiel a été clonée dans la loase (AJUH et al., 1995) et plusieurs autres filaires humaines et animales.

D'une manière générale, les études immunologiques sur les molécules définies de filaires promettent d'apporter plusieurs informations précises sur l'immunité dans la filariose. La nouvelle approche utilisant des études génomiques afin de décrypter le génome des filaires (The Filarial genome project, 1999) permettra de mieux comprendre le rôle des molécules définies dans l'infection filarienne aussi bien dans la pathologie, l'invasion du système immunitaire ou dans l'immunité protectrice.

## V. La réponse immunitaire des primates non-humains à la filariose

Les observations faites sur la réponse immunitaire dans les filarioses sont intéressantes à la fois pour l'animal et pour l'homme du fait de la ressemblance entre les deux réponses. Dans le cas de la loase par exemple, une infection de *Macaca rhésus* (DENNIS et al., 1985) ou de *Mandrillus sphinx* (LEROY et al., 1997) par *L. loa* entraîne une diminution de la réponse immunitaire de type cellulaire, phénomène déjà décrit chez l'homme.

La réponse immunitaire des primates à l'infection filarienne a démontré l'existence d'une immunité protectrice. En effet, WONG et al. (1969) utilisant des larves L3 de *B. malayi* atténuées au rayon x, inoculées aux singes *rhésus*, ont montré que les animaux vaccinés avec un grand nombre de larves atténuées (200 larves L3) développent une immunité durable vis à vis d'une infection d'épreuve pendant un an, comparés aux animaux immunisés avec des larves naturelles chez qui l'immunité est faible. Cette expérience démontre la possibilité de développer un vaccin contre les filaires. Ce qui sera bénéfique à la fois pour les animaux et pour l'homme.

Depuis, plusieurs expériences ont été menées dans ce sens sur différentes espèces de filaires et leur hôte naturel tels que les chiens avec *D. immitis* (AH et al., 1974), les chats avec *B. pahangi* (OOTHUMAN et al., 1979).

## **DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE**

# **CHAPITRE I : Matériel et méthodes**

## **I. Présentation du cadre d'étude**

Dans le but d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés dans cette étude, nous avons décidé de travailler sur les primates non-humains élevés au Centre de Primatologie (CDP) du CIRMF. Il s'agit essentiellement des *Mandrillus sphinx*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Macaca rhésus*, *Macaca cynomolgus*, *Cercocebus torquatus*, *Cercopithecus solatus*, *Chlorocebus aethiops*, *C. nictitans* et des Hybrides.

Depuis la création du CIRMF en 1974, le CDP est utilisé comme plateau expérimental. C'est ainsi que des protocoles virologiques et parasitologiques dans le cadre de la recherche médicale utilisent ces espèces de primates comme modèle expérimental. Il est doté de bâtiments servant de cages pour les gorilles et quelques chimpanzés, des cages externes ou volières pour les autres espèces de primates ; ainsi qu'une enceinte (forêt) clôturée de 4 ha environ où vivent près de 250 primates uniquement les *Mandrills* et les *Macaca sp.* Un autre bâtiment renferme non seulement les bureaux du personnel mais aussi un bloc opératoire suffisamment équipé pour tout acte de médecine sur les animaux. Le personnel est composé de 18 personnes dont 12 animaliers, 2 infirmières, 2 secrétaires et 2 Vétérinaires. Ce personnel est chargé de l'entretien quotidien des locaux, des animaux et du suivi des différents protocoles en collaboration avec les chefs d'unités initiateurs des protocoles. Il faut noter que l'utilisation de ces primates comme modèle expérimental est préalablement soumise à l'approbation par un comité d'éthique. Ce dernier est chargé de juger de l'opportunité de l'étude souhaitée mais aussi, et surtout, du degré de traumatisme qui sera fait aux animaux.

Avec le développement galopant de la ville de Franceville, le CDP, à l'instar de toutes les structures du CIRMF, se retrouve presque « piégé » entre les habitations humaines (**Photo 4**). En effet, il n'est pas rare de voir des maisons du personnel du CIRMF mais aussi de la population de la ville de Franceville situées à moins de 500 m

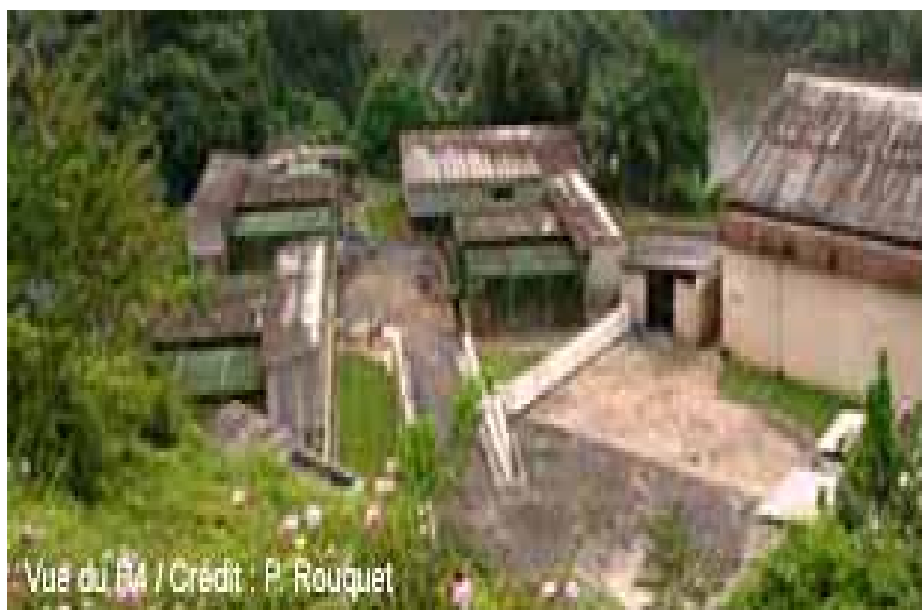
du Centre. Cette situation de quasi proximité entre l'homme et les primates non-humains du CIRMF pourrait donc être à l'origine d'une transmission de maladies telle que le Paludisme, les filarioses endémiques dans la région, de l'homme à l'animal et vice versa.

Notre étude qui s'est déroulée d'octobre 2004 à octobre 2005 se propose de voir quelles peuvent être les conséquences d'une telle proximité dans le cas de la loase humaine.



**Photo 4:** Vue arienne du CIRMF

- a: Forêt clôturée(4ha) divisée en deux enclos gauche et droite
- b: La rivière Mpassa
- c: grand bâtiment du CDP
- d: Les cages extérieures(volières)



**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)  
**Photo 5** : Vue aérienne du B4 et du CDP.



## II. Matériel

### II.1. Sujets étudiés

#### II.1.1. Les mandrills (*Mandrillus sphinx*)

Deux catégories de sujets *mandrill* ont été utilisées. Une première comprenant des primates n'ayant subi aucune intervention. Un total de 140 *Mandrills* ont été prélevés et examinés. La deuxième catégorie comprend 8 *mandrills* ayant fait l'objet d'une inoculation de larves L3 de *L. loa* à différentes doses et suivis durant un an.



Source : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

Photo 6 : les *Mandrillus sphinx* dans la forêt clôturée du CDP

#### II.1.2. Les autres primates

Cette catégorie de primates non-humains comprend des *Chimpanzé* (72), des *Macaca mulatta* (15), des *Macaca cynomolgus* (15), des *Cercocebus torquatus* (3), des *Cercopithecus solatus* (6), des *Chlorocebus aethiops* (4), des *C. nictitans* (1) et des Hybrides (3). Tous ces sujets n'ont fait l'objet d'aucun traitement particulier en dehors des examens médicaux quotidiens et des prélèvements sanguins pour la recherche des microfilaires sanguines.



Crédit : C. Ruoso-Bios



Crédit : C. Ruoso-Bios

**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 7** : *Pan troglodytes* (Chimpanzés) du CDP



Crédit : P. Rouquet



Crédit : B. Salié

**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 8** : *Macaca mulatta* du CDP en cage



Crédit : P. Rouquet



Crédit : P. Rouquet

**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 9** : *Macaca cynomolgus* du CDP en cage

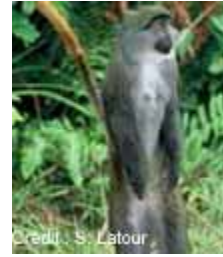


Crédit : S. Latour



**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 10** : *Cercocebus torquatus* du CDP en cage



**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 11** : *Cercopithecus solatus* du CDP dans la forêt clôturée



**Source** : Photo tirée du site [www.cirmf.org/index/html](http://www.cirmf.org/index/html)

**Photo 12** : *Chlorocebus aethiops* du CDP en cage

## II.2. Collecte des sérums des Primates

Elle se fait régulièrement lors du contrôle sanitaire qui consiste à suivre un certain nombre de paramètres (la dentition, la présence de l'implant contraceptif pour les femelles, le tatouage d'identification,...) et à faire des prélèvements sanguins selon les protocoles auxquels sont soumis les animaux. En général, l'animal est endormi à la kétamine (IMALGENE<sup>ND</sup>) à la dose de 10mg/ kg de poids vif. La technique d'anesthésie utilise la Sarbacane ou la Flèche à gicler et de la kétamine (IMALGENE<sup>ND</sup>) est l'anesthésique de choix. Les prélèvements sanguins sont effectués à partir de la veine fémorale gauche ou droite. Quelques fois, des prélèvements des ganglions superficiels (surtout inguinaux) sont réalisés.

Les échantillons de sang d'environ 2ml prélevés dans des tubes EDTA sont acheminés le jour même au laboratoire. L'échantillon de sang est divisé en trois parts dont une servant à la recherche parasitologique, une autre est conservée sous forme de sang total (environ 800µl) et la dernière sert à récupérer du plasma après centrifugation.

### II.3. Collecte de différents stades parasitaires de *L. loa*

- ❖ Les larves infestantes L3 de *L. loa* sont isolées des *Chrysops* naturellement infectés et qui ont été capturés dans les villages situés autour de Franceville au Sud-Est du Gabon. La technique d'extraction utilisée est celle de **Baerman**, modifiée par **Wahl et al. (1995)**.

