

PARASITOLOGIE

Variations sous contrôle génétique de l'infection onchocercarienne en fonction du profil clinique dans les foyers endémiques du Cameroun.

J. Donfack (1), J. L. Ngu (1), G. Lando (2), P. A. Zimmerman (3), J. Nutman (3) & A. Same-Ekobo (4)

(1) Laboratoire d'immunologie, Faculté de médecine et des sciences biomédicales, Yaoundé, Cameroun.

(2) Laboratoire de biochimie, Faculté de médecine et des sciences biomédicales, Yaoundé, Cameroun.

(3) Laboratory of parasitic diseases, National Institutes of Health, NIAID/NIH, Building 4, Room 126, Bethesda, MD 20892-0425, Etats-Unis.

(4) Laboratoire de parasitologie, CHU Yaoundé, Yaoundé, Cameroun.

Manuscrit n° 1941. "Parasitologie". Reçu le 12 mars 1998. Accepté le 23 mars 1999.

Summary: Variations under Genetical Control of Onchocercian Infection according to Clinical Characteristics in Endemic Foyers of Cameroon.

Key-words: Onchocerciasis - PCR - HLA - Endemic - Genetic - Cameroon - Central Africa

Onchocerciasis, also known as "river blindness", presents a plenum of clinical manifestations which vary from one individual to another, and from one area to another. This large spectrum of clinical manifestations of the disease is an indication of the complexity of the pathogenesis of onchocerciasis and suggests that many interacting factors might influence the clinical features of the disease. The present study has focused on the heterogeneity of the host immune response as a plausible explanation for differences in clinical manifestations of the infection. Host genetic factors, namely HLA genes, might play an important role in determining the nature of the immune response mounted against the parasite Onchocerca volvulus, and thus the development of different manifestations of the infection.

*Genetic diversity of onchocerciasis was assessed in different endemic foci in Cameroon. In order to investigate the possibility that the Major Histocompatibility Complex (MHC) genes might be associated with the different clinical types of onchocerciasis, 146 subjects living in three endemic areas of Cameroon were studied. They were classified in four groups: A (asymptomatic subjects), P (putatively immune subjects) L (patients with localised disease) and G (patients with generalised disease). The four groups differed in the distribution of HLA class II alleles as determined by Direct Heteroduplex Analysis. On the one hand, allele HLA-DQA1*0501 appeared to be associated with protection against severe onchocerciasis; on the other, allele HLA-DQB1*0201 might play an important role in the severe form of the disease.*

Résumé :

*Cette étude rapporte une approche génétique de la diversité de l'onchocercose dans différents foyers de la maladie au Cameroun. Les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) jouant un rôle important dans la réponse immunitaire, la relation a été recherchée entre les allèles du système HLA de classe II et l'expression clinique. On a sélectionné 146 sujets vivant dans trois régions endémiques du Cameroun, puis on les a classés en 4 groupes d'après les examens cliniques et biologiques : A (sujets asymptomatiques), P (sujets protégés), L (individus présentant peu de signes cliniques) et G (sujets avec la forme généralisée de la maladie). Ces groupes ont montré des différences dans la distribution des allèles HLA de classe II (DQA1 et DQB1) obtenus par l'analyse directe par hétéroduplex ou Direct Heteroduplex Analysis (DHDA). L'allèle HLA-DQA1*0501 semble jouer un rôle dans la protection contre les formes sévères de l'onchocercose. L'allèle HLA-DQB1*0201, pour sa part, serait associé à la forme généralisée de la maladie.*

Mots-clés : Onchocercose - PCR - HLA - Endémie - Génétique - Cameroun - Afrique centrale

Introduction

L'interprétation habituelle de la pathologie onchocercarienne considère sans aucun doute les souches de savane comme les plus pathogènes. Le caractère bénin de la maladie en zone forestière, au plan général, n'a pas contribué à en faire une cible de premier plan en matière de programme de lutte si on le compare aux vastes programmes entrepris dans le bassin de la Volta et dans les pays du Sahel. Mais la fréquence élevée de fortes charges parasitaires s'accompagnant de lésions oculaires, et l'existence de pathogénicités inégales aussi bien en forêt (1)

qu'en savane (4) nous conduisent à penser que l'opposition entre onchocercose de forêt et onchocercose de savane est assez schématique et qu'il convient de rechercher une diversité dans l'expression de la maladie sous contrôle génétique plus ou moins stricte, par des marqueurs moléculaires.

Dans ce contexte, la présente étude envisage d'analyser les facteurs génétiques de l'hôte influençant l'intensité des manifestations cliniques de l'onchocercose dans les foyers d'endémie.

En effet, compte tenu du fait que les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) sont hautement polymorphiques

et jouent un rôle important dans le contrôle de la réponse immunitaire, et que l'infection onchocercienne est largement influencée par l'immunité à médiation cellulaire (5), il est intéressant d'explorer la corrélation entre les allèles du système HLA de classe II et l'expression clinique de la maladie sous ses différentes formes.

Objectif

L'objectif général de cette approche est de rechercher l'implication de l'un des facteurs intrinsèques et invariants à l'hôte, à savoir son matériel génétique, dans l'expression clinique de l'onchocercose.

