

50376
1970
63

50376
1970
63

FACULTE DES SCIENCES DE LILLE

THESE DE TROISIEME CYCLE

Daniel AFCHAIN



ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES ANTIGENES SOLUBLES
DE TRYPANOSOMA CRUZI.

APPLICATIONS A LA TRYPANOSOMIASE AMERICAINE HUMAINE ET
EXPERIMENTALE DE LA SOURIS.

Travail effectué au

LABORATOIRE de ZOOLOGIE et de PARASITOLOGIE

FACULTE de MEDECINE et de PHARMACIE - LILLE

Présentée en Juin 1970

devant la Commission d'Examen

Jury d'examen

M. M. DURCHON

Président

M. E. VIVIER

Examineurs

M. A. CAPRON

- SOMMAIRE -

INTRODUCTION :

Rappel parasitologique - Mode d'étude.....p. 1

I - HISTORIQUE -

A - Milieux de culture pour T. cruzi.....p. 3

B - Immunologie des trypanosomes p. 7

II - MATERIEL ET METHODES -

A - PREPARATION DE L'ANTIGENE

1. Cultures : a. Milieu de culture p. 11
b. Ensemencement p. 12
c. Développement de la culture p. 13

2. Récolte de l'antigène corps cellulairesp. 15

3. Préparation d'extraits antigéniques solubles p. 16

B - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

1. Préparation des antisérums p. 16

2. Techniques de précipitation en agarose :
- Technique d'OUCHTERLONY p. 17b
- Immunoélectrophorèse p. 17b

3. Technique d'adsorption p. 19

4. Techniques enzymatiques p. 19

III - RESULTATS

A - ETUDE PRELIMINAIRE

1. Etude de l'antigène "milieu de culture"..... p. 20

2. Contrôle immunologique de la pureté antigénique de l'extrait
de T. cruzi p. 21

B - ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

DE L'EXTRAIT SOLUBLE DE TRYPANOSOMA CRUZI.

1. Structure antigénique de T. cruzi :

a. Cinétique de l'apparition des anticorps ... p. 23

b. Réactions croisées avec le milieu de
culture p. 23

c. Adsorption	p. 27
2. Incubation des corps cellulaires de <u>T. cruzi</u> dans la solution saline glucosée de HANKS :	
a. Récolte et préparation de l'extrait antigénique soluble	p. 28
b. Résultats	p. 29
c. Conclusion	p. 29
3. Mise en évidence de "l'arc remarquable" n°5	p. 30
<u>C - COMMUNAUTES ANTIGENIQUES DE T. CRUZI</u>	
<u>AVEC LES HELMINTHES ET LES CHAMPIGNONS.</u>	p. 33
<u>D - CARACTERISATION DES TYPES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DANS LES BROYATS DE T. CRUZI</u>	
<u>APRES IMMUNOELECTROPHORESE.</u>	p. 34
<u>E - CINETIQUE DE L'APPARITION DES PRECIPITINES SERIQUES DANS LA TRYPANOSOMIASE EXPERIMENTALE DE LA SOURIS. REPERCUSSIONS SUR LA TRYPANOSOMIASE AMERICAINE HUMAINE.</u>	
1. Entretien <u>in vivo</u> de <u>T. cruzi</u>	p. 35
2. Courbe d'apparition des précipitines sériques chez la souris infectée par <u>T. cruzi</u>	p. 35
3. Les précipitines sériques dans la Trypanosomiase américaine humaine	p. 42
<u>CONCLUSION et RESUME</u>	p. 45
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p. 48

INTRODUCTION

La maladie de GHAGAS, véritable fléau social en Amérique du Sud, est due à un protozoaire parasite de la Famille des Trypanosomatidae : Trypanosoma cruzi; son hôte intermédiaire est un Arthropode piqueur de la famille des Reduviidae.

Les formes Trypomastigote (nouvelle classification de HOARE, 1967) (Trypanosoma) métacycliques infectieuses rejetées avec les excréments de l'insecte, infectent l'homme par passage au travers des muqueuses, par une plaie épidermique due au grattage ou par voie orale (théorie récemment vérifiée par DIAZ-UNGRIA 1966). Chez l'hôte définitif, la multiplication du parasite se fait sous la forme Amastigote (Leishmania), intracellulaires qui donnent des formes Trypomastigote dans le sang périphérique.

Les Trypomastigotes chez l'hôte intermédiaire après piqure d'un sujet parasité se transforment en formes Amastigote; celles-ci se multiplient, donnent des Epimastigotes (Crithidia) puis des formes Trypomastigote métacycliques infectieuses dans l'ampoule rectale de la Reduve.

Bien que de nombreux travaux aient été consacrés à la Trypanosomiase américaine et à son diagnostic, peu d'entre-eux ont concerné l'étude de la structure antigénique. Or, l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques (BIGUET et COLL, 1959 - 1961 - 1962 - 1965a - 1965b -) et helminthiques (CAPRON et COLL, 1964 - 1965a - 1965b - 1966 - 1968 -), pratiquée depuis 1959 au Laboratoire de Parasitologie de LILLE, a permis d'aboutir à une connaissance précise des structures antigéniques parasitaires. Grâce à ces bases analytiques solides, et à la standardisation des antigènes, il fut plus facile d'envisager les phénomènes immunologiques, immunitaires et les répercussions dans le diagnostic des parasitoses.

La structure antigénique de T. cruzi, nous apparaissant insuffisamment élucidée, nous nous sommes proposés, à l'aide des méthodes de précipitation en milieu gélifié, de réaliser son analyse.

Les souches entretenues sur animaux, ne pouvant nous fournir un antigène qualitativement et quantitativement satisfaisant, nous avons choisi d'utiliser la culture massive in vitro de T. cruzi.

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait soluble de T. cruzi fut réalisée selon la technique courante pratiquée au Laboratoire de Parasitologie de LILLE (gel d'agarose, tampon véronal pH 8,2 force ionique : 0,1 , champ électrique : 20 V. cm⁻¹).

I - HISTORIQUE

A - LES MILIEUX DE CULTURE POUR TRYPANOSOMA CRUZI

Les Trypanosomatidae ont été les premiers protozoaires parasites cultivés in vitro (NOVY et MAC NEAL 1904)

Mais, de nombreux auteurs ont été amenés, soit à modifier ce premier milieu soit à en décrire d'autres, mieux adaptés aux recherches actuelles.