Les parasites sont stockés dans de l'azote liquide jusqu'à la prochaine utilisation.

- ❖ Les vers adultes de *L. loa* sont extraits par un ophtalmologiste au niveau de la conjonctive de certains patients présentant un passage oculaire. Ces vers adultes sont rapidement conservés dans de l'azote liquide en vue de l'extraction d'ADN ou de protéines.
- ❖ Les microfilaries de *Loa loa* sont récupérées sur un patient présentant une hypermicrofilarémie de 80 000 mf/ml, elles sont ensuite purifiées sur gradient de Percoll suivant la technique décrite par **VAN HOEGAERDEN et al. (1986)**.

## III. Méthodologie

### III.1. Technique d'inoculation des mandrills

Les larves infestantes L3 de *L. loa* sont obtenues à partir des chrysops naturellement infectés capturés puis disséqués au laboratoire. Les larves L3 vivantes et actives sont comptées et remises en suspension dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS). A l'aide d'une seringue de 10ml, les animaux préalablement endormis à la kétamine (IMALGENE<sup>ND</sup>), sont inoculés par voie sous-cutanée à différents endroits de la poitrine et des membres.

## **III.2. Mise en évidence de microfilaires dans le sang**

### **III.2.1. L'examen direct**

C'est une approche de quantification de microfilaires qui se fait par microscopie optique standard. Ainsi, 10µl de sang additionné à une goutte de saponine sont systématiquement examinés au microscope. En cas de positivité, le résultat du compte est multiplié par un facteur 100 et le résultat obtenu est le nombre de microfilaires par ml. Tous les échantillons dont l'examen direct se révèle négatif, sont réexaminés après leucoconcentration.

### **III.2.2. La leucoconcentration**

C'est une technique qui permet de concentrer les microfilaires lorsque la microfilarémie est relativement faible. Dans un tube conique de 15 ml, le mélange suivant est réalisé : 1 ml de sang est ajouté à 9ml de tampon PBS contenant 2% de saponine. Ce mélange est incubé à température ambiante pendant 5 min, période durant laquelle les hématies sont lysées par la saponine (**HO THI et PETITHORY, 1963**). Après une centrifugation de 10 min à 3000 tours/min le surnageant est éliminé, puis le culot examiné en microscopie pour déterminer la présence de microfilaires. Le comptage des microfilaires obtenues permet d'avoir le taux de microfilarémie par millilitre.

## **III.3. Préparation des antigènes parasitaires bruts**

Les vers adultes et les larves L3 de *L. loa* sont lavés puis broyés en milieu contenant du Phosphate buffer saline (PBS) à l'aide d'un homogénéisateur (Potter). Les microfilaires, après isolement sur gradient de Percoll (Pharmacia, France), sont soniquées (sonicateur Bioblock) en tampon PBS. Les produits de la sonication ou de l'homogénéisation, constitués d'antigènes à différents stades parasitaires, sont extraits pendant 1h, à 4°C au moyen d'une solution contenant, 1% de Deoxycholate de

sodium, 10mM Tris-HCl(pH8.3), des inhibiteurs de protéases. Ces extraits d'antigènes sont ensuite centrifugés à 10 000 tours/min pendant 10 min à +4°C. Le surnageant contient alors des antigènes parasitaires solubles. Les protéines sont ensuite dosées à l'aide d'un kit de dosage protéique Bio-rad (RICHMOND, CA). La préparation ainsi obtenue est aliquotée et stockée à -20°C.

Pour l'analyse par Western Blot, tous les stades parasitaires ont été homogénéisés ou soniqués, puis extraits pendant 5 min à 100°C dans une solution de chargement (Voir annexe 13).

#### **III.4. Dosage des protéines**

Le dosage des protéines est effectué en utilisant la méthode de Bradford (Bio-Rad *protein Assay*). Une solution standard de 10 mg/ml d'albumine bovine sérique (Bio-Rad) a été préparée en 7 concentrations différentes (de 0 à 20 mg/ml) utilisées pour le tracé d'une courbe standard. Les protéines ont été ensuite diluées par un facteur de 10 afin de ne pas dépasser la limite de précision de la méthode. La densité optique a été déterminée à 595 nm sur un spectrophotomètre. La détermination de la quantité de protéine se fait en comparant les densité optiques (DO) des échantillons et celles de la gamme standard.

#### **III.5. Technique Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)**

Les anticorps présents dans les sérums des primates sont détectés à l'aide d'extraits bruts d'antigènes parasitaires.

La méthode utilisée est celle d'**Engevall** et **Perlmann (1971)** modifiée. Les plaques (Immunolon II, Dynatech Laboratories, Chantilly, Va) sont sensibilisées une nuit à 4°C par l'antigène dilué dans du tampon bicarbonate pH9.6, à raison de 100µl/puits. Après 3 lavages de 10 min à température ambiante dans du tampon TBS-Tween (Voir annexe 3), les sites non occupés par les protéines sont saturés par du tampon TBS-T-

5% BSA (voir annexe 4 ), pendant 1h à température ambiante (TA). Les étapes de lavage sont répétées pendant 3fois 10 min en TBS-T, puis les plaques sont incubées 1h à TA en présence de sérums de *mandrills* (1/800) et des autres primates non-humains (1/800) dilués dans du TBS-T-1% BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma). Pour la détection des IgG totaux spécifiquement fixés, les plaques sont incubées 1h à TA en présence de 100µl/ puits de l'anticorps anti-human IgG (Fc-specific) conjugué à la phosphatase alcaline dilué à 1/1000 (Sigma, St.Louis).

### **III.6. Electrophorèse sur gel polyacrylamide (SDS-PAGE)**

La séparation des protéines est réalisée dans les conditions dénaturées selon la méthode décrite par Laemmli (1970) à l'aide de l'appareil « mini Protean II » (Bio Rad). Les protéines sont diluées au demi dans une solution de chargement (voir annexe 13), puis chauffées à 100°C pendant 5 min avant d'être séparées en fonction de leur poids moléculaire.

Le gel de polyacrylamide est composé d'un gel de concentration de 5% d'acrylamide qui permet de concentrer les protéines, puis d'un gel de résolution de 15% d'acrylamide qui permet de séparer les protéines.

La migration des protéines se fait pendant 1h à 200V dans du tampon d'électrophorèse (Voir annexe 14) jusqu'à ce que le front de migration atteigne 1cm par rapport au bas du gel.

### **III.7. Western Blot**

Après séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le gel est incubé pendant 15 min dans le tampon de transfert (Voir annexe 17). Les protéines contenues dans le gel sont transférées sur feuille de papier de nitrocellulose, dans un tampon de transfert, pendant 1h à 100V (TOWBIN et *al.*, 1979). Les feuilles de nitrocellulose sont colorées au rouge ponceau (Sigma) afin de contrôler si le transfert s'est bien réalisé et de visualiser les bandes. A l'aide d'un scapel, la

membrane de nitrocellulose est découpée en bandelettes, afin de séparer les différents échantillons déposés dans les puits.

Les sites non spécifiques de fixations des protéines de la membrane sont saturés par incubation de ces bandelettes dans du TBS-T-3% BSA, 1h à TA. Après 3 lavages au TBS-T, les bandelettes sont incubées sous agitation toute la nuit à 4°C, avec les différents sérums dilués dans du TBS-T-1% BSA. Les anticorps non fixés sont éliminés après 3 lavages supplémentaires de 5 min. Les bandelettes sont ensuite incubées pendant 1h à TA avec le 2<sup>ème</sup> anticorps, anti-human IgG (Fc-specific) alcaline phosphatase conjugate (dilué à 1/1000). Après 3 derniers lavages, la révélation des anticorps liés s'effectue en présence d'une solution contenant : (BCIP 0.015 mg/ml, NBT 0.03mg/ml, 1M de Tris-HCl et 500 mM de MgCl<sub>2</sub>). La réaction est arrêtée par rinçage à l'eau distillée.

### **III.8. Analyse statistique des données**

Des tests non paramétriques comme le Mann Whitney U-test ont été utilisé pour comparer les valeurs médianes et la différence entre les valeurs moyennes de deux groupes de données. Une valeur de  $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative.



## **CHAPITRE II : Résultats**

### **I. Etudes de la réponse immunitaire dans le model *Mandrill sphinx/L. loa***

Huit (8) *mandrills* ont été infectés avec respectivement des doses de 1000 larves L3 de *Loa loa* en une injection et de 250 larves L3 en quatre injections, 100 larves L3 en une inoculation et 25 larves L3 en quatre inoculations en raison de deux animaux par dose. Le sang veineux a été prélevé pendant une période d'un an avant, pendant et après l'infection suivi d'une recherche systématique de microfilaires dans le sang à chaque prélèvement. Alors que les IgG anti *loa loa* ont été mesurés dans le sérum ou le plasma à la même date, suivi de l'identification des antigènes reconnus par Western blot.

#### **I.1. La recherche des microfilaires**

La recherche de microfilaires chez les animaux infectés a été effectuée de jour par une technique de Leucoconcentration. Les animaux ont été prélevés une fois par mois avant et après inoculation. Puis au centième jour après inoculation, les animaux sont prélevés une fois par semaine pour rechercher les microfilaires jusqu'au quatrième mois (période de patence) après apparition des microfilaires. Le reste du temps, les animaux ont été prélevés une fois par mois jusqu'à la fin du protocole.

Il apparaît qu'il n'y a pas de différence significative dans le temps d'apparition des microfilaires dans le sang périphérique soit 154, 156, 156 et 176 jours après infection respectivement pour les doses de 1000L3x1 ; 250x4 ; 100x1 et 25x4, quoique le temps soit légèrement plus long pour les animaux ayant reçu la dose de 25L3x4 par rapport aux autres (**Tableau 2**). Par ailleurs la densité de microfilaires varie sur le plan individuel chez tous les animaux, avec une tendance à l'élévation de la densité de microfilaires pour les doses de 1000L3x1, suivi de 100L3x1 ; 250x4 et 25x4 respectivement. Cependant, ces différences ne sont pas significatives sur le plan statistique ( $p < 0,05$ ).