Il s'agit de façon spécifique d'appliquer les outils moléculaires dans deux circonstances :

- pour la détection des parasites chez les sujets ne présentant aucune manifestation clinique et ayant présenté une biopsie cutanée négative,
- pour la caractérisation des gènes du système HLA de la classe II et leur association aux différents profils cliniques de l'onchocercose sur les sujets résidents dans différents foyers.

Méthodologie

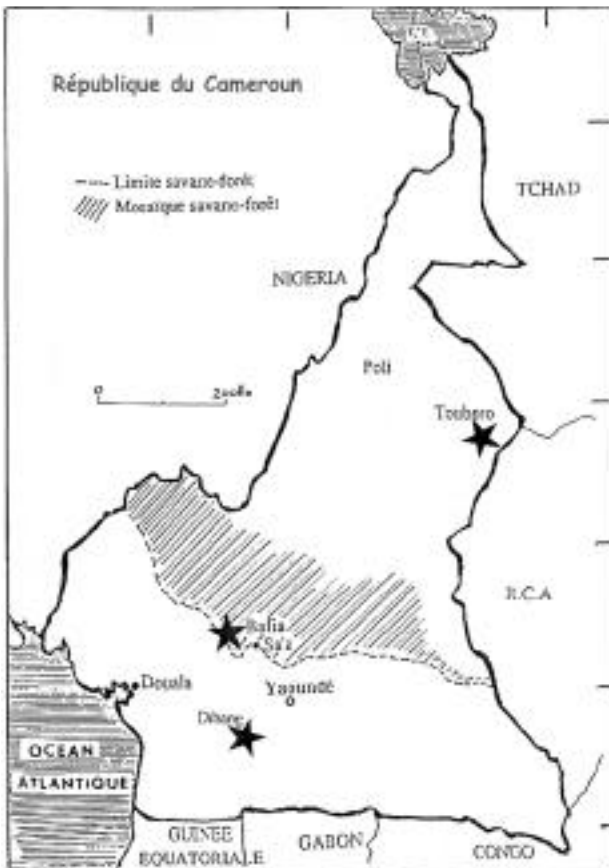
Cadre d'étude

Les sites choisis pour cette étude se situent dans les foyers d'onchocercose de forêt, de savane et dans la zone de transition forêt-savane (figure 1) :

- Dibang, dans la zone forestière,
- Touboro, dans la savane,
- Bafia, dans la zone de mosaïque forêt-savane.

Figure 1.

Localisation géographique des foyers de l'étude.
Geographical localisation of foci.



Population étudiée

Les sujets vivant de façon permanente dans les localités précitées ont été sélectionnés sur la base des critères ci-après :

- âge > 20 ans
- durée de séjour en zone d'endémie > 10 ans.

N'ont pas été inclus dans l'étude les sujets appartenant à la même famille nucléaire élargie, les personnes soumises à un traitement antihelminthique quelconque et tout résident permanent ayant interrompu son séjour dans la région pendant une période dépassant 6 mois.

Au total, 146 sujets ont été inclus dans l'étude et répartis comme suit :

- Dibang : 49 personnes.
- Touboro : 45 personnes.
- Bafia : 52 personnes.

Recueil des données épidémiologiques de base

Dans chaque communauté, les paramètres suivants ont été quantifiés sur la base des examens cliniques :

- sujets asymptomatiques qui ne présentent aucun signe cliniquement décelable de l'onchocercose
- sujets présentant des signes cliniques majeurs de la maladie : nodules palpables, lésions cutanées et signes oculaires.

Dans chaque cas, le nombre de nodules et leur topographie ont été précisés, ainsi que l'extension des lésions cutanées et oculaires.

A la fin de l'examen clinique, les malades examinés sont classés en deux catégories, selon l'extension au thorax et aux membres des signes cutanés, associés à l'atteinte oculaire. Les malades présentant des lésions aussi étendues sont classés dans la catégorie de la forme généralisée (G) de l'onchocercose ; ceux qui ont des lésions localisées au thorax ou aux membres sans atteinte oculaire sont classés dans la catégorie de la forme localisée (L).

Diagnostic biologique

Après l'examen physique, chaque patient a subi une biopsie cutanée exsangue (BCE) calibrée pour l'identification et la numération des microfilaries *Onchocerca volvulus*.

Les sujets négatifs à cet examen ont été soumis au test de NUTMAN *et al.* (3), qui consiste en l'extraction de l'ADN des biopsies négatives, suivie dans un premier temps de l'amplification des séquences répétitives de 150 paires de bases spécifiques d'*Onchocerca volvulus* et, dans un deuxième temps, du test Elisa classique dans lequel l'ADN amplifié est fixé sur la plaque de microtitration ; les sondes spécifiques aux séquences, marquées à la fluorescéine, sont ensuite ajoutées à la plaque en vue de la révélation.