Le choix d'un milieu de culture se fait en fonction de :

- 1) l'isolement ou le diagnostic
- 2) l'entretien des souches
- 3) la production massive des Trypanosomes.

Les trypanosomes monogénétiques, les Stercoraria et les Salivaria n'ont pas les mêmes besoins en culture in vitro.

Nous n'étudierons dans cette partie bibliographique que les milieux de culture pour les Trypanosomes du groupe des Stercoraria.

Ces milieux sont de trois sortes : diphasiques, monophasiques, et cultures sur cellules ou embryon de poulet.

Signalons à ce propos les excellentes revues bibliographiques déjà réalisées par BISHOP (1967), TAYLOR et BAKER (1968).

Milieux diphasiques indéfinis :

Le milieu de NOVY et MAC NEAL (1904) comporte une phase solide, constituée de peptone et d'extrait de viande; Charles NICOLLE (1908) supprime ces deux derniers constituants pour les remplacer par de l'agar-agar additionné de sang de lapin.

Les trypanosomes sont ainsi cultivés dans l'eau de condensation, qui se forme à la surface de la phase solide.

Tous les milieux diphasiques ont comme constitution de base ce milieu N.N.N. (NOVY, NEAL modifié par NICOLLE).

Afin de remédier à l'absence ou à la quantité insuffisante d'eau de condensation à la surface de l'agar-agar, certains auteurs préconisent l'emploi de solutions salines de Ringer, de Locke (MATHIS 1906) ou de Hanks.

L'isolement de souches de Trypanosomes avec de tels milieux comporte de nombreux risques de contamination bactérienne. Aussi, pour purifier les cultures contaminées, SENECA et COLL (1949) recommandent l'addition de 1000 unités de Pénicilline et de Streptomycine par ml; WEINMANN (1960) préfère à la Streptomycine, l'emploi de la Dihydrostreptomycine moins toxique pour les Trypanosomes.

Les milieux diphasiques servent surtout à l'étude des besoins nutritionnels des Trypanosomes. ADLER (1934), SENEKJIE et LEWIS (1945) ont montré que *T. cruzi* se développe massivement dans un milieu contenant des éléments érythrocytaires. CHANG (1947) conseille l'addition de sérum et de solution d'hémoglobine. LWOFF (1938), (1940) et (1951), GUTTMANN et WALLACE (1964) montrent que l'hémine et l'acide ascorbique du sérum sont indispensables pour un développement maximum.

De nos jours, les milieux diphasiques ayant donné les meilleurs résultats sont :

- le milieu de LEHMANN (1964)
- le S.N.B. - 9 de DIAMOND et HERMAN (1954) :
 - . la phase solide contient du chlorure de sodium de la néopeptone, de l'agar et du sang défibriné de lapin.
 - . la phase liquide est de même composition mais sans agar.
- le 4N ("Nutrient agar blood medium") de BAKER (1966) :
 - . la phase solide se compose d'agar, de peptone, d'extrait de foie et de levure.
 - . la phase liquide est une solution de Locke modifiée, additionnée de Benzylpénicilline et de Streptomycine.
- le milieu de TOBIE (1964) :
 - . la phase solide se compose de Bacto-Beef, de Bacto-peptone et de Bacto-agar.
 - . la phase liquide est une solution de Locke modifiée.

Mais, tous ces milieux, valables pour l'isolement et l'entretien des souches, ne sont guère favorables à des cultures massives.

De plus, lors de la récolte antigénique et de sa purification, la phase solide entraîne un risque de souillure de l'antigène.

Pour obtenir un antigène somatique pur, TOBIE et REES (1948) préconisent la culture de T. cruzi dans des sacs à dialyse suspendus dans la solution de Locke, de Parker 199 ou de Hanks. Mais, cette technique s'avère délicate avec l'emploi de grands récipients nécessaires à une culture massive.

Aussi, les milieux monophasiques liquides paraissent-ils mieux adaptés pour ce genre d'étude.

Milieux monophasiques liquides

KELSER (1936) préconise un tel milieu pour des cultures à long terme de T. cruzi. D'autres variantes de ce milieu, décrites par NOGUCHI et WENYON (1951) SILVA (1954), permettent une survie prolongée des flagellés sans développement massif.

Le milieu autoclavable de LITTLE et SUBBAROW (1945) est un des premiers milieux monophasiques à permettre des cultures relativement riches en parasites.

Un nombre important d'auteurs ont recommandé l'emploi de leur milieu monophasique liquide; citons les principaux:

- BONE et PARENT (1953) ajoute du Bacto-Tryptose, une infusion de foie et de l'hémine à une solution saline proche du liquide de Hanks.

- SAMPATH et LITTLE (1949) enrichissent le milieu de LITTLE et SUBBAROW (1945) avec de l'acide folique, de la nicotinamide, de thiamine et de choline.

- le milieu de FIFE et KENT (1960) et de WARREN (1960).

- le milieu d'IRALU (1967) se compose d'une solution saline additionnée de "Trypticase soy broth" et de sérum humain.

Des milieux monophasiques parfaitement définis furent décrits par CITRI et GROSSOWICZ (1955) et par GUTTMANN (1966); ils sont essentiellement préconisés pour les études métaboliques et physiologiques des Trypanosomes.

A. POIRIER (1948), avec le milieu de M. LWOFF (1938) enrichi de sang décomplémenté, a obtenu des cultures massives de T. cruzi. Mais, l'addition de globules rouges risque de souiller l'extrait antigénique lors de sa récolte.

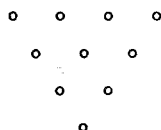
JADIN et PIERREUX (1960) ont décrit un milieu de culture parfaitement adapté à la culture massive de T. cruzi. Ils utilisent une solution de Hanks additionnée de sérum de veau, d'hydrolysate de lactalbumine et d'extrait de globule de boeuf. JADIN et WERY (1963), WERY et DE GROODTLASSEEL (1966) obtiennent avec ce milieu G. L. S. H. ("Hanks modifié") un nombre maximum de trois milliards de Trypanosomes par mm³ au 7ème jour de culture. Ce milieu G. L. S. H., excellent pour T. cruzi, peut servir aussi à la culture massive des Trypanosomes africains (JADIN et LE RAY - 1969).

Cultures sur cellules -

Les cultures de MEYER et OLIVIERA (1948) sur des oeufs embryonnés, de KOLLERT et COLL (1956) sur des tissus embryonnaires, sont d'un grand intérêt pour l'étude du cycle chez l'hôte vertébré.