**Tableau II** : Relation dose et réponse parasitologique

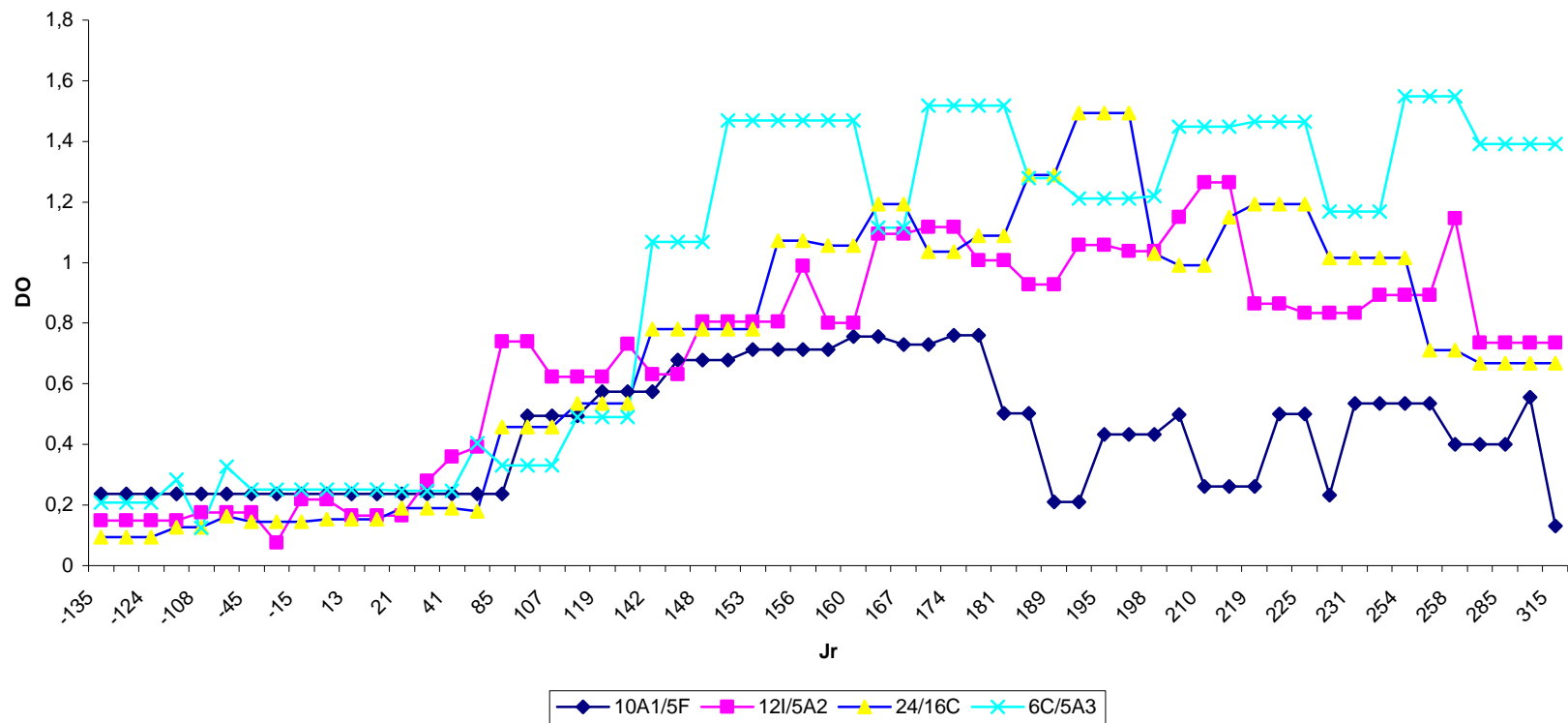
Animal	Dose/L3	Patence (jours)	Densité moyenne de microfilaires (mf/ml)
10A1/5F	1000x1	154	929 (0-11700)
12I/5A2	250x4	156	49 (0-567)
16C/24	100x1	156	175 (0-2300)
5A3/6C	25x4	176	21 (0-105)

## **I.2. Analyse quantitative par ELISA de la réponse humorale**

Une étude longitudinale par ELISA consistant à mesurer les IgG anti microfilaires de *Loa loa* a été effectuée sur tous les animaux ayant reçu différentes doses de L3.

Il apparaît que les IgG s'élèvent de manière progressive de la prépatence à la patence où ils atteignent un maximum variant avec la dose. La réponse en IgG étant plus faible chez les animaux ayant reçu la dose de 1000L3x1 par rapport à tous les autres animaux soit  $p < 0,001$  comparé à tous les autres groupes.

Au contraire, les animaux ayant reçu la dose de 25L3x4 ont des quantités plus fortes d'IgG anti microfilaires par rapport à ceux ayant reçu les doses 250L3x4 ; 100L3x1 ; bien que ces différences ne soient pas statistiquement significatives.



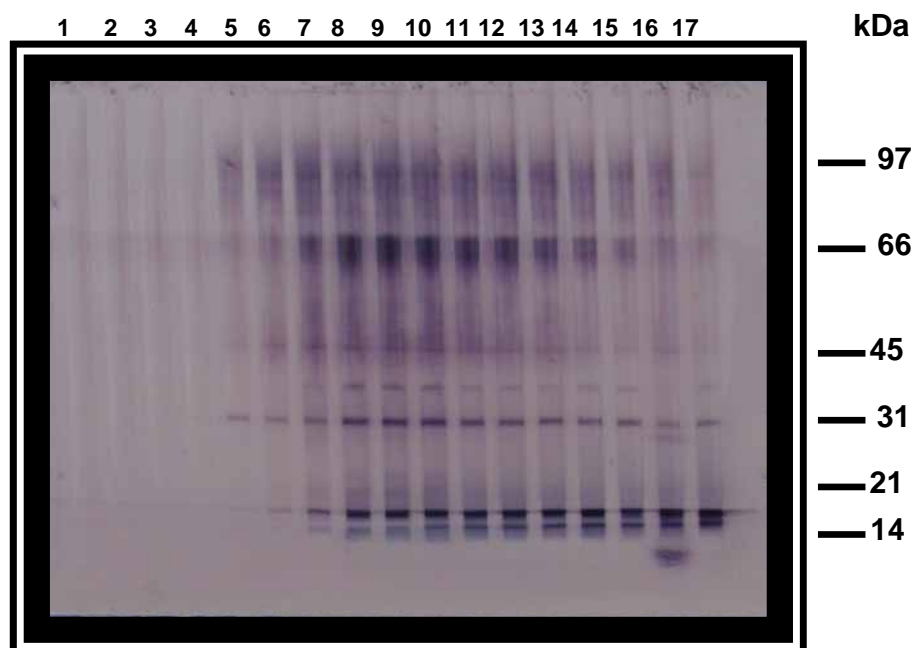
**Figure 5** : Cinétique des IgG spécifiques de microfilaires *L. loa* chez les *Mandrills* inoculés par différentes doses de larves L3.

Les IgG spécifiques de microfilaires *L. loa* ont été mesurés par ELISA dans les sérums de *Mandrill* pris à différents temps avant, pendant et après infection. Les courbes exprimant les niveaux d'IgG en Densité optique (DO) en fonction du temps (Jr) ont été construites par groupe d'animaux ayant reçu une même dose :

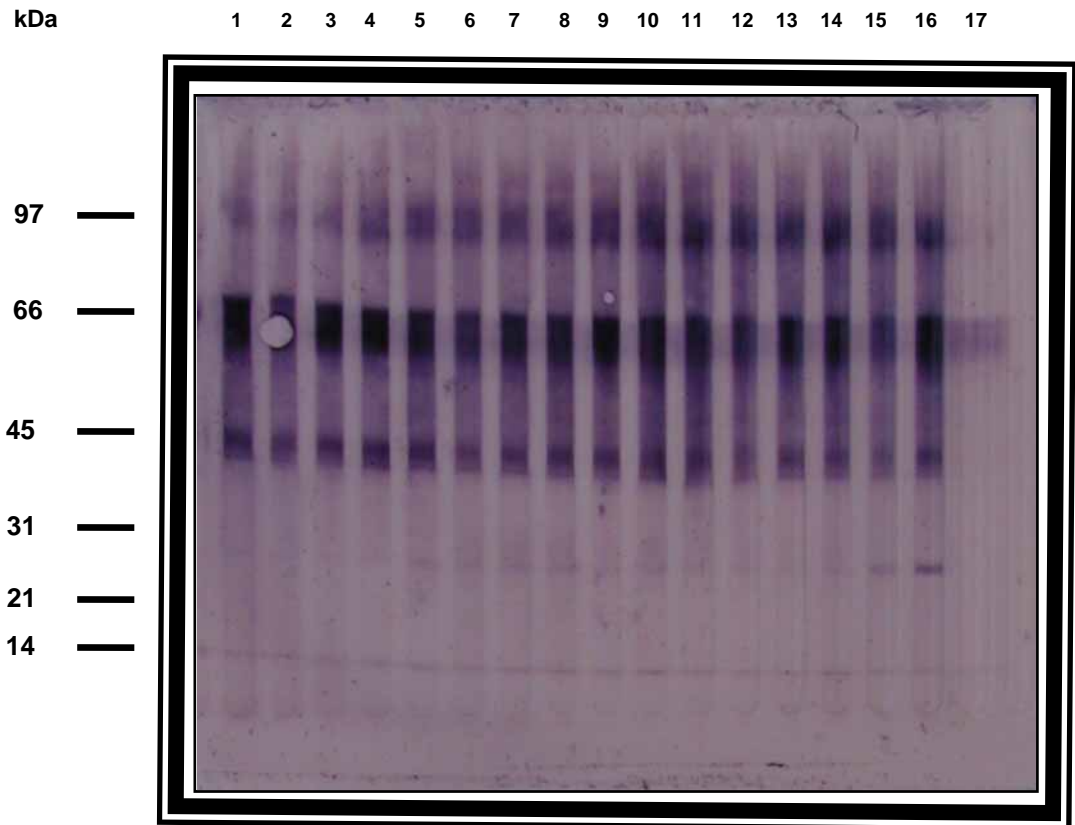
- 10A1/5F ayant reçu 1x1000L3
- 12I/5A2 ayant reçu 4x250L3
- 24/16C ayant reçu 1x100L3
- 6C/5A3 ayant reçu 4x25L3

### I.3. Analyse qualitative par Western blot

L'analyse longitudinale de la reconnaissance des antigènes de microfilaires par les IgG des *mandrills* infectés par différentes doses de Larves L3 de *L. loa* montre que ceux-ci reconnaissent un large nombre d'antigènes variant de 104 kDa à moins de 10 kDa. La fréquence de reconnaissance des antigènes de poids moléculaires de 100, 66, 45, 30, 22, 14 et 11 est très élevée chez tous les animaux infectés quelque soit la dose (**figure 6**). Cependant les molécules de poids moléculaire de 14 kDa ne se rencontrent que chez les animaux ayant développé une microfilarémie. Tandis que les animaux 6C (25L3x4) et 10A1 (1000L3x1) (**figure 7**) n'ayant pas développé une microfilarémie pendant l'année de suivi ne reconnaissent pas cette molécule et même certaines molécules telles que : 11, 22 et 30 kDa.