Les individus négatifs au test de NUTMAN sont classés comme "protégés (P)", et les positifs comme asymptomatiques (A). Au total, après ces examens cliniques et biologiques, les sujets ont été répartis en quatre catégories correspondant aux formes suivantes :

- forme généralisée : signes cliniques étendus au thorax et aux membres, avec atteinte oculaire ; présence de microfilaries dermiques (BCE positive),
- forme localisée : signes cutanés limités au thorax ou aux membres, sans atteinte oculaire ; présence de microfilaries dermiques (BCE positive),
- forme asymptomatique : absence de signes cliniques, absence de microfilaries dermiques (BCE négative) et d'ADN d'*O. volvulus* (Test de NUTMAN positif),

- forme protégée : absence de signes cliniques, absence de microfilaries dermiques (BCE négative) et d'ADN d'*O. vol-vulus* (Test de NUTMAN négatif).

Les individus de chaque catégorie ainsi définie sont alors soumis à un prélèvement de 5 millilitres de sang veineux avant de recevoir une dose d'ivermectine (Mectizan®).

Extraction de l'ADN

L'ADN génomique a été extrait du sang total selon la méthode décrite par ZIMMERMAN (7), en 8 phases successives :

- lavage deux fois de suite de 100 µl de sang total avec du tampon TE hypotonique (10 mM Tris-HCl, pH 8 + 10 mM EDTA, pH 8),
- incubation : 5 mn, à la température ambiante,
- lavage avec 200 µl de tampon de lyse des hématies (1 M sucrose, 10 mM Tris, HCL, pH 7,6; 50 mM MgCl₂ et 1.0 % vol/vol Triton X-100),
- incubation pendant 5 mn, à la température ambiante,
- centrifugation : 13 000 tours/mn, pendant 10 mn, pour récupérer les leucocytes,
- lyse des leucocytes par incubation au bain-marie à 56 °C pendant 2 heures dans la solution : DSP (1 M Tris-HCl, pH8.0; 1 M KCl; 1 M MgCl₂; Protéine K (10 mg/ml); 5 % (V/V) Tween-20),
- inactivation de la protéinase K par incubation pendant 10 mn à 95 °C,
- concentration des débris résiduels, par centrifugation pendant 30 secondes, et récupération du surnageant prêt pour la PCR.

Au terme de l'extraction, les échantillons du surnageant prêts pour la PCR sont gardés à +4 °C (pour une durée maximale de 7 jours) ou à -20 °C (pour une durée plus longue).

Typage des gènes HLA de la classe II

Deux régions du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) ont été typées; il s'agit des loci DQA1 et DQB1.

La technique de typage utilisée est l'analyse directe par hétéroduplex ou Direct Heteroduplex Analysis (DHDA), d'après ZIMMERMAN (6, 7 et 8)

Le second exon polymorphique du locus DQA1 est amplifié grâce à deux amorces :

- GH26 [5' - CCC AAG CTT GTC CAG GTG TAA ACT TGT ACC - 3']
- GH27 [5' - CC AAG CTT CAC GGA TTC GGT AGC GGT AGA GTT G-3']

Pour le locus DQB1, le second exon polymorphique a été amplifié grâce aux amorces DQB1A et DQB1B :

- amorcé DQB1A : [5' - CCC AAG CTT CAT GTG CTA CTT CAC CAA CGG-3']
- amorcé DQB1B : [5' - CCC AAG CTT CTG GTA GTT GTG TCT GCA CAC-3']

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans 50 µl d'une solution de composition suivante :

- 36,5 µl d'eau distillée stérile,
- 0,5 µl de chaque amorce (10 Pmol),
- 5 µl de tampon PCR 10X concentré [67 mM Tris-HCl, pH 8,8; 6,7 mM MgSO₄; 16,6 mM de (NH₄)₂ SO₄; 10 mM 2-mercaptoéthanol],
- 2 µl de dNTPs [2,5 mM],

- 5 µl de la solution d'ADN,
- 0,5 µl Taq ADN polymérase [5u/µl]

L'amplification* proprement dite des deux loci a été réalisée en 40 cycles de dénaturation-anneling-extension comme suit : dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, suivie d'anneling à 50 °C durant 30 secondes, puis d'extension à 72 °C pendant une minute.

Après amplification, 5 µl du produit d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) et colorés au bromure d'éthidium (10 ng/ml). Vérification faite, 5µl du produit d'amplification ont été mélangés à 5 µl de sonde négative (complémentaire au brin 3'-5' du locus) et de sonde positive (complémentaire au brin 5'-3' du locus), respectivement marquées à la biotine. Ce mélange est ensuite chauffé à 95 °C pendant 15 minutes, puis refroidi brutalement sur carboglace. Les molécules hétéroduplexes qui en résultent sont alors séparées sur gel de polyacrylamide (5 %).

Après électrophorèse, les molécules hétéroduplexes sont transférées par simple "sandwich transfert" sur une membrane nylon**. Les bandes d'ADN ont été révélées en suivant les instructions du fournisseur***, indiquées sur la fiche d'emploi. Les allèles du patient sont alors identifiés par la mobilité différentielle caractéristique des molécules hétéroduplexes, en se référant aux témoins positifs.