Mais, une récolte antigénique à partir de ce type de culture ne paraît pas possible actuellement.

Il nous a semblé souhaitable de choisir le milieu de Hanks modifié (G. L. S. H.) de JADIN pour l'obtention massive d'antigène T. cruzi.



B - IMMUNOLOGIE DES TRYPANOSOMES

Trois récents articles de LUMSDEN (1967), GRAY (1967), ZUCKERMAN et RISTIC (1968) posent les problèmes suivants :

- . la connaissance analytique de l'antigène interne (somatique);
- . l'existence ou la non existence de variations antigéniques entre les différentes souches d'un même parasite;
- . la connaissance des antigènes spécifiques de chaque variant d'une même souche;
- . Les communautés antigéniques entre les divers protozoaires;
- . l'obtention d'antigènes standardisés pour les épreuves sérologiques et immunologiques.

1) Etude analytique de l'antigène interne

a) - Trypanosoma cruzi

. des essais infructueux ont été tentés par STREJAN (1965) en immunoélectrophorèse avec de l'antigène obtenu par culture in vitro.

. deux composants polysaccharidiques d'une haute antigénicité ont été trouvés, après extraction au formamide, avec la méthode de double diffusion en tube par MUNIZ (1967).

. Seuls, GOLDMANN et SIDDIQUI (1965) ont pu, par analyse immunoélectrophorétique, mettre en évidence 7 à 8 "fractions"; l'antigène étant obtenu en culture monoxénique avec Entamoeba histolytica.

b) autres Trypanosomatidae

. GARCIA (1965), par analyse immunoélectrophorétique, SCHNEIDER et HERTIG (1966), par la méthode de double diffusion en gélose, ont observé, au maximum, 5 arcs de précipitation avec de l'antigène de Leishmania révélé par un antisérum homologue.

. CROOK et COLL (1969) décrivent, grâce à l'analyse immunoélectrophorétique, 11 arcs de précipitation avec un antigène Leishmania mexicana (cultivé sur milieu de TOBIE et REES additionné de sérum humain); mais il est important de souligner le fait que ces auteurs négligent la possibilité de souillures dues au sérum humain.

. BROWN et WILLIAMSON (1964) avec Trypanosoma rhodesiense ont obtenu, par ultracentrifugation et double diffusion en gélose deux antigènes : Ag 1S et Ag 4S (ce dernier est associé ,

selon eux, à l'agglutination.)

. NJOGU et HUMPHRYES (1967a) (1967b) ont étudié, par la méthode de l'électrophorèse en gel d'acrylamide :

- d'une part : la distribution des enzymes dans le sérum de rats infectés avec Trypanosoma brucei
- d'autre part, les composants de T. brucei; le travail en révèle 29. Cependant, Il faut noter que les auteurs ne tiennent pas compte des souillures de l'antigène par les composants sériques du rat.

2) - Variations antigéniques entre les différentes souches d'une même espèce.

Une classification en 3 groupes (A, B, C) a été établie pour T. cruzi :

. par NUSSENZWEIG et GOBLE (1966) (travaux effectués par la méthode de double diffusion en gélose avec 21 souches différentes de T. cruzi.)

. et par GONZALEZ-CAPPA et KAGAN (1969) (travaux effectués par double diffusion en gélose et immunoélectrophorèse avec 10 souches de T. cruzi)

Dans ces deux travaux, l'immunsérum homologue ne permet de révéler dans l'antigène que 5 à 6 "fractions" au maximum. Aussi nous paraît-il hasardeux avec des cartes antigéniques si rudimentaires, d'envisager des variations antigéniques qui portent essentiellement sur des fractions mineures de l'antigène.

3) - Antigènes externes (de surface) et antigènes circulants -

La variation antigénique d'une souche en fonction de l'état immunitaire de l'hôte serait due à ces deux types d'antigène, le parasite étant alors capable de modifier certains antigènes de surface et ses métabolites lorsque la pression immunologique de l'hôte devient trop forte.

Dès 1963, SEED, a montré le rôle des antigènes de surface dans l'adaptation à l'état immun de l'hôte d'une souche de T. lewisi.

Par ailleurs, les antigènes présents dans la circulation, (appelés souvent "Exoantigènes" et qui pour de nombreux auteurs représentent des antigènes métaboliques libérés par le parasite), ont été bien étudiés pour T. cruzi in vitro et in vivo.

Remarquons à ce propos que le terme d'"Exoantigène" peut apparaître extrêmement discutable eu égard aux lyses somatiques fréquentes des Trypanosomes. Ainsi, la présence d'antigènes circulants a été montrée par :

. FIFE et KENT (1960) grâce à la culture dans des sacs de cellulose et à la technique sérologique de fixation du complément.

. MUNIZ (1967) in vitro avec la réaction de double diffusion en gélose (méthode d'Ouchterlony).

. DE SIQUEIRA et Coll (1967) utilisant les réactions de fixation du complément et de précipitation en milieu gélifié, démontrent la présence d'un antigène soluble dans le sérum des rats infectés par T. cruzi en opposant ce sérum à celui d'un lapin hyperimmunisé ou de sujets humains atteints de Trypanosomiase américaine.

Avec les mêmes méthodes, GRAY (1961), a pu mettre en évidence 5 antigènes solubles dans le sérum de rats infectés avec T. vivax, T. gambiense, et T. brucei.

4) communautés antigéniques entre les divers protozoaires -

a) T. cruzi

. DUPOUEY et MARECHAL (1966) ont montré/avec les réactions de précipitation en milieu gélifié, de fixation du complément et d'immunofluorescence, que T. cruzi, T. méga, et T. gambiense n'avaient pas de communautés antigéniques. Notons que les auteurs n'ont pas employé un système immunologique tel que l'immunoélectrophorèse pour standardiser leurs antigènes et choisir les meilleurs hyperimmunsérums.

. GARCIA et Coll (1969) en immunoélectrophorèse et double diffusion en gélose ont trouvé 7 arcs en commun entre T. cruzi et T. lewisi.

b) Autres Trypanosomatidae

ROUSSEAU-BAELDE et MISSELYN (1963) après électrophorèse en gel des antigènes de T. gambiense, T. rhodesiense et T. brucei n'obtiennent aucune réaction croisée en raison de l'emploi de mauvais immusérums.