**Figure 6:** Reconnaissance des antigènes de microfilaires par un *Mandrill* avec infection patente. L'antigène a été séparé en SDS-PAGE (15%) puis transféré sur papier Nitrocellulose, suivi d'une incubation avec les sérums de *Mandrill* dilué au 1/800<sup>e</sup>, suivi de lavage puis une incubation avec un conjugué anti IgG humain marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/1000<sup>e</sup>. Ainsi de la ligne 1-4 : sérum avant infection (respectivement J -131, -108, -62, -4), ligne 5-17 : sérum après inoculation (respectivement J 25, 61, 89, 145, 154, 160, 166, 173, 180, 194, 208, 223, 254). Les poids moléculaires de référence sont à droite et exprimés en kDa. Les chiffres au dessus indiquent les lignes correspondant aux différents échantillons prélevés à différentes dates du suivi.



**Figure 7:** Reconnaissance des antigènes de microfilaries dans une infection non patente.

Résultat typique obtenu avec les sérums du *Mandrill* 10A1 n'ayant pas développé une infection patente. L'antigène séparé par SDS-PAGE et transféré par Blotting sur papier Nitrocellulose suivi d'une incubation avec le plasma de *Mandrill* dilué au 1/800<sup>e</sup> et les bandes sont révélées à l'aide d'un conjugué anti IgG humain marqué à la phosphatase alcaline dilué au 1/1000<sup>e</sup>. Les poids moléculaires de référence sont à droite et exprimés en kDa. Les chiffres au dessus indiquent les échantillons prélevés à différentes dates pendant le suivi.

## II. Recherche des infections naturelles par la *Loa loa* humaine chez les primates non-humains du CDP

### II.1. Recherche de la filaire *L. loa* à l'examen parasitologique direct

Le sang prélevé au CDP sur les différentes espèces de primates est envoyé quotidiennement au laboratoire pour la recherche systématique de microfilaires de *L. loa*.

En définitif, 259 primates ont été prélevés et leur sang a été examiné directement au microscope et après leucoconcentration. Il apparaît que sur le plan parasitologique, sur les 259 primates étudiés (**Tableau III**) aucun primate n'a de microfilaires de *L. loa* dans le sang périphérique prélevé le jour, alors que deux *Chimpanzés* présentaient des microfilaires de *Mansonnella sp.* dans le sang périphérique.

**Tableau III** : Résultat parasitologique chez les primates non-humains du CDP

Espèce de Primates	Nombre	Parasites (Filiaires)
<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzé)	72	<i>Mansonnella sp</i>
<i>Mandrillus sphinx</i>	140	0
<i>Macaca rhésus</i>	15	0
<i>Macaca cynomolgus</i>	15	0
<i>Cercopithecus solatus</i>	6	0
<i>Cercopithecus aethiops</i>	4	0
<i>Cercopithecus nictitans</i>	1	0
<i>Cercocebus torquatus</i>	3	0
Hybrides : <i>C. cephus</i> x <i>C. nictitans</i>	3	0
Total	259	2

## **II.2. Caractérisation de deux méthodes sérologiques de diagnostic de *Loa loa* chez les primates**

Les résultats sur l'infection expérimentale ont montré la susceptibilité de *Mandrillus sphinx* à la *Loa loa* humaine. En utilisant l'antigène de microfilaire, il a été possible d'analyser la réponse humorale induite par cette infection. Cette étude a révélé une augmentation progressive des IgG anti microfilaires et leur persistance pendant la patence. De même la détection de certains antigènes par Western blot était constante quelque soit la dose de larve L3 ou la densité de microfilaires. Cette persistance et cette constance de la réponse humorale peuvent être exploitées dans le cadre de la recherche d'un réservoir naturel de *Loa loa* ou de l'influence de la pression humaine sur la santé des primates lesquels bénéficient actuellement d'une protection. Pour ce faire il s'agira dans cette partie du travail de :

- ❖ établir les critères de positivité et de négativité d'un diagnostic utilisant la réponse humorale en dehors de l'examen parasitologique par la Leucoconcentration.
- ❖ établir à l'aide de la méthode diagnostic mise au point la prévalence des anticorps anti *loa loa* chez les primates non-humains du Centre de Primatologie du CIRMF.

### **II.2.1. La méthode ELISA**

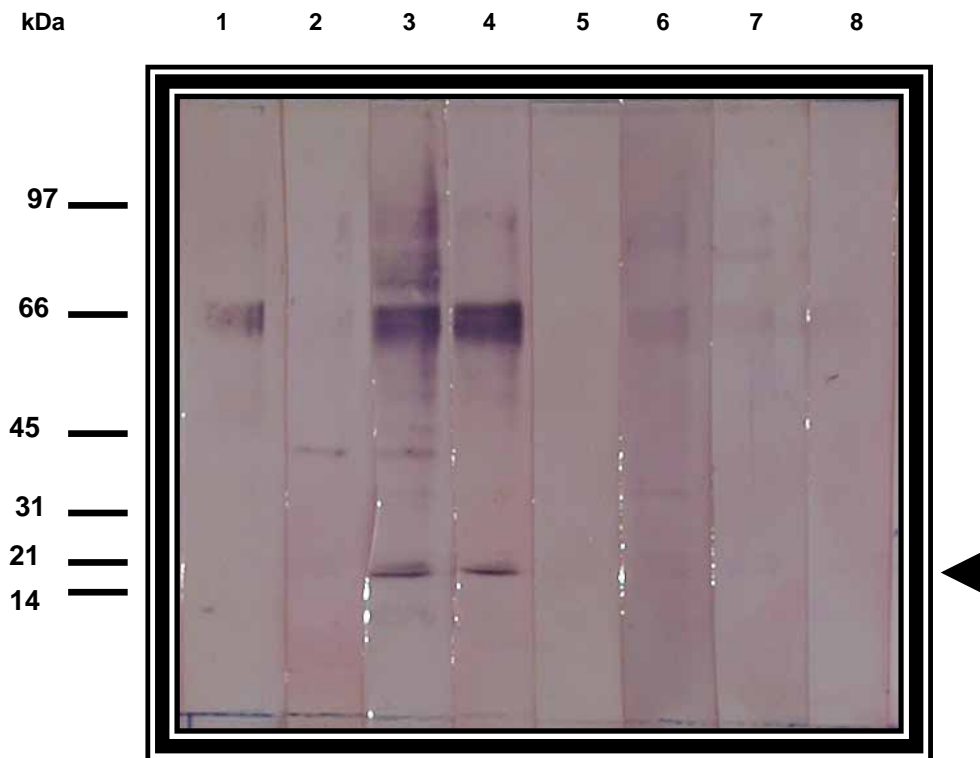
La méthode ELISA a été utilisée selon la procédure décrite plus haut. Les sérums des *mandrills* avant l'infection expérimentale ont été utilisés comme contrôle négatif au cours de 10 expériences séparées, de même les sérums de *mandrills* ayant une infection patente donc considérés comme témoins positifs ont également été utilisés. Le seuil de positivité pour qu'un échantillon soit considéré comme positif a été défini en faisant les moyennes des densités optiques (DO) des sérums négatifs au cours de 10 essais plus cinq (5) déviations standards soit  $x = 0,128 \pm 0,042$  et le seuil

défini est  $DO = 0.338$ . Ainsi tout animal ayant une  $DO > 0.338$  est considéré positif en Anticorps anti *Loa loa* par ELISA.

### II.2.2. Deuxième méthode : le Western blot

Pour réduire le nombre de faux positifs liés surtout aux réactions croisées avec d'autres nématodes, une seconde méthode a été définie. Il s'agit de Western blot. Ainsi la réactivité par Blot de différents primates a été comparée pour définir les antigènes reconnus spécifiquement par les primates ayant une infection patente de *loa loa*. Pour ce faire, la réactivité des *mandrills* infectés expérimentalement avec la *loa loa* humaine (**figure 8, ligne 3 et 4**) aux antigènes de microfilaires a été comparée à la réactivité des *mandrills* infectés naturellement par une *Loa simienne* (**figure 8, ligne 2**), des *chimpanzés* infectés naturellement par une espèce de *Mansonnella sp* (**figure 8, ligne 6 et 7**) et d'un *chimpanzé* non infecté (**figure 8, ligne 5**).