Résultats

Classification des patients

Les données de l'examen physique, de la biopsie cutanée et du test moléculaire de NUTMAN *et al.* (3) ont permis de classer les 146 sujets examinés en 4 catégories de patients : asymptomatiques, protégés, ceux présentant la forme généralisée de la maladie et ceux affectés par la forme localisée. Le tableau I résume les caractéristiques de chaque groupe.

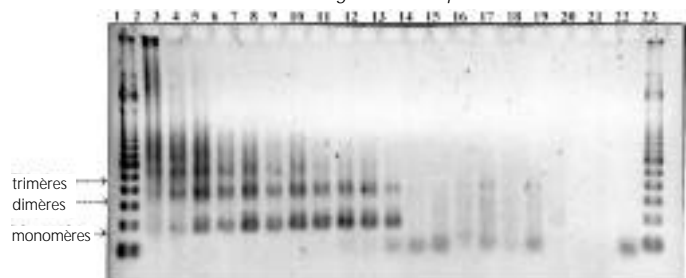
Tableau I.

Répartition des patients en fonction des données cliniques et biologiques.
Distribution of patients according to clinical and biological data.

données cliniques et biologiques	forme asymptomatique	forme généralisée	forme localisée	sujets protégés
nb de sujets	17	66	31	32
% des sujets	11,6	45,2	21,2	22
âge médian	49	50	48	52
âges extrêmes	20-80	20-72	20-70	20-95
charge microfilarienne / 2mg de peau	0	0-300	0-500	0

Figure 2.

Gel d'agarose 2 %, après électrophorèse des produits d'amplification des biopsies cutanées exsangues.
Agarosis gel 2%, after electrophoresis of amplifying products of exsanguine skin biopsies.



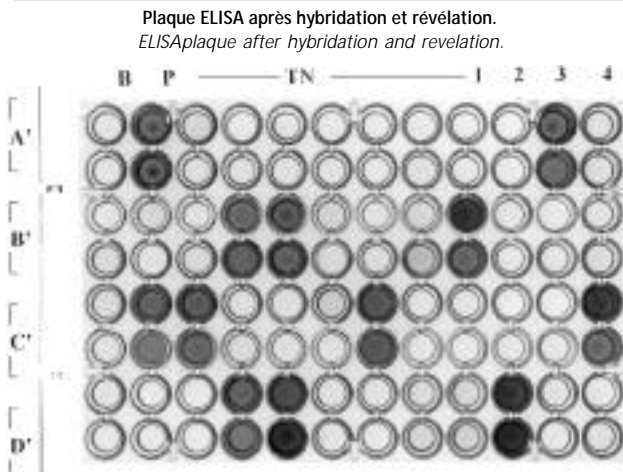
puits 1 et 23 :marqueurs de poids moléculaire (Gibco)
puits 2 à 7 : témoins positifs constitués du plasmid POV-134, à des dilutions croissantes : non dilué :1/10,1/100,1/1000,1/10 000,1/100 000.
puits 8 à 21 :produits des individus testés ;puits 22 :témoin négatif (eau distillée)

* Les réactions d'amplification ont été faites avec l'appareil PCR Perkin-Elmer 9600 Turbo (Cetus, Elmerville, CA, Etats-Unis).

** Membrane nylon de ICN Biochemicals, Cleveland, OH, Etats-Unis.

*** Laboratoire New England, Biolabs, Beverly, MA, Etats-Unis.

Figure 3.



A, B, C, D' : séries des doubles échantillons utilisés pour la détermination des individus positifs au test.
B : blanc, P : témoin positif (plasmid contenant la séquence 0-150),
TN : témoin négatif (ADN génomique humain),
1, 2, 3, 4 : produits d'amplification des biopsies exangues de 4 sujets testés.

Données de l'amplification des biopsies cutanées

La figure 2 présente une photographie du résultat de la première phase du test de NUTMAN, sur le gel d'agarose, après électrophorèse des produits d'amplification des séquences répétitives de 150 paires de bases (pb) spécifiques d'*Onchocerca volvulus*.

La figure 3 présente le résultat de la seconde phase du test de NUTMAN : la photographie d'une plaque Elisa, après hybridation des séquences répétitives de 150 pb spécifiques d'*O. volvulus*, suivie de leur révélation à la fluorescéine. Les puits de couleur rouge violacée caractérisent les patients positifs à ce test moléculaire, mais négatifs au test microscopique de la BCE (biopsie cutanée exsangue).

Résultats du typage des allèles HLA de classe II

Le typage des loci DQA1 et DQB1 par DHDA a permis de mettre en évidence, pour l'ensemble des 146 sujets, 8 allèles différents pour le locus DQA1 (tableau II) et 11 pour le locus DQB1 (tableau III). L'analyse statistique des fréquences de distribution en fonction du profil clinique et épidémiologique a été faite par le test de comparaison des proportions, en calculant l'écart-standard (Sd_p) des différences des pourcentages (dp) des allèles; les écarts-standards (Sd_p) ainsi calculés sont ensuite discutés avec un risque d'erreur = 0,05 c'est-à-dire au coefficient de sécurité de 95 % d'après la formule $Sd_p \times 1,96$. La

Tableau II.