5) Obtention d'antigène pour les épreuves sérologiques -

a) - T. cruzi Beaucoup d'auteurs, précédemment cités, ont testé et employé leurs antigènes à des fins diagnostiques surtout avec la méthode de la fixation du complément.

b) Autres Protozoaires

. MATHOT et Coll (1967) emploient l'immunoélectrophorèse pour mettre en évidence des précipitines, chez des hamsters infectés par L. donovani.

. RANQUE et Coll (1969), avec de l'antigène de Crithidia fasciculata et C. oncopelti cultivés in vitro, ont mis en évidence des précipitines sériques, grâce aux méthodes de précipitation en gélose, dans les leishmanioses canines.

CONCLUSION

En considérant l'ensemble de ces travaux, réalisés avec les méthodes de précipitation en milieu gélifié, on pourrait penser que la mosaïque antigénique des Trypanosomatidae est simple. Or, des travaux récents, fondés sur une immunisation prolongée du lapin et sur une standardisation qualitative des antigènes, de ZUCKERMAN et RISTIC (1968) pour les Plasmodium, AFCHAIN et CAPRON (1969) avec T. cruzi, OELERICH (1969) avec T. lewisi et LE RAY (1970) avec T. brucei, ont montré que la structure antigénique est au moins aussi complexe que celle observée chez les Helminthes et les Champignons.

II - MATERIEL ET METHODES

A - PREPARATION DE L'ANTIGENE

1) cultures

a) milieu de culture -

La culture des Trypanosomes nécessite, comme pour les cultures de tissus, l'emploi d'une verrerie pyrex traitée au mélange sulfochromique, rincée à l'eau distillée, puis stérilisée.

Le milieu de culture G. L. S. H. de JADIN et PIERREUX (1960) demande la préparation préalable de l'extrait globulaire de boeuf (Bacto Beef Blood). Cette solution, portée à l'ébullition 1/4 d'heure, est filtrée sur papier filtre ordinaire, autoclavée, puis stockée à 4°C.

Le milieu de culture se compose de la solution de Hanks (750ml) additionnée de :

- 150 ml d'extrait globulaire de boeuf
- 100 ml de sérum de veau frais, filtré et stérilisé par filtration.
- de 200 000 unités de pénicilline
- de 200 000 unités de Streptomycine.

Cette solution, de pH final 7,2, est ensuite stérilisée par filtration sur filtre Seitz.

Ce milieu, manipulé en chambre stérile, est réparti :

- d'une part dans des veinotubes à raison de 4ml par tube
- d'autre part :
 - . dans des flacons de 200ml à raison de 40ml de milieu par flacon
 - . dans des flacons de 1000ml à raison de 250ml de milieu par flacon.

Les tubes et flacons sont ensuite placés à l'étuve à 28°C pendant 24 heures, ce qui permet un contrôle rigoureux de leur stérilité.

b) Ensemencement

L'entretien de la souche en routine se fait avec des veino-tubes contenant 4ml de milieu de culture.

Une quinzaine de veinotubes sontensemencés régulièrement toutes les semaines; mais, pour exalter la souche en vue de cultures massives, il est souhaitable de la repiquer tous les trois jours. (x).

L'inoculum (1/2ml environ par veinotube) est prélevé, avec une pipette Pasteur stérile, au fond du tube de la série précédente (8 jours de culture).

L'abondance des flagellés et la stérilité de chaque inoculum sont vérifiés en microscopie optique après chaque ensemencement.

Les cultures massives, en flacons de 1000ml contenant 250ml de milieu de culture, demandent d'abord la mise au point et l'entretien régulier de la souche dans des flacons de 200ml contenant 40ml de milieu.

Dans ces flacons de grande capacité par rapport au volume de liquide, le milieu est étalé en une couche mince, ce qui assure une meilleure oxygénation, d'où un développement plus important des flagellés.

L'ensemencement des flacons contenant 40ml de milieu se fait à partir des veinotubes repiqués tous les trois jours. L'inoculum (4ml) est prélevé stérilement à la seringue, après vérification de la stérilité et de l'abondance des flagellés microscopiquement à frais.

Les flacons de 250ml de milieu sontensemencés avec 40ml de culture très riche. Toutes ces manipulations sont faites à la seringue en chambre stérile.

Quand la culture massive atteint son rendement maximum, il est possible d'ensemencer directement, sans seringue, 4 flacons de 250ml avec un flacon de 250ml, sans passer par l'étape intermédiaire avec des flacons de 40ml.

Après 10 jours de culture à 28°C en étuve obscure, il est possible de récolter une quantité importante d'antigène corps cellulaires de T. cruzi.

(x) - Nous disposons d'une souche de T. cruzi en culture (Tehuentepec) qui nous a été fournie sur milieu G. L. S. H. par Monsieur le Professeur JADIN de l'Institut de Médecine Tropicale d'ANVERS.

c) Développement de la culture.

En général, les Trypanosomes du groupe des Salivaria (T. congolense, T. gambiense...) ne donnent jamais de voile en culture in vitro.

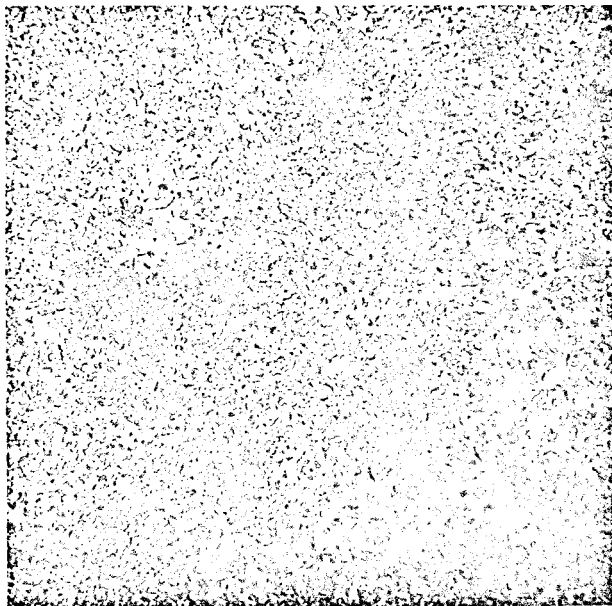
Par contre, les Stercoraria ont tendance à former des cultures en voile sur la plupart des milieux proposés. Seul T. cruzi fait exception; dans le milieu de Hanks modifié, il se développe dans le fond du récipient :

On observe un culot et un surnageant trouble contenant des formes flagellées. Après agitation lente du récipient, la culture présente un aspect nettement granuleux.