**Figure 8:** Spécificité des antigènes de microfilaries *Loa loa*.

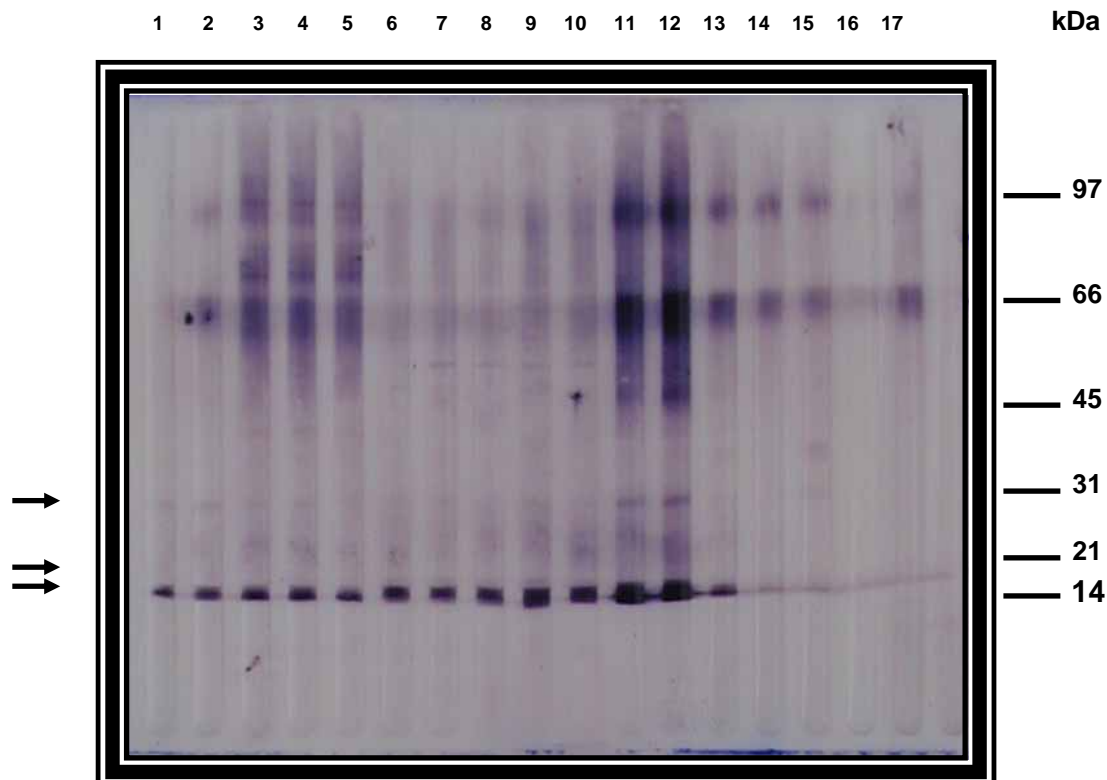
Un Western Blot utilisant les sérums de deux *Mandrill* sains (ligne 1 et 8), un *Mandrill* infecté naturellement par *Loa simienne* (Ligne 2), deux *Mandrills* infectés par la Loase humaine (Ligne 3-4), un Chimpanzé non infecté (Ligne 5), deux Chimpanzés infectés par *Mansonnella sp* (Ligne 6-7). Tous les sérums sont dilués à 1/800 et la révélation se fait à l'aide d'un conjugué anti IgG humain marqué à la phosphatase alcaline dilué à 1/1000. Les poids moléculaires sont indiqués à gauche. La flèche à droite indique la position de 14-10 kDa

L'expérience révèle que les *mandrills* infectés par la loase humaine reconnaissent une série d'antigènes de poids moléculaires (104, 66, 45, 30, 22 et 14 kDa). Par contre les *mandrills* ayant une infection naturelle de *Loa simien* ne réagissent qu'avec l'antigène 45 kDa de même que les Chimpanzés infectés par *Mansonnella sp*. Mais aucun animal non infecté par la loase humaine ne réagit avec les antigènes de poids moléculaires < à 20 kDa en l'occurrence la 14 kDa.

Une seconde expérience permettant le suivi de *mandrill* à forte densité de microfilaries (**figure 9, ligne 1-5**), à faible densité de microfilaries (**figure 9, ligne 6-**

10) et un autre animal pendant la patence (**figure 9, ligne 11-12**) et la fin de l'infection (**figure 9, ligne 13-15**).

Cette expérience révèle la persistance de la reconnaissance des antigènes de microfilaires à faible poids moléculaire < 20 kDa quelque soit le niveau de microfilaires, d'une part, et de la disparition de ces anticorps à la fin de l'infection d'autre part (**figure 9, ligne 13-15**).



**Figure 9:** Cinétique de reconnaissance des antigènes de microfilaires par les *Mandrills* infectés.

Western Blot avec les antigènes de microfilaires séparés sur gel de 15%. Les sérums de *Mandrill* à forte microfilarémie (Ligne 1-5), de *Mandrill* à faible microfilarémie (Ligne 6-10), de *Mandrill* en pleine patence (Ligne 11-12) et à la fin de l'infection (Ligne 13-15), deux *Mandrill* témoins non infectés (Ligne 16-17). Les poids moléculaires sont indiqués à droite. La position de 30, 20, 14 kDa sont respectivement indiqués à gauche.

Au vu de ces résultats, on peut affirmer que tout animal examiné au Blot est considéré comme positif s'il reconnaît les antigènes de microfilaires au poids moléculaire < 20 kDa.

### II.3. Prévalence des Anticorps anti loa loa chez les primates non-humains du CDP

La détermination de la prévalence des anticorps anti *loa loa* s'est faite en combinant les deux méthodes d'analyse : l'ELISA et le Western blot. Tous les échantillons sont analysés par ELISA et ceux trouvés positifs selon les critères définis plus haut pour l'ELISA sont passés en Western blot pour confirmation. Par Western blot, seuls les animaux ayant réagi avec les antigènes de microfilaires < 20 kDa sont considérés positifs. Finalement n'est reconnu comme positif pour les anticorps anti *loa loa* que tout animal positif en ELISA ayant réagit avec les antigènes de microfilaires < 20 kDa par Blot. Ainsi, l'examen sérologique des mêmes primates révèle que 9 d'entre eux avaient des anticorps anti *Loa loa* (soit une prévalence de 3,475%) (**Tableau IV**).

**Tableau IV** : Résultat sérologique chez les primates non-humains du CDP

Espèces de Primates	Anticorps anti <i>Loa loa</i>	Pourcentage (%)	Localisation	Durée moyenne de vie au CDP
<i>Pan troglodytes</i> (Chimpanzé)	6	8.333	B1 (2), B2 (2), B3 (2)	17ans
<i>Mandrillus sphinx</i>	3	2.143	EG(T), ED(NA), Bakoumba(12A10)	8ans
<i>Macaca rhésus</i>	0	0		7ans
<i>Macaca cynomolgus</i>	0	0		12ans
<i>Cercopithecus solatus</i>	0	0		10ans
<i>Cercopithecus aethiops</i>	0	0		8ans
<i>Cercopithecus nictitans</i>	0	0		Inconnu
<i>Cercocebus torquatus</i>	0	0		7ans
Hybrides: <i>C. cephus</i> x <i>C. nictitans</i>	0	0		Inconnu

Parmi les primates trouvés positifs à la *Loa loa*, il y'avait 6 *Chimpanzés* (8,33 %) et 3 *Mandrillus sphinx* (2,143%). En dehors de ces deux espèces, aucune autre n'a été trouvé positive. Il est à noter que tous les *Chimpanzés* positifs vivent en captivité dans le grand bâtiment. Alors que les *Mandrills* positifs se trouvent dans la forêt clôturée. La durée de vie moyenne de ces animaux est plus élevée chez les *Chimpanzés* (17ans) par rapport aux *Mandrills* (8ans).

### **CHAPITRE III : Discussion**

Dans ce travail, la réponse humorale a été analysée d'abord chez les *mandrills* infectés expérimentalement par différentes quantités de larves infestantes. Ensuite les résultats de cette analyse ont servi à établir la prévalence sérologique des anticorps anti *Loa loa* chez les primates non-humains résidant au Centre de Primatologie (CDP) du CIRMF. La recherche de l'existence de *Loa loa* revêt une double importance, d'abord dans la recherche d'un réservoir de ce parasite qui non seulement est à l'origine d'encéphalite mortelle chez l'homme, mais aussi empêche le contrôle par chimiothérapie d'autres maladies débilitantes telle que l'Onchocercose. Or *Mandrillus sphinx* est un primate en abondance dans cette région et est susceptible expérimentalement à la *Loa loa*. D'autre part, le *Mandrillus sphinx* possède une espèce propre de *Loa loa* ou *Loa simienne* qui diffère de l'espèce humaine par la périodicité de ses microfilaires. Sa périodicité est nocturne alors que la *Loa loa* humaine a une périodicité diurne. A ce jour, la pression humaine sur l'environnement est intense pour des raisons économiques par l'exploitation forestière dans la région ce qui réduit l'habitat des primates en général et du *mandrill* particulièrement. Le *Mandrill* est une espèce en danger à cause de la consommation excessive de la viande de brousse et des maladies qui pourraient être contractées du fait de la proximité avec l'homme. Dans plusieurs régions du Gabon, les primates *Mandrills* partagent les mêmes points d'eau avec les hommes. Compte tenu de ce contact, les parasites constituent les maladies les plus courantes susceptibles d'être transmises d'une espèce à l'autre. Ils peuvent donc servir d'indicateur du degré de contact entre les espèces. Si les parasites intestinaux peuvent être facilement rechercher par l'utilisation des fèces récoltés dans la nature, il n'en est pas de même pour les parasites sanguins dont pour certains leur portage peut être fatal à l'animal. L'étude de ces parasites est donc difficile dans la nature. C'est pourquoi le CDP du CIRMF situé en plein centre ville entouré par une population humaine avec transmission de plusieurs parasites sanguins constitue un lieu idéal pour examiner l'existence de parasites humains chez les singes ou la possibilité de transmission de maladies entre les primates non-humains et les humains. En effet, le

Centre dispose d'installations qui simulent toutes les situations possibles dans lesquelles peut se trouver un animal face à l'homme :

- ❖ en captivité dans des cages ouvertes : le CDP possède des cages ouvertes entre lesquelles circulent de jour comme de nuit les hommes
- ❖ en captivité dans des maisons : Le CDP dispose d'un grand bâtiment avec chambres couvertes dans lesquelles sont logés les animaux
- ❖ libre dans la nature : le CIRMF dispose d'une forêt clôturée où vivent de colonies des primates comme partout ailleurs dans la nature.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la filaire *Loa loa* chez les primates. L'espèce naturelle du *mandrill* *Loa simienne* est nocturne. Ses manifestations cliniques sont inconnues alors que son homologue humain, *Loa loa*, provoque des oedèmes et des encéphalites mortelles et peut devenir une maladie systémique par atteinte rénale, cardiaque. Et comparativement il serait plus facile d'utiliser la *Loa loa* humaine diurne, infectant le *Mandrill* pour comprendre la physiopathologie de la loase humaine ou les mécanismes immunologiques liés à cette infection. D'autant plus que le *Mandrill* infecté par la *loa* humaine présente le même spectre que l'infecté humain à savoir le statut d' microfilarémique ou de microfilarémique. La conséquence serait le développement des moyens de prévention bénéfiques à la fois pour l'Homme et l'animal (Vaccins, médicaments).