Distribution des fréquences relatives des allèles sur les loci DQA1 en fonction du profil clinique.
Distribution of allele's relative frequencies on DQA1 loci in relation to clinical profile.

allèles du locus DQA1	0101	0102	0103	0201	0301	0401	0501	0502	total
effectif	33	152	7	11	39	10	37	3	292
fr. rel. globale (%)	11,3	52,1	2,4	3,7	13,4	3,4	12,7	1	100
nb de A	3	21	1	1	5	2	1	0	34
fr. rel. de A (%)	8,8	61,8	2,9	2,9	14,7	5,9	3	0	100
nb de G	14	66	2	8	19	6	15	2	132
fr. rel. de G (%)	10,6	50	1,5	6,1	14,4	4,5	11,4	1,5	100
nb de L	6	37	3	0	8	0	8	0	62
fr. rel. de L (%)	9,7	59,7	4,8	0	12,9	0	12,9	0	100
nb de P	10	28	1	2	7	2	13	1	64
fr. rel. de P (%)	15,6	43,8	1,6	3,1	10,9	3,1	20,3	1,6	100

A : forme asymptomatique ; G : forme généralisée ; L : forme localisée ;
P : individus "protégés" ; fr. rel. : fréquence relative.
A : asymptomatic subjects ; G : generalised disease ; L : localised disease ;
P : protected subjects (putative subjects) ; fr. rel. : relative frequency

différence entre les proportions a été considérée comme significative au coefficient de sécurité de 95 % si $dp > Sd_p \times 1,96$. Les figures 4 et 5 montrent, pour la région DQA1, les clichés des films autoradiographiques, après migration des molécules hétéroduplexes hybridées avec les sondes positives et négatives respectivement. Le tableau II indique, pour cette région, la distribution des allèles en fonction du contexte clinique.

Pour la région DQB1, les figures 6 et 7 (page 90) présentent comme précédemment les photographies des films autoradiographiques des molécules hétéroduplexes de cette région après hybridation avec les sondes positives et négatives respectivement. Le tableau III rapporte pour cette région, la distribution des allèles en fonction du contexte clinique.

Comparaison des allèles entre les sujets protégés et les sujets infectés

La différence dans la distribution des allèles est recherchée pour apprécier l'influence de certains allèles de la région HLA de classe II sur la pathologie onchocercienne. Les sujets "protégés" indemnes de maladie ont ainsi été comparés aux autres patients tous positifs, soit par la mise en évidence des microfilaires *O. volvulus* (par la biopsie cutanée exsangue), soit par la révélation de l'ADN de ce parasite par le test de NUTMAN.

Les tableaux IV et V montrent les nombres et les fréquences relatives des allèles DQA1 et DQB1 dans les groupes des individus protégés et des sujets infectés.

Tableau III.

Distribution des allèles du locus DQB1 en fonction du profil clinique.
Distribution of allele's relative frequencies on DQB1 loci in relation to clinical profile

allèles du locus DQB1	0201	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0601	0602	0603	0604	total
effectif	42	26	3	31	3	34	5	1	123	4	20	292
fr. rel. globale (%)	14,3	8,9	1	10,6	1	11,7	1,7	0,3	42,2	1,5	6,8	100
nb. de A	1	2	1	4	0	6	0	0	18	0	2	34
fr. rel. de A (%)	2,9	5,9	2,9	11,8	0	17,6	0	0	53	0	5,9	100
nb. de G	25	13	0	15	1	14	2	0	51	1	10	132
fr. rel. de G (%)	18,9	9,8	0	11,4	0,8	10,6	1,5	0	38,6	0,8	7,6	100
nb. de L	7	3	0	7	0	6	1	1	32	2	3	62
fr. rel. de L (%)	11,3	4,8	0	11,3	0	9,7	1,6	1,6	51,7	3,2	4,8	100
nb. de P	9	8	2	5	2	8	1	0	22	2	5	64
fr. rel. de P (%)	14,1	12,5	3,1	7,8	3,1	12,5	1,6	0	34,4	3,1	7,8	100

A : forme asymptomatique ; G : forme généralisée ; L : forme localisée ;
P : individus "protégés" ; fr. rel. : fréquence relative.
A : asymptomatic subjects ; G : generalised disease ; L : localised disease ;
P : protected subjects (putative subjects) ; fr. rel. : relative frequency

Discussion

Les données rassemblées sur les plans cliniques, parasitologiques et moléculaires permettent de dégager trois ordres de faits majeurs quant à la classification des patients, le typage des allèles HLA de classe II et l'influence du complexe majeur d'histocompatibilité sur la pathologie onchocercienne.

Classification des patients

Les 146 sujets recensés sont classés en quatre catégories (tableau I) grâce à la combinaison des données cliniques, de la biopsie cutanée et de l'outil moléculaire. L'utilisation du test de Nutman dans la classification des patients en zone d'endémie est d'autant plus importante que ce test permet de distinguer deux catégories d'individus parmi les sujets qui présentent les biopsies cutanées négatives : ceux qui hébergent le parasite et ceux qui en sont indemnes. En effet, dans notre série, 59 personnes (représentant 40,4 % de l'échantillon), ont présenté les biopsies cutanées négatives ; parmi elles, 17 personnes (soit

Tableau IV.