Le surnageant, étudié au microscope à contraste de phase ou sur frottis colorés au May Grunwald-Giemsa, contient de nombreuses formes Epimastigote, et très peu de formes métacycliques : Trypomastigote.

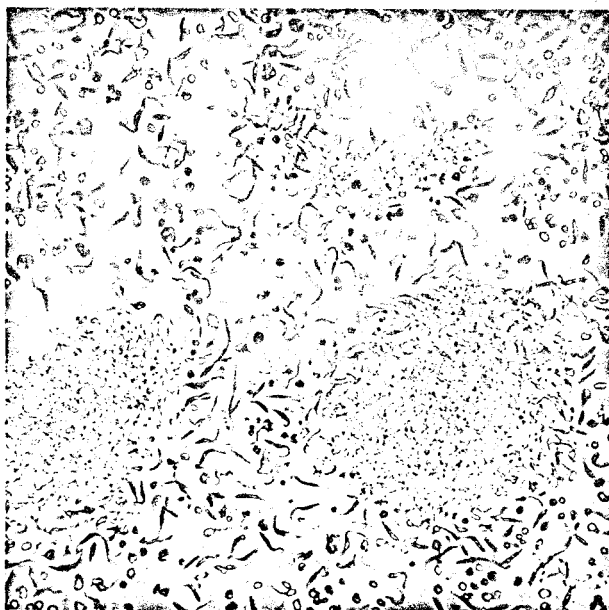
Le culot (examiné dans les mêmes conditions d'observation) se compose essentiellement de nombreux amas de formes Epimastigote et Amastigote et de formes Epimastigote, Amastigote et Trypomastigote libres.

Entre ces trois formes du même parasite, on observe également toutes les formes intermédiaires (en cours de division).



Photographie 1 -

Densité de T. cruzi dans le culot de culture (Microscopie optique, faible grossissement oc. 6, obj. 10)



BUS
LILLE

Photographie 2

Idem. Observation à fort grossissement (oc. 6, obj. 40) montrant les amas d'Amastigote et de Epimastigote et les formes Epimastigote et Amastigote libres.

WERY et DE GROODT-LASSEL (1966), avec le même milieu et une souche identique, ont étudié la cinétique de la culture à 28°C.

Après ensemencement dans le milieu neuf, ils observent :

. du 2ème au 5ème jour : une phase de multiplication à croissance logarithmique des formes Amastigote et Epimastigote; les formes métacycliques, en petit nombre, ne se multiplient pas.

. une phase stationnaire, du 5ème au 16ème jour de culture: le nombre de Trypanosomes peut atteindre en culture massive, trois milliards par millilitre dans le fond du récipient.

. une phase de lyse du parasite du 16ème au 180ème jour quand le milieu s'épuise.

2) récolte de l'antigène corps cellulaires -

L'antigène corps cellulaires est récolté pendant la phase stationnaire : la 10ème jour après la mise en culture.

Après un contrôle microscopique et bactériologique (sur milieu D. T. B. - "Difco Tryptose Broth") de la stérilité de chaque flacon, le milieu de culture est homogénéisé, puis centrifugé dans des pots de 45ml à 2500 t.p. mn pendant 15mn.

Nous éliminons alors le surnageant de centrifugation. Les culots, réunis dans un seul pot, sont lavés dans 45ml de la solution saline glucosée de Hanks, puis de nouveau centrifugés à la vitesse de 2500t.p mn pendant 15 mn. Nous répétons cette opération 7 fois.

La solution saline glucosée utilisée pour les lavages est à 4°C pour éviter une lyse trop importante des corps cellulaires de T. cruzi.

Après plusieurs centrifugations, l'intégrité cellulaire et la vitalité des Trypanosomes sont contrôlées au microscope à contraste de phase.

Les eaux de lavage successives sont récupérées, dialysées puis lyophilisées séparément, en vue de contrôles ultérieurs (voir p 21).

Le culot de corps cellulaires, ainsi débarrassé de toute trace de milieu de culture, est additionné d'eau bidistillée stérile (10ml). Puis 3 cycles de congélation-décongélation (congélation à -70°C, dans un mélange de neige carbonique et d'alcool, suivie d'une décongélation rapide à 4°C.) assurent une parfaite désintégration des corps cellulaires et la libération des protéines somatiques.

Cette solution est ensuite congelée en surface à -70°C puis stockée à -20°C . Chaque semaine nous ensemençons 16 flacons contenant 250ml de milieu, ceci nous permet de récolter 10 flacons par semaine ce qui correspond à environ 5 Grs de corps cellulaires en poids humide.

3) Préparation d'extraits antigéniques solubles -

L'antigène corps cellulaires de T. cruzi contient de nombreuses fractions insolubles (antigènes de surface liés aux membranes) d'où la nécessité de pratiquer une extraction d'antigènes somatiques solubles (antigène dit "standard" ou 1°/00).

40ml de la solution stock (environ 20 Grs poids humide de corps cellulaires) sont décongelés puis additionnés d'une solution de chlorure de sodium à 0,017 M correspondant sensiblement à une dilution de 1g/litre. (environ 130ml):

Le mélange est ensuite passé à froid au broyeur Virtiss (vitesse moyenne : environ 20 000 t.p. mn).

Le mélange est congelé à -20° puis broyé au mortier jusqu'à liquéfaction. On recongèle à nouveau et on répète l'opération 3 à 4 fois. Après le dernier broyage, la solution est portée en agitation magnétique une nuit à 4°C (ceci pour permettre une meilleure solubilité des protéines) puis la solution est centrifugée à 16 500 g à 4°C pendant 1 heure. Le Surnageant est dialysé 20 heures environ contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

Cet extrait antigénique soluble est ensuite utilisé pour les réactions de précipitation en agarose.

B - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES -

Nous avons exclusivement fait appel aux techniques qui mettent en oeuvre la réaction de précipitation antigène-anticorps en milieu gélifié : méthode d'Ouchterlony et immunoélectrophorèse.

Il est donc nécessaire de préparer de bons immunsérums à partir des extraits antigéniques solubles.

1) Préparation des antisérums -

Les immunsérums sont obtenus par immunisation expérimentale de lapins adultes.