L'infection expérimentale par doses différentes a démontré qu'il y a une dépression de la réponse immunitaire lorsque le nombre de larves reçues est élevé, alors que le nombre de microfilaires circulantes dans le sang périphérique s'élève avec le nombre de larves reçues et la fréquence d'inoculation. Bien que non significative sur le plan statistique, cette tendance est cependant notable et reste non significative à cause des variations individuelles. Cette situation de réponse immunitaire déprimée est conforme à celle que **AKUE et al. (2000)** ont décrite chez l'homme en comparant la

réponse immunitaire des populations exposées à différentes intensités de transmission. La dépression de la réponse immunitaire chez les *Mandrills* a été démontrée par **LEROY et al. (1997)**. Mais la relation entre la dose et la réponse immunitaire n'a pas été étudiée.

L'approche consistant à combiner l'ELISA et le Western Blot n'est pas surprenante pour poser le diagnostic d'une affection donnée. Cette approche est encore utilisée dans les infections HIV. Cependant, en ce qui concerne la *L. loa* il n'y a pas de kit standard servant pour l'ELISA ou le Western Blot. Il a donc été nécessaire de mettre un tel système au point en utilisant les extraits bruts de parasites. Seuls les extraits de microfilaries réunissaient les meilleurs critères : abondance, disponibilité et moins de réactions croisées ; ce qui justifie ce choix par rapport aux extraits de vers adultes et de larves L3. Les antigènes recombinants en production au Laboratoire auraient constitué l'idéal pour le diagnostic de *L. loa* chez les primates. Mais la méthode n'est pas encore complètement caractérisée notamment en ce qui concerne les possibles réactions croisées avec *O. volvulus* ou les autres filaires dermiques. Or au cours de cette étude, nous n'avons pas recherché les filaires dermiques qui pourraient infecter les primates.

La prévalence des anticorps anti *Loa loa* chez les primates du CDP indique la possibilité d'une transmission de ce parasite au primate. Cependant le fait qu'aucune microfilarie n'ait été vue peut signifier l'arrêt du développement du parasite soit par la rate ; en effet **ORIHÉL et al. (1985)** ont démontré l'implication de la rate non seulement dans la suppression de microfilaries mais aussi dans le contrôle de la microfilarémie. Ils ont constaté que les densités de microfilaries après splénectomie étaient plus importantes qu'avant splénectomie indépendamment de la dose de larves L3 reçues et de l'espèce de primate inoculé ; soit que ce parasite est contrôlé de telle sorte que la parasitémie soit très basse. Il peut avoir aussi une protection croisée avec la loase simienne. Dans tous les cas, ces résultats indiquent que la probabilité d'une transmission de la loase humaine aux primates non-humains reste faible, mais possible dans cette région caractérisée par une forte variabilité de la transmission potentielle

annuelle (ATP) de larves *L3*. En effet, les études entomologiques menées dans la région ont montré que la ville de Franceville présente une faible ATP par rapport aux villages Okoumbi et Ndjokaye situés respectivement en forêt et en savane et à plus de 100 Km de Franceville avec chacune une ATP de 9000 et 1300 *L3* par an (**AKUE et *al.*, 2002**).



# CONCLUSION

La filaire *Loa loa* est le parasite agent de la loase qui a été pour la première fois observée et extraite de l'œil d'une esclave africaine sur l'île de Saint-Domingue par **MONGIN (1770)**. En 1894, **GUYON** retrouva cette filaire au Gabon. Elle est très répandue dans le bloc forestier de l'Afrique équatoriale. Elle représente la troisième cause de consultation en milieu rural dans certains pays de cette région d'Afrique.

La filariose à *L. loa* est une helminthiase cutanéomuqueuse et sanguicole. Elle est transmise à l'homme par la piqûre d'un taon, du genre *Chrysops* qui est très abondant dans la canopée des forêts. Le réservoir du parasite reste jusqu'à ce jour inconnu.

Cette filaire pose des problèmes divers allant des simples prurits, oedèmes de Calabar, atteinte oculaire, rénale, cardiaque aux encéphalites mortelles. La Diéthylcarbazine (Notézine<sup>ND</sup>) ou l'Ivermectine (Mectizan<sup>ND</sup>) utilisés dans le traitement de cette filariose ne sont efficaces que sur les microfilaries, mais pas très actifs sur les vers adultes. D'où la nécessité de rechercher d'autres méthodes de traitement ou de contrôle. Le diagnostic actuel est basé sur la détection de microfilaries dans le sang, alors que 70% de personnes infectées n'ont pas de microfilaries dans le sang. En conséquence, il y a nécessité de rechercher d'autres méthodes de diagnostic.

Par ailleurs, les études immunitaires menées dans le cadre de cette filariose ont montré que la réponse immunitaire est caractérisée par :

- ❖ une réduction importante de la prolifération in vivo de lymphocytes T des individus microfilarémiques en réponse aux antigènes filariens (**OTTESEN et al., 1977**)
- ❖ une faible production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B des sujets microfilarémiques (**NUTMAN et al., 1987b**)

L'objectif de notre étude a donc été d'évaluer non seulement l'effet de la dose ou quantité de larves L3 reçues sur la réponse immunitaire de *Mandrills* infectés mais

aussi les conséquences de la proximité Homme/primates non-humains dans la transmission de la loase.

Ainsi, 8 *Mandrills* ont fait l'objet d'un suivi parasitologique et immunologique durant près d'un an après inoculation à différentes doses de larves L3 ; auxquels s'ajoutent 259 primates non-humains du Centre de Primatologie du CIRMF simplement prélevés durant un an et ayant fait l'objet des mêmes analyses. Deux méthodes diagnostics ont été utilisées à cet effet : l'ELISA et le Western Blot. Tous les tests ayant été réalisés avec des plasmas dilués au 1/800°. Il apparaît clairement de l'étude longitudinale qu'il n'y a pas de différence significative dans le temps d'apparition de microfilaries dans le sang périphérique. L'infection expérimentale par des doses différentes a démontré qu'il y a une dépression de la réponse immunitaire lorsque le nombre de larves L3 reçues est élevé, alors que le nombre de microfilaries circulantes dans le sang périphérique s'élève avec le nombre de larves reçues. De même, l'analyse longitudinale de la reconnaissance des antigènes de microfilaries par les IgG de *Mandrills* infectés par différentes doses de larves L3 de *L. loa* montre que ceux-ci reconnaissent un large nombre d'antigènes variant de 104 kDa à moins de 10 kDa. Avec la particularité que seuls les animaux ayant développé une microfilarémie reconnaissent les antigènes de poids moléculaire  $< 20$  kDa. Ceci malgré la différence de dose.

Parmi les 259 primates prélevés, 105 ont présenté à l'ELISA des densités optiques élevées ( $DO > 0.338$ ). Au nombre desquels, nous avons : 32 *Chimpanzés*, 58 *Mandrillus sphinx*, 10 *Macaca mulatta*, 3 *Macaca cynomolgus*, 1 *Cercocebus torquatus* et 1 hybride. Cependant, suivant les critères de positivité définis à partir des deux méthodes de diagnostic utilisées (ELISA et Western Blot), seuls 6 *Chimpanzés* (soit une prévalence de 8,33%) et 3 *Mandrills* (soit une prévalence de 2.143%) étaient séropositifs. Au total, 9 primates du CDP étaient séropositifs soit une prévalence générale de 3,475 %.

Parmi les 9 primates du CDP séropositifs à la *L. loa*, les trois (3) *Mandrills* vivent dans la forêt clôturée et les six (6) *Chimpanzés* sont en captivité dans le grand bâtiment au

CDP. Le sexe femelle semble le plus susceptible à la loase humaine. Car 8 de 9 primates séropositifs sont femelles (soit une prévalence d'environ 90%). De même, il apparaît que plus on met du temps au CDP (pour ce qui est des *Mandrill* et *Chimpanzé*), plus on est susceptibles à la loase.

Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer d'une part qu'il y a une relation entre la quantité de larves L3 de *L. loa* reçue et la réponse humorale de *Mandrill*, et d'autre part, que les primates non humains peuvent constituer le réservoir naturel de la filaire *Loa loa*.

Notre étude a permis d'identifier un certain nombre de molécules pouvant avoir un intérêt diagnostique de la filariose à *Loa loa* aussi bien pour l'Homme que l'Animal. Nous nous proposons de développer à partir de ces antigènes des méthodes diagnostiques permettant le suivi des primates et leur contact avec l'homme, de tester l'efficacité de nouveau médicament et vaccin potentiel.