Distribution des allèles du locus DQA1 dans les groupes des sujets "protégés" et des sujets infectés.
Distribution of allele's relative frequencies on DQA1 loci in groups of protected and infected subjects.

allèles du locus DQA1	0101	0102	0103	0201	0301	0401	0501	0502	total
effectif	33	152	7	11	39	10	37	3	292
fr. globale (%)	11,3	52,1	2,4	3,7	13,4	3,4	12,7	1	100
nb inf	23	124	6	9	32	8	24	2	228
fr. de inf (%)	10,1	54,5	2,6	3,9	14	3,5	10,5	0,9	100
nb prot	10	28	1	2	7	2	13	1	64
fr. de prot (%)	15,6	43,8	1,6	3,1	10,9	3,1	20,3	1,6	100

inf : sujets infectés ; prot : sujets protégés ; fr. : fréquence
inf : infected subjects. prot : protected subjects (putative subjects)

29 % de l'échantillon) sont négatives à cet examen, mais positives au test moléculaire de NUTMAN (mettant en évidence l'ADN d'*Onchocerca volvulus* dans leurs biopsies).

La classification de ZIMMERMAN (7), utilisant les données de la sonde ADN d'*O. volvulus* pour classer les profils épidémiologiques des atteintes oculaires va dans le même sens. L'outil moléculaire constitue donc un apport significatif dans la classification des sujets, puisqu'il a rendu possible le dépistage de 29 % des sujets négatifs à la biopsie cutanée exsangue. Sans cet outil, ils auraient été considérés comme indemnes d'onchocercose.

En zone d'endémie onchocerquienne, toute personne présentant une biopsie cutanée négative devra donc, dans la mesure du possible, être soumise au test de NUTMAN, afin de déterminer s'il est réellement porteur ou non porteur de la filaire *Onchocerca volvulus*. Cet examen représente une alternative au test de MAZZOTTI qui peut être faussement positif chez les individus allergiques à la diéthylcarbamazine.

Typage des gènes HLA de la classe II

Le typage des allèles de deux régions, DQA1 et DQB1, du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) a permis de dégager les caractéristiques au niveau moléculaire de l'hôte humain. Il a mis en évidence les allèles qui pourraient jouer un rôle dans l'expression clinique de la maladie.

En effet, la distribution des allèles des loci DQA1 et DQB1 en fonction des différents profils cliniques a fait ressortir des différences en termes de nombre et de fréquence relative pour chaque allèle. Le locus DQA1 (tableau II) a révélé, au niveau de l'allèle 0501, une fréquence plus élevée chez les sujets "protégés" indemnes d'onchocercose que chez les porteurs sains (patients asymptomatiques) et dans les catégories des patients présentant les formes généralisées et localisées de la maladie. Toutefois cette différence n'est statistiquement significative ($p < 0,05$) d'une part qu'entre les sujets "protégés" (sans signes cliniques, et négatifs avec les tests de BCE et de NUTMAN) et les porteurs asymptomatiques, et d'autre part entre les sujets "protégés" et l'ensemble des sujets infectés (avec les tests de BCE et/ou NUTMAN positifs). Une étude de MEYER *et al* (2)

Tableau V.

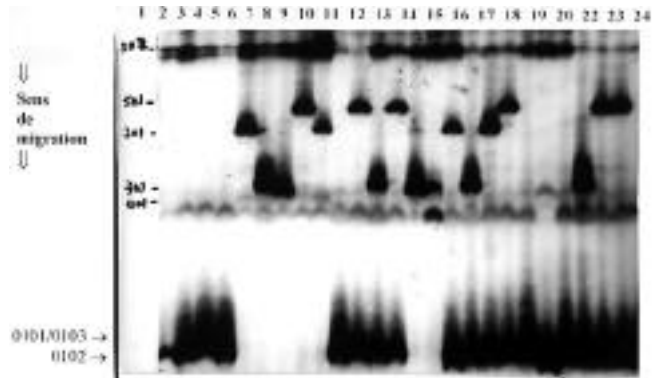
Distribution des allèles du locus DQB1 dans les groupes des sujets "protégés" et des sujets infectés.
Distribution of allele's relative frequencies on DQB1 loci in groups of protected and infected subjects.

allèles du locus DQB1	0201	0301	0302	0303	0402	0501	0502	0601	0602	0603	0604	total
effectif	42	26	3	31	3	34	5	1	123	4	20	292
fr. globale (%)	14,3	8,9	1	10,8	1	11,7	1,7	0,3	42,2	1,5	6,8	100
nb inf	33	18	1	26	1	26	3	1	101	3	15	228
fr. de inf (%)	14,5	7,9	0,4	11,4	0,4	11,4	1,3	0,4	44,3	1,3	6,7	100
nb prot	9	8	2	5	2	8	2	0	22	1	5	64
fr. de prot (%)	14,1	12,5	3,1	7,8	3,1	12,5	3,1	0	34,4	1,6	7,8	100

inf : sujets infectés ; prot : sujets protégés ; fr. : fréquence
inf : infected subjects. prot : protected subjects (putative subjects)

Figure 4.