L'immunisation par voie sous-cutanée nécessitant une quantité trop importante d'antigène, nous avons préféré adopter la technique, largement

utilisée, d'injection de l'antigène dans la région sous-claviculaire du lapin.

Cette méthode consiste à injecter chaque semaine 2 mg d'antigène dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique et incorporé dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet.

Après la 5ème semaine, le prélèvement de sang s'effectue, à la veine marginale de l'oreille du lapin, par un dispositif de saignée sous vide.

Le lapin est ainsi saigné tous les 15 jours, les injections antigéniques restant hebdomadaires.

Nous avons également immunisé des lapins par injections sous-cutanées d'antigènes "frais" (corps cellulaires entiers).

L'analyse immunoélectrophorétique permet d'observer la progression du taux des anticorps au cours de l'immunisation. Grâce à un antiserum de titre connu, elle permet de contrôler la qualité antigénique de l'extrait étudié.

Il fut également utilisé des sérums de souris infectées par passage mécanique avec les souches de T. cruzi Tulahuen et Tehuentepec (x).

2) Techniques de précipitation en agarose.

Les techniques de précipitation en gélose ou en agarose (double diffusion d'Ouchterlony et immunoélectrophorèse) sont des méthodes fines et élégantes d'analyse des composants protéiques d'une solution.

L'immunoélectrophorèse en gélose, mise au point par GRABAR et WILLIAMS (1953), modifiée par SHEIDEGGER (1953), pour l'étude des protéines sériques, fut adaptée par le Laboratoire de Parasitologie de LILLE à l'étude des antigènes parasitaires dans un but analytique et diagnostique.

L'étude de la structure antigénique des Helminthes et ses répercussions immunologiques a fait l'objet de nombreuses publications par BIGUET et Coll. et CAPRON et Coll., Les antigènes fongiques ont été étudiés par BIGUET et Coll..

Les analyses immunoélectrophorétiques des antigènes parasitaires, d'abord faites en gélose, se sont avérées d'une sensibilité plus grande par l'emploi des gels d'agarose.

(x) - Nous remercions M. M. les professeurs LAPIERRE et JADIN qui nous ont fourni ces souches de T. cruzi sur souris.

Le gel d'agarose se prépare extemporanément en dissolvant 90 mg d'agarose dans 10 ml d'une solution tampon véronal sodé à pH 8,2. La limpidité de la solution est obtenue en portant le mélange à 85°C 90°C dans un bain-marie pendant une demi-heure et en agitant de temps en temps.

Ensuite le gel d'agarose tamponné est coulé sur des lames de verre :

- de format 10,5 cm x 5 cm à raison de 9,5 ml par lame (macrotechnique).
- ou de format 8 cm x 2,5 cm à raison de 4 ml par lame (microtechnique).

a) double diffusion en agarose : technique d'OUCHTERLONY.

Principe : La technique d'OUCHTERLONY (1948), ou suivant sa modification préconisée par ABELEV et ZVETKOF (1960), a comme principe, la diffusion de l'antigène et de l'antisérum, l'un vers l'autre, à travers le gel d'agarose.

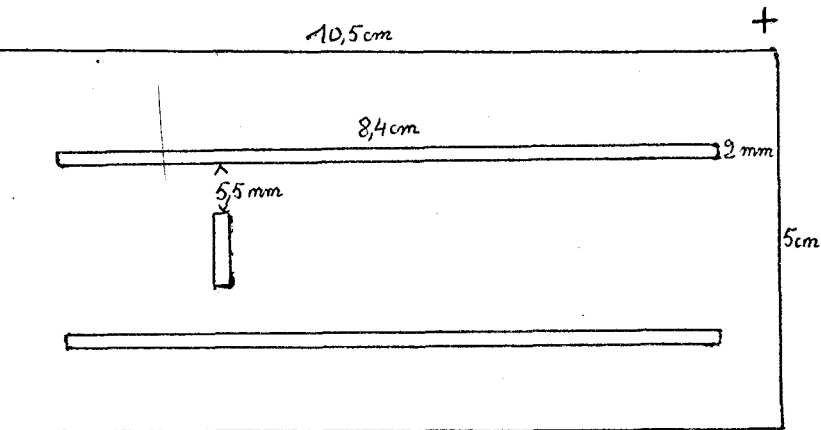
A l'endroit du front, chaque fraction antigénique, se complexant avec l'anticorps précipitant correspondant, va provoquer la formation d'un précipité présentant l'aspect d'un arc plus ou moins incurvé.

b) Immunoélectrophorèse

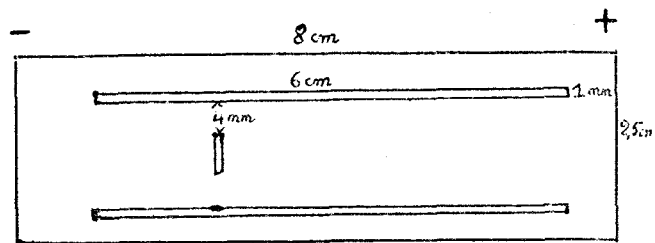
Technique : L'analyse d'un antigène, pour des raisons de commodité de lecture, peut se réaliser en macrométhode avec des lames de verre de format 10,5 cm x 5 cm, ou, pour des raisons d'économie de l'antigène, en microméthode avec des lames de format 8 cmx2,5 cm.

Macrométhodea) Préparation des lames

9,5 ml de solution d'agarose par lame

Microméthode

4 ml de solution d'agarose par lame

b) Electrophorèse des Antigènes

. 5 mg d'antigène, dissous dans 2 gouttes d'eau distillée ou de tampon, remplissent la fente centrale

. 1 mg d'antigène, dissous dans une goutte d'eau distillée ou de tampon.

Une bonne séparation antigénique est obtenue avec :

. ddp de 22 volts pendant 5h30

. ddp de 20 volts pendant 3 h

c) Immunodiffusion

Après la durée de migration électrophorétique, on enlève les bandes d'agarose qui combrent les gouttières. L'immunsérum, lyophilisé et dilué dans le tiers de son volume d'eau physiologique, sert au remplissage des gouttières à raison de :

. 0,3 ml par fente

. 0,1 ml par fente

d) Incubation

. 72 h à la température du labo.

. 48 h à la température du labo.

Lavage, déminéralisation et coloration des lames :

Les lames sont lavées pendant trois jours dans de l'eau physiologique tamponnée.