Par ailleurs, le fait que l'animal (primate non-humain) présente un spectre parasitologique semblable à celui observé chez l'Homme à savoir les formes avec microfilaires circulants dans le sang (microfilarémiques) et des formes sans microfilaires (amicrofilarémiques), une étude de la relation entre le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), la réponse immunitaire et le statut parasitologique (susceptibilité/résistance) des primates est envisagée. Ce qui permettra d'énoncer les bases de développement d'un vaccin.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1- **Ah H.S.; McCall, J.W. et Thompson P.E., 1974.** Vaccination against experimental *Brugia pahangi* infections in dogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. Munich*, 3: 1236-1237.
- 2- **Ajuh P.M.; Akué J.P.; Boutin P.; Everaere S. et Ekwang T.G., 1995.** *Loa loa*: Structural Diversity of a 15kDa Repetitive Antigen. *Exp. Parasitol*, 81: 145-153.
- 3- **Akue J.P., 1995.** Correlation between the antibody response and resistance to *Loa loa* infective in Gabon. Thèse: Ph D, University of Liverpool.
- 4- **Akue J.P.; Deveney E.; Wahl G. et Moukana H., 2002.** Expression of filarial-specific IgG subclasses under different transmission intensities in a region endemic for loiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 66:245-250.
- 5- **Akué J.P.; Ekwang T.G. et Deveney E., 1994.** High levels of parasite-specific IgG4 in the absence of microfilaremic in *Loa loa* infection. *Trop. Med. Parasitol*, 45: 246-248.
- 6- **Akué J.P.; Hommel M. et Deveney E., 1997.** High levels of parasite-specific IgG1 correlate with the amicrofilaremic state in *Loa loa* infection. *J. Infect. Dis*, 175: 158-163.
- 7- **Akue J.P.; Morelli A.; Moukana H. et Blampain Azzibrouck G., 2003.** Parasitological and immunological induced by immunization of *Mandrillus sphinx* against the human filarial *Loa loa* using infective stage larvae irradiated at 40 Krad. *Parasite Immunol*, 10:263-268.
- 8- **Andy J.J.; Bishara F.F.; Soyirika O.O. et Odesanmi W.M., 1981.** Loiasis as a possible trigger of African endomiocardial fibrosis: a case report from Nigeria. *Acta Tropica*, 38: 179-186.
- 9- **AUBRY P., 2005.** Les filarioses lymphatiques. [Ressource Electronique].  
Disponible sur : [http://medecinetropicale.free.fr/cours/filarioses\\_lymphatiques.htm](http://medecinetropicale.free.fr/cours/filarioses_lymphatiques.htm)

- 10- Awadzi K.; Dadzie K.Y.; Schulz-Key H.; Gilles H.M.; Fulford A. J. et Aziz, M.A., 1986.** The chemotherapy of onchocerciasis XI. A double-blind comparative study of ivermectin, diethylcarbamazine and placebo in human onchocerciasis Northern Ghana. *Ann, Trop. Med*, 80:433-442.
- 11- Boulesteix G. et Carme B., 1986.** Encéphalite au cours du traitement de la filariose à *Loa loa* par la Diethylcarbamazine. A propos de 6 observations. *Bul. Soc. Path. Exot*, 79 :649-654.
- 12- Brumpt E., 1904.** Les filarioses humaines en Afrique. *Compte Rendu de la Société de Biologie*, 56 : 758-760.
- 13- Cabrera Z.; Buttner D.W. et Parkhouse R.M.E., 1988.** Unique recognition of a low molecular weight *Onchocerca volvulus* antigen by IgG3 antibodies in chronic hyper-reactive Oncho-dermatitis (Sowda). *Clin. Exp. Immunol*, 74: 223-229.
- 14- Carme B., 1983.** Evaluation de la microfilarémie (filariose à *Loa loa*) par la méthode de la goutte épaisse calibrée : influence de plusieurs paramètres techniques. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop*, 63 : 325-331.
- 15- Chanteau S.; Glaizieu P. ; Moulia-Pelat J.P. ; Plichart C. ; Luquiaud P. et Cartel J.L., 1994.** Low positive predictive value of anti-*Brugia malayi* IgG and IgG4 serology for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti*. (1994). *Trans. R. Soc. Trop. Hyg*, 88: 661-662.
- 16- Chippaux J.P.; gardon-Wendel N.; Gardon J. et Ernould J.C., 1993.** Absence of any adverse effect of inadvertent ivermectin treatment during pregnancy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 87(3): 318.
- 17- Cruel T.; Arborio M.; Schill H.; Neveux Y.; Nedelec G.; Chevalier B.; Teyssou R. et Buisson Y., 1997.** Nephropathy and filariasis from *Loa loa*. Apropos of 1 case of adverse reaction to a dose of ivermectin. *Bull. Soc. Path. Exot*, 90: 179-181.

- 18-Dennis V.A.; Osae-Addo G. et Lowrie R.C. Jr., 1985.** Blastogenic responses, interleukine-2 production and interleukin-2 receptor on CD4+ and CD8+ lymphocyte in rhesus monkeys experimentally inoculated with *L. Loa*. *Parasite Immunol.* 19(7): 301-308.
- 19-Dissanaike A.S., 1979.** Zoonotic aspect of filarial infections in man. *Bulletin WHO*, 57: 349-357.
- 20-Ducorps M. ; Gardon-Wendel N. ; Ranque S. ; Ndong W. et Boussinesq M., 1995.** Effets secondaires du traitement de la loase hypermicrofilarémique par l'ivermectine. *Bull. OMS*, 56 : 155-167.
- 21-Duke B., 1964.** Studies on loiasis in monkeys. IV- Experimental hybridization of the human and simienstrain of *loa*. *Ann. Trop.Med Parasitol*, 50: 390-408.
- 22-Duke B.O.L., 1957.** Experimental transmission of *Loa loa* from man to monkey. *Nature*, 179: 1357-1388.
- 23-Duke B.OL., 1955.** The development of *Loa* in flies of genus *Chrysops* and the probable significance of the different species in the transmission of loiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*, 49: 115-121.
- 24-Egwang T.; Pinder M. et Akué J.P., 1990.** *Loa loa*: identification of genomic DNA clones expressing recombinant antigens. *Exp. Parasitol*, 70: 490-493.
- 25-Egwang T.G.; Akué J.P.; Dupont A. et Pinder M., 1988.** The identification and partial characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Loa loa* microfilariae. *Mol. Biochem. Parasitol*, 31:251-261.
- 26-Fain A. et Maertens K., 1973.** Notes sur la ponte des microfilaires chez *Loa loa* et sur le degré de maturation des vers en migration. *Bull. Soc. Exot*, 6 : 737-742.

- 27-Fain A., 1969.** Notes sur la distribution géographique de la filaire *Loa loa* et des tabanidés du genre *Chrysops* au Congo et au Rwanda. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop*, 49 : 499-530.
- 28-Fain A., 1978.** Les problèmes actuels de la loase. *Bulletin OMS*, 56 : 737-742.
- 29-Fain A., 1978.** Les problèmes actuels de la loase. *Bulletin OMS*, 56 : 155-167.
- 30-Fain A., 1981.** Epidémiologie et pathologie de la loase. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop*, 61 : 277-285.
- 31-Francke M.; Carme B. ; Boulestiex G. et Boutes H., 1991.** Five cases of encephalitis during treatment of loiasis with diethylcarbamazine. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 44: 684-690.
- 32-Gelband H., 1994.** Diethylcarbamazine salt in the control of lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 50: 655-662.
- 33-Gentillini M., 1981.** Maladies parasitaires.- Londres : *Editions JB Baillière*.- 291p
- 34-Gentillini, M. et Duflo, B., 1982.** Filarioses. *Médecine Tropicale*- Paris: Flammarion. 173-195.
- 35-Ghogomu S.M. ; Souopgui J. ; Pelle R. et Titanji V.P., 2002.** Expression and characterization of Ov-47, a dominant antigen of *Onchocerca volvulus*. *Exp. Parasitol*, 100:143-149.
- 36-Gouteux J.P.; Noireau F. et Staak C., 1989.** The host preferences of *Chrysops silacea* and *C. dimitiata* (Diptera: Tabanidae) in an endemic area in Gabonese children. *Microb. Immunol*, 28: 787-792.
- 37-Hawking F., 1979.** Diethylcarbamazine and new compounds for the treatment of filariasis. *Adv. Pharmacol. Chemother*, 16: 129-194.

- 38- Hewitt R.I.; White E.; Wallace W.S.; Stewart H.W.; Kushner S. et SubbaRow Y., 1947.** Experimental chemotherapy of filariasis. II. Effect of piperazine derivatives against naturally acquired filarial infections in cotton rats and dogs. *J. Lab. Clin. Med*, 32: 1304-1313.
- 39- Ho Thi S. et Petithory J., 1963.** Techniques de concentration des microfilaires sanguicoles. *Bull. Soc. Path. Exot* : 197-207.
- 40- Hussain R. et Ottesen E.A., 1986.** IgE response in human filariasis. IV. Parallel antigen recognition of IgE and IgG4 subclass antibodies. *J. Immunol*, 136: 1859-1863.
- 41- Hussain R.; Hamilton R.G.; Kumaraswami V.; Adkinson J.N.F. et Ottesen E.A., 1981.** IgE response in human filariasis. I. Quantitation of filariae-specific IgE. *J. Immunol*, 127:1623-1629.
- 42- Lal R.B. et Ottesen E.A., 1983.** Enhanced diagnostic specificity in human filariasis by IgG4 antibody assessment. *J. Infect. Dis*, 158: 1034.
- 43- Leroy E.; Baize S.; Wahl G.; Egwang T.G. et Georges A.J., 1997.** Experimental infection of a nonhuman primate with *Loa loa* induces transient strong immune activation followed by peripheral unresponsiveness of helper T cells. *Infect. Immun*, 65: 1876-1885.
- 44- Lizotte R. M.; Supali T.; Partono F. et Williams S.A., 1994.** A polymerase chain reaction assay for the detection of *Brugia malayi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 51: 314-321.
- 45- Lucius R.; Kern A.; Seeber F.; Pognka T.; Willenbacher J.; Taylor H. R.; Pinder M.; Ghalib A. W.; Schulz-Key H. et Sobolsey P., 1992.** Specific and sensitive IgG4 immunodiagnosis of onchocerciasis with a recombinant 33Kd *Onchocerca volvulus* protein (OV33). *Trop. Med Parasitol*. 43: 139-145.