Typage de la région DQA1. Film autoradiographique des molécules hétéroduplexes hybridées par la sonde positive.
Standardisation of the DQA1 region. Autophotographic film of heteroduplex molecules hybridized by positive probe.



lignes 1 à 8 : témoins positifs ; lignes 9 à 24 : échantillons testés

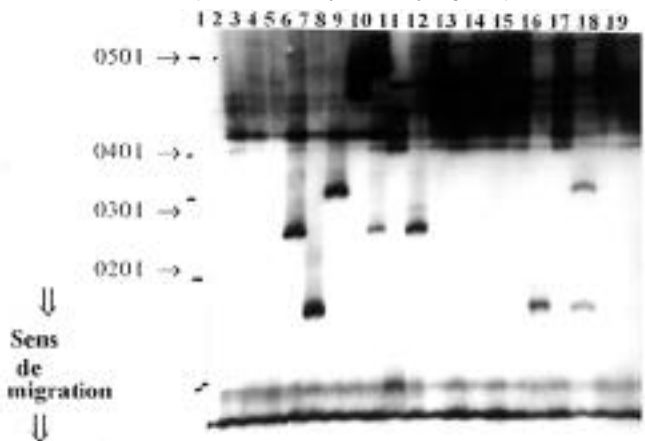
réalisée au Libéria fait également ressortir l'association de cet allèle, à des fréquences faibles, avec la forme généralisée de l'onchocercose.

Le fait que la fréquence de ce gène soit plus faible dans la forme généralisée (avec une fréquence de 11,4 %) que dans la forme localisée (avec une fréquence de 12,9%), et plus faible chez les porteurs asymptomatiques (fréquence = 3 %) que chez les sujets "protégés" dont la fréquence s'élève à 20,3%, autorise à poser l'hypothèse de son rôle protecteur vis-à-vis du parasite *Onchocerca volvulus*.

Au niveau du locus DQB1 (tableau III), la fréquence de distribution varie également d'une catégorie clinique à une autre.

Figure 5.

Typage de la région DQA1. Film autoradiographique des molécules hétéroduplexes hybridées par la sonde négative.
Standardisation of the DQA1 region. Autophotographic film of heteroduplex molecules hybridized by negative probe.



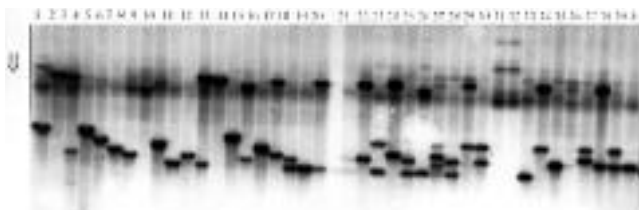
lignes 1 à 8 : témoins positifs ; lignes 9 à 19 : échantillons testés

L'allèle 0201 se manifeste plus fréquemment chez les sujets souffrant d'une forme généralisée de la maladie (fréquence = 18,9 %) que chez les personnes asymptomatiques (fréquence = 2,9 %), celles qui ont une forme localisée (fréquence = 11,3 %) et les sujets "protégés" (fréquence = 14,1 %). La différence est statistiquement significative ($p < 0,05$) entre les formes généralisées et localisées. MEYER *et al.* (2) ont trouvé le même genre d'association dans une population libérienne.

L'allèle DQB1-0201 semble dans ce contexte jouer un rôle dans la gravité de l'onchocercose.

Figure 6.

Typage de la région DQB1. Film autoradiographique des molécules hétéroduplexes hybridées par la sonde positive.
Standardisation of the DQB1 region. Autophotoradiographic film of heteroduplex molecules hybridized by positive probe.



lignes 1 à 20 : témoins positifs ; lignes 21 à 40 : échantillons testés

Influence du complexe majeur d'histocompatibilité sur la pathologie onchocercienne

Quand on considère les fréquences relatives des allèles DQA1-0501 et DQB1-0201 dans les quatre catégories d'individus, on constate une relation unimodale par rapport à l'infection onchocercienne, avec une fréquence maximale de l'allèle DQA1-0501 chez les sujets indemnes de maladie (les "protégés") et une fréquence maximale de l'allèle DQB1-0201 dans la forme généralisée de la filariose *O. volvulus*.

Cependant, lorsqu'on répartit l'ensemble de la population examinée en deux groupes, correspondant d'une part au sous-ensemble des sujets infectés (tableau IV) et d'autre part au sous-ensemble des sujets non infectés (tableau V), aucune différence significative n'apparaît dans la distribution des allèles entre les deux groupes.

Des investigations complémentaires s'imposent donc pour élucider ce phénomène. Il s'agit de savoir si l'ensemble des sujets infectés exprime un ou plusieurs allèles marqueurs de la maladie ou si, parmi les allèles, il en existe certains qui sont associés à la forme généralisée et d'autres qui sont portés uniquement par les sujets "protégés".