Ensuite, les plaques sont recouvertes d'un morceau de papier Whatman de même format, puis séchées à l'aide d'un ventilateur.

Après complète déshydratation, ces lames déminéralisées sont colorées dans un bain d'amidoschwarz (colorant des protéines).

3) Technique d'adsorption ou de saturation .

La méthode consiste à précipiter, par un immunsérum correspondant, un antigène hétérologue, afin de ne conserver dans le sérum que les anticorps précipitants réagissant avec l'antigène homologue.

Dans un tube à hémolyse, on mélange en proportions variables l'immunsérum et l'antigène (environ 1 ml d'Antisérum pour 20 mg d'antigène). Après agitation, le tube est laissé 2 heures à 37°C, puis 12 heures à 4°C.

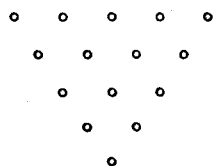
Le surnageant, après centrifugation du tube à 6000 t.p. mn pendant 20 mn, est testé contre l'antigène homologue et hétérologue par la méthode d'immunoélectrophorèse.

Dans le cas d'une saturation totale, le surnageant, testé contre l'antigène hétérologue saturant, ne doit permettre l'observation d'aucun arc de précipitation.

4) Techniques enzymatiques

La révélation enzymatique histologique a été adaptée pour les complexes antigène-anticorps en immunodiffusion par URIEL (1963). Ces mêmes techniques de révélation ont été appliquées au matériel parasitaire par TRAN VAN KY et Coll (1967); les principes et les techniques des réactions ont été détaillées dans la Thèse de TORCK-DELCROIX (1968).

La technique consiste, après immunoélectrophorèse classique et la déminéralisation des lames, à faire agir différents substrats synthétiques (chromogéniques ou non) ou naturels sur les lames. Un composé final coloré et insoluble permet de visualiser la réaction enzymatique portant sur une ou plusieurs "fractions" antigéniques.



III RESULTATS

A - ETUDE PRELIMINAIRE

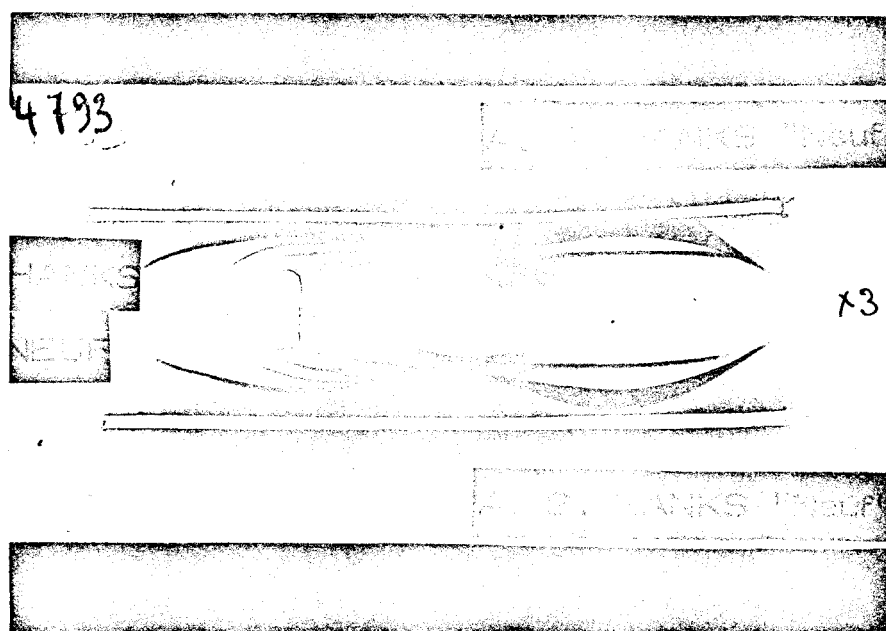
1) Etude de l'antigène "milieu de culture" (G. L. S. H.)

Notre but étant d'analyser, par la méthode immunoélectrophorétique, la mosaïque des antigènes solubles somatiques des formes Amastigote et Epimastigote de T. cruzi cultivées in vitro, il nous a semblé souhaitable, dans un travail préliminaire, d'analyser la structure antigénique du milieu G. L. S. H. (x) servant à la culture en masse de ce parasite.

Les différents composants de ce milieu sont d'une solubilité totale, aussi n'est-il pas nécessaire de procéder à une extraction d'antigènes solubles "standard". L'antigène brut, obtenu par dialyse suivie d'une lyophilisation, sert directement à l'immunisation expérimentale des lapins et à la réalisation des immunoélectrophorèses.

Cet extrait, fortement antigénique car riche en protéines sériques bovines, donne de bons immunosérums dès les premières prises de sang (après 1 mois 1/2 à 2 mois d'immunisation); l'hyperimmunosérum est obtenu vers le 3ème mois d'immunisation, ensuite le taux des anticorps diminue.

L'analyse immunoélectrophorétique des extraits antigéniques est pratiquée à l'aide de plusieurs hyperimmunosérums de lapin. A des différences mineures près, les immunoélectrophorégrammes qu'ils déterminent sont identiques, et permettent la révélation de plus de 23 composants antigéniques, matérialisés par des arcs de précipitation (photographie n°3, page 20).



Photographie n°3 : Immunoélectrophorégramme de l'antigène milieu de culture (G. L. S. H.) par des immunosérums homologues.

(x) Glucose, lactalbumine, sérum de lapin, ...

Une étude comparée des différents composants de ce milieu, par rapport à l'ensemble, a permis de vérifier que le sérum de veau est le seul matériel antigénique de ce milieu.

En effet, l'extrait globulaire de boeuf (Bacto Beef Blood) est autoclavé à 120°C et il perd toute valeur immunogène. Nous avons préparé plusieurs antigènes lyophilisés d'hydrolysats de lactalbumine, ces lyophilisats n'ont donné en immunoélectrophorèse aucun arc de précipitation vis à vis de plusieurs immunosérums "milieu de culture".

De plus, la structure antigénique du sérum de veau étant identique à celle du milieu de culture, il est préférable d'utiliser l'antigène sérum de veau pour les réactions d'adsorption en vue de l'étude de la structure antigénique parasitaire de T. cruzi.

Conclusion : le sérum de veau est le seul composant antigénique contenu dans le milieu total; aussi, vu son grand pouvoir immunogène, il est souhaitable de procéder à de nombreux lavages lors de la récolte des corps cellulaires de T. cruzi et d'avoir recours à une méthode immunologique pour contrôler la pureté antigénique de l'extrait de T. cruzi.