- 46-Mazotti L., 1948.** Possibilidad de utilizar como medio diagnostico auxiliary en la oncocecosis, las reacciones alergicas consecutivas a la admibitracion del « Hetrazan ». Revista. *Instituto de salubridad y Enfermedades Tropicales*, 9 :235-237.
- 47-Mosmann T.R. et Coffman R.L., 1989.** Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol*, 7: 145-173.
- 48-Negesse Y.; Lanoie L.O.; Neafie R.C. et Conno D.H., 1985.** Loiasis: “Calabar” swellings and involvement of deep organs. *Am. J. Med. Hyg*, 34: 537-546.
- 49-Noireau F.; Toudic A. ; Gouteux J.P. ; Bissadidi N. ; Frezil J.L. et Duteurtre J.P., 1987.** Glossina in Brazzaville. III. Vector role in animal and human trypanosomiasis. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop*, 40:67-69.
- 50-Nutman T.B.; Kumaraswami V. et Ottesen E.A., 1987a.** Parasite-specific anergy in human filariasis. Insights after analysis of parasite antigen-driven lymphokine production. *Clin. Invest*, 79: 1516-1523.
- 51-Nutman T.B.; Kumaraswami V.; Pao L.; Narayanan P.R. et Ottesen E.A., 1987b.** An analysis of in vitro B cell immune responsiveness in human lymphatic filariasis. *J. Immunol*, 138: 3954-3959.
- 52-Nutman T.B.; Reese W.; Poindexter R.W. et Ottesen E.A., 1988.** Immunologic correlates of the hyperresponsive syndrome of loiasis. *J. Infect. Dis*, 157: 544-550.
- 53-Oothuman P.; Denham D.A.; McGreevy P.B.; Nelson G.S. et Roger R., (1979).** Successfully vaccination of cats against *Brugia pahangi* with larvae attenuated by irradiation with 10kRad Cobalt 60. *Parasite Immunol*,1: 209-216.
- 54-Organisation Mondiale de la Santé, (1992).** Les Filarioses lymphatiques: La maladie et son contrôle. Cinquième rapport du comité d’experts de l’OMS sur les filarioses.- Genève : OMS (*WHO Technical Report Series*, 821).

**55-Organisation Mondiale de la Santé., 1984.** Le rapport du comité d'expert de l'OMS sur les filarioses. Quatrième rapport. - Genève: OMS (WHO *Technical Series*, 702).

**56-Orihel T.C. et Eberhard M.L., 1985.** *Loa loa*: development and course of patency in experimentally-infected primates. *Trop. Med. Parasitol*, 36: 215-224.

**57-Ottesen E.A. et Campbell W .C. 1994.** Ivermectin in human medicine. *J. Antimicrob Chemother*, 34:195-203.

**58-Ottesen E.A.; Kumaraswami V.; Paranjape R.; Poindexter R.W. et Tripathy S.P., 1981.** Naturally occurring blocking antibodies modulate immediate hypersensitivity responses in human filariasis. *J. Immunol*, 127: 2014-2020.

**59-Ottesen E.A.; Skavaril F.; tripathy S.P.; Poindexter R.W. et Hussain R., 1985b.** Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J. Immunol*, 134: 2707-2712.

**60-Ottesen E.A.; Vijayasekaran V.; Kumaraswami V.; Perumal Pillai S.V.; Sadanandam A.; Frederick S.; Prabhakar R. et Tripathy S.P., 1990.** A controlled trial of ivermectin and diethylcarbamazine in lymphatic filariasis. *N. Engl. J. Med.* 19: 1113-1117.

**61-Ottesen E.A.; Weller P.F. et Heck L., 1977.** Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *Immunology*. 33: 2413-421.

**62-Ottesen E.A.;Duke B.O.; Karam M. et Behbehani K., 1997.** Strategies and tools for the control/ elimination of lymphatic filariasis. *Bull. OMS*, 75: 491-503.

**63-Piessens W.F.; Ratiwayanto S.; Tuti S.; Palmieri J.H.; Piessens P.W.; Iskak Koiman R.N. et Dennis D.T., 1980.** Antigen-specific suppressor cells and suppressor factors in human filariasis of with *Brugia malayi*. *N. Engl. J. Med*, 302: 833-837.

**64-Pinder M.; Everaera S. et Roelants G.E., 1994.** *Loa loa*: immunological responses during experimental infections in Mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Exp. Parasitol*, 79: 126-136.

**65-Ralph M., 1975.** Worms and disease, Heinemann Medical books London.

**66-Richard-Lenoble D. et Kombila M., 1979.** Importance des filarioses humaines sanguicoles au Gabon. *Bull. Med. D'Owendo*, 1 : 60-83.

**67-Richard-Lenoble D. ; Kombila M. ; Carme B. ; Gilles J.C. et Delattre P.Y., 1980b.** Prévalence des filarioses humaines sanguicoles au Gabon. *Bull. soc. Path. Exot.* 73 : 192-199.

**68-Richard-Lenoble D. ; Kombila M. ; Rupp E.A.; Pappayliou E.S.; Gaxotte P.; Nguiri C. et Aziz M. H., 1988.** Ivermectin in loiasis and concomitant *O. volvulus* and *M. perstans* infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 39: 480-483.

**69-Richard-Lenoble D. ; Kombila M.; Bain O.; Chandenier J. et Mariotte O., 1988b.** Filariasis in Gabon: Human infections with *Microfilaria rodhaini*. *Am. J. Med. Hyg.* 39: 91-92.

**70-Richard-Lenoble D.; Kombila M.; Bain O.; Maganga M.L.; Chandenier J.; Yebakima A. et Andranjafy A., 1983.** Filarioses cutanéodermiques au Gabon. Résultats préliminaires. *Médecine. Afrique Noire*, 30: 11-19.

**71-Tang L.; Smith V.P.; Gounaris K. et Selkir M.E., 1996.** *Brugia pahangi*: The cuticular glutathione peroxidase (gp29) protects heterologous membranes from lipid peroxidation. *Exp. Parasitol*, 82(3):329-332.

**72-The Filarial genome project., 1999.** Deep within the filarial genome: an update on progress in the filarial Genome project. *Parasitology*, 15: 214-224.

**73-Towbin H.; Staehelin T. et Gordon J., 1979.** Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.

**74-Urban J.F.Jr.; Katona I.M.; Pau W.E. et Finkelman F.D., 1991.** Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 88:5513-5517.

**75-Weil G. J., 1987b.** *Dirofilaria immitis*: identification and partial characterization of parasite antigens in the serum of infected dogs. *Exp. Parasitol*, 64: 244-251.

**76-Weil G.J.; Jain D.C.; Santhanam S.; Malhotra A.; Kumar H.; Sethumadhavan K.V.; Lifti F. et Ghosh T.K., 1987a.** A monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for detecting parasite antigenemia in bancroftian filariasis. *J. Infect. Dis*, 156:350-355.

**77-Zhong M.; Mc Carthy J.; Bierwert L.; Lizotte-Waniewski M. R.; Chanteau S.; Nutman T. B.; Ottesen E.A. et Williams S.A., 1996.** A PCR assay for the detection of *Wuchereria bancrofti* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 54: 357-363.

**78-Zimmerman P.A.; Guderian R.H.; Aruajo E.; Elson L.; Phadke P.; Kubofcik J.; Nutman T.B., 1994.** Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: Improved detection of patients with Onchocerciasis. *J. Infect. Dis*, 169: 686-689.

# ANNEXES

## 1. Tampon TBE (10x)

Tris base	108g
Acide borique	55g
EDTA 0.5M, pH8	40
H <sub>2</sub> O qsp	1 litre

## 2. Tampon TBS (pH7.4)

Tris	6.05g
NaCL	11.75g

Ajuster le pH à 7.4 avec du HCL concentré, puis compléter le volume à 1 litre

## 3. Tampon de lavage pour ELISA et Western Blot (TBS.T)

Tampon TBS	1 litre
Tween 200	0.5 ml

## 4. Tampon de saturation pour ELISA (TBS.T-BSA 5%)

Tampon TBS.T	100 ml
BSA	5g

## 5. Tampon de dilution pour ELISA et Western Blot (TBS.T-BSA 1%)

Tampon TBS.T	100 ml
BSA	1g

## 6. Tampon Carbonate pour ELISA 1X, pH9.6

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93g
H <sub>2</sub> O	1 litre

Après dilution dans l'eau, filtrer à l'aide d'un filtre 0.45µm.

## 7. Tampon de Diéthanolamine pour ELISA, pH9.6

Diéthanol amine	97ml
MgCL <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	100 mg
H <sub>2</sub> O	800 ml
NaN <sub>3</sub>	0.2 g

## 8. Tampon de révélation à la phosphatase alcaline pour ELISA

Diéthanol amine	7.5 ml
H <sub>2</sub> O distillée	2.5 ml

Para-nitrophényl phosphatase 10 mg

### 9. Solution Stock d'Acrylamide (30% A, 2.7%B)

Acrylamide	58.4 g
Bis acrylamide	1.6 g
H <sub>2</sub> O	200 ml

Filtrer le tout à l'aide d'un filtre de 0.45µm

### 10. Gel de résolution 12.5%

Solution Stock à 30%	12.5 ml
Tris/HCl 1.5M, pH8.8	11.2 ml
H <sub>2</sub> O distillée	6.2 ml
SDS 10%	0.3 ml
APS	0.1 ml
TEMED	0.02 ml

### 11. Gel de résolution 15%

Solution Stock à 30%	15 ml
Tris/HCl 1.5M, pH6.8	11.2 ml
H <sub>2</sub> O distillée	3.7 ml
SDS 10%	0.3 ml
APS	0.1 ml
TEMED	0.02 ml

### 12. Gel de concentration (5%)

Acrylamide (Stock 30%)	1.67 ml
Tris/HCl 0.5M, pH6.8	1.25 ml
H <sub>2</sub> O distillée	7.03 ml
APS	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

### 13. Solution de chargement pour SDS-PAGE

Tris/HCl 0.5M, pH 6.8	1.88 ml
SDS 10%	6 ml
Glycerol	3 ml
H <sub>2</sub> O distillée	2.12 ml

Dans 0.65 ml de cette solution, on ajoute 0.1 ml de DTT 1.5M et 0.1 % de bleu de bromophénol

### 14. Tampon de migration de gel

Tris	12.12 g
Glycine	57.68 g
SDS	4.0g

### 15. Solution de coloration de gel

Bleu de Coomassie	1 g
Acide acétique glacial	100 ml
Méthanol	450 ml
H <sub>2</sub> O distillée, qsp	1 litre

### 16. Solution de décoloration de gel

Acide acétique glacial	70 ml
Méthanol	200 ml
H <sub>2</sub> O distillée, qsp	1 litre

### 17. Tampon de transfert pour Western Blot

Tris	9.68 g
Glycine	46.20 g
Méthanol	800 ml
H <sub>2</sub> O distillée	4 litres

### 18. Tampon de Révélation à la phosphatase alcaline pour Western Blot

Tris/HCl 1M, pH 9.5	5 ml
NaCl 1M	5 ml
MgCl <sub>2</sub> 0.5M	05 ml
5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	7.5 mg
Nitro bleu tetrazolium	15 mg