Pour y parvenir, deux approches sont envisagées :

- l'utilisation d'une seconde méthode de typage des gènes HLA de classe II, par hybridation par les sondes spécifiques oligonucléotides (ou PCR-SSOP : PCR Sequence Specific Oligonucleotide Probe). Dans cette technique, le second exon polymorphique du locus DRB1 sera amplifié avec les amorces : DRB Amp-5' [5' - CGT GTC CCC ACA GCA CGTT-3'] et DRB Amp-3' : [5' - CCG CGT CAC TGT GAA GCT-3'],
- le typage de la région DRB1 du CMH avec les mêmes procédés que ceux utilisés dans la présente étude.

Il sera alors possible, en procédant comme précédemment, d'analyser les fréquences de distribution des allèles HLA-DRB1, en fonction du tableau clinique et des zones d'endémie. Cela permettra surtout de statuer, avec plus de certitude, sur l'influence du CMH sur la pathologie onchocercienne.

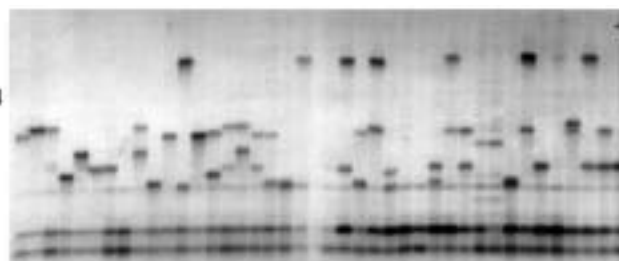
Conclusion

Au terme de cette étude, il ressort deux ordres de faits majeurs :

- la classification des patients en zone d'endémie est clairement établie lorsqu'on associe aux données cliniques et microscopiques l'outil moléculaire. Elle permet en effet de prendre en compte une proportion importante de sujets négatifs à la biop-

Figure 7.

Typage de la région DQB1. Film autoradiographique des molécules hétéroduplexes hybridées par la sonde négative.
Standardisation of the DQB1 region. Autophotoradiographic film of heteroduplex molecules hybridized by negative probe.



lignes 1 à 20 : témoins positifs ; lignes 21 à 40 : échantillons testés

sie cutanée classique, mais positifs au test moléculaire. Il s'agit là de l'un des objectifs fondamentaux qui étaient assignés à cette recherche, visant à introduire dans les études épidémiologiques un moyen de diagnostic moléculaire fiable et utile dans les enquêtes et les traitements de masse pour l'onchocercose ; - le typage des gènes HLA de la classe II ouvre une nouvelle voie à la compréhension de l'endémie onchocercienne, en montrant les marqueurs de l'hôte qui pourraient influencer les manifestations cliniques de la maladie : les allèles DQA1-0501 et DQB1-0201 du CMH. Il montre aussi que la pathologie onchocercienne est contrôlée, dans une certaine mesure, par les facteurs invariables intrinsèques de l'hôte.

Remerciements

Ce travail a reçu une contribution de l'AUEP-UREF, JER-3001.

Références bibliographiques

1. ANDERSON J & FUGELSANG GH - Comparison of onchocerciasis in rain forest and sudan savannah. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1976, **70**, 362-373.
2. MEYER GC, GALLIN M, ERTTMAN DK, BRATTIG NW, SCHNITZER L *et al.* - HLA-D alleles associated with generalised disease, localised disease and putative immunity in *Onchocerca volvulus* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**, 7515-7519.
3. NUTMAN TB, ZIMMERMAN PA, KUBOFCK J & KOSTYU DD - A universally applicable diagnostic approach to filarial and other infections. *Parasitology Today*, 1994, **10**, 239-243.
4. RIPERT C, SAMÉ-EKOBO A, TRIBOULEY J, BECKER M, BIESSY H *et al.* - *Bull Liais doc - OCEAC*, 1990, **94**, 8-13.
5. WARD DJ, NUTMAN TB, ZEA-FLORES G, PORTOCARRERO C, LUJAN A & OTTESEN EA - Onchocerciasis and immunity in humans: enhanced T-cell responsiveness to parasite antigen and putatively cell responsiveness to parasite antigen in putatively immune individuals. *J Infect Dis*, 1988, **157**, 536-543.
6. ZIMMERMAN PA, CARRINGTON MN & NUTMAN TB - Exploiting structural differences among heteroduplex molecules to simplify genotyping the DQA1 and DQB1 alleles in human lymphocyte typing. *Nucleic acid research*, 1993, **21**, 4541-4547.
7. ZIMMERMAN PA, DADZIE KY, DESOLE G, REMME J, SOUMBAYE E & UNNASCH TR - *Onchocerca volvulus* DNA probe classification correlates with epidemiologic patterns of blindness. *J Infect Dis*, 1992, **165**, 964-968.
8. ZIMMERMAN PA, GUDERIAN RH, ARUAJO E, ELSON L, PHADKE P *et al.* - Polymerase chain reaction-based diagnosis of *Onchocerca volvulus* infection: Improved detection of patients with onchocerciasis. *J Infect Dis*, 1994, **169**, 686-689.