2) Contrôle immunologique de la pureté antigénique de l'extrait de T. cruzi.

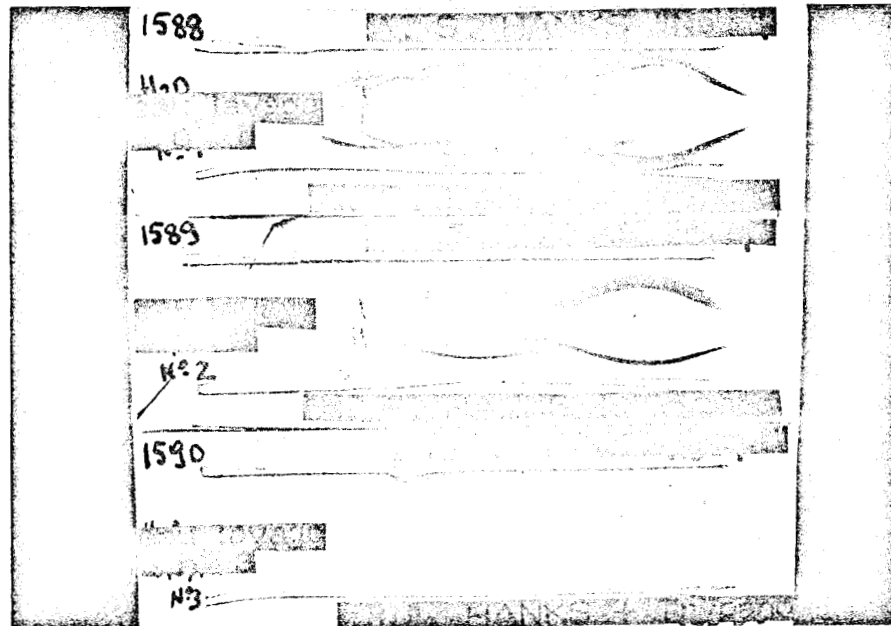
Les diverses eaux de lavage (au cours de la récolte des corps cellulaires) sont séparément centrifugées à 10 000 t.p. mn., dialysées puis lyophilisées.

Les différents lots d'eau de lavage sont testés en immunoélectrophorèse contre un antiserum milieu de culture neuf. (Photographie n°4, page 22).

L'immunoélectrophorégramme des eaux de lavage n°1, 2 et 3 nous révèle respectivement 11, 7 et 2 fractions antigéniques.

Les eaux de lavage suivantes ne nous révèlent qu'une trace dans la zone des albumines.

Ainsi l'immunoélectrophorèse, en permettant de réaliser la cinétique de la disparition des protéines du milieu de culture dans les eaux de lavage successives, semble être une méthode de choix pour le contrôle de la purification et la standardisation des antigènes parasitaires cultivés in vitro dans des milieux très immunogènes.



Photographie n°4 : Immunoélectrophorégramme en microméthode des eaux de lavage successives lors de la récolte cellulaire de *T. cruzi*.

B - ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE de L'EXTRAIT SOLUBLE de *T. CRUZI* -

1) Structure antigénique de *T. cruzi*.

L'analyse de la structure antigénique d'un matériel parasitaire macroscopique et de récolte aisée ne pose aucune difficulté.

Pour *T. cruzi*, il se pose un problème de récolte massive de corps cellulaires; aussi avons nous dû ensemercer un nombre très important de flacons (16 flacons de 250 ml de milieu par semaine).

De plus, à chaque étape de l'extraction d'un antigène, l'extrait risque d'être dénaturé partiellement; aussi fallut-il procéder à de nombreuses extractions et, pour chaque lot, vérifier sa valeur antigénique, en immunoélectrophorèse, vis à vis d'un antisérum homologue de référence.

Il est certain par ailleurs que la pureté bactériologique des cultures doit être rigoureusement respectée et que des contrôles réguliers, avant la récolte antigénique, doivent être effectués.

Pour éviter les réponses individuelles, nous avons immunisé de très nombreux lapins.

Cette étude a été réalisée en se basant sur les réponses immunologiques de 14 lapins et sur 12 lots d'antigène 1°/oo "Standard" (ce qui correspond à 1gr environ d'antigène soluble ou 100 gr environ en poids humide de corps cellulaires de T. cruzi.)

a) cinétique de l'apparition des anticorps

Nous avons suivi l'apparition des anticorps expérimentaux chez le lapin par prises de sang répétées de 15 en 15 jours et nous avons tracé la courbe correspondante (tableau n°1 page 24). On constate une augmentation croissante du nombre de systèmes précipitants jusqu'à la 19ème semaine d'immunisation par injection de l'antigène 1°/oo dans la région "sous claviculaire". L'hyperimmunsérum est obtenu vers la 19ème semaine d'immunisation (23 "fractions" antigéniques").

L'analyse immunoélectrophorétique, en gel d'agarose, de l'extrait antigénique soluble de T. cruzi, révélé par un immunsérum homologue de lapin, met en évidence l'existence de 23 "fractions" antigéniques (diagramme n°1 page 25 (B), photographie n°5 page 26).

Cette analyse immunoélectrophorétique a été pratiquée à l'aide de plusieurs hyperimmunsérum de lapins (5 lapins ont été immunisés avec de l'antigène soluble 1°/oo) et les immunoélectrophorégrammes qu'ils déterminent sont identiques.

b) Réactions croisées avec le milieu de culture -

. L'analyse antigénique du sérum de veau, seul matériel antigénique contenu dans le milieu de culture, par l'immunsérum T. cruzi, permet de révéler 8 "fractions" (diagramme n°1 page 25 (A)); ces "fractions" antigéniques sont numérotées de a à h suivant leur position du pôle cathodique au pôle anodique.

. Par contre, l'immunoélectrophorégramme de l'antigène T. cruzi 1°/oo, par un immunsérum de lapin anti-milieu de culture ou un immunsérum anti-sérum de veau ne permet de révéler que 3 ou 4 arcs de précipitation (photographie n°6 page 26).

. Or le contrôle de pureté de l'antigène, réalisé par l'analyse immunoélectrophorétique des eaux de lavage successives (page 21), nous a montré qu'à partir du 4ème lavage, il était possible de ne révéler qu'une seule "fraction" antigénique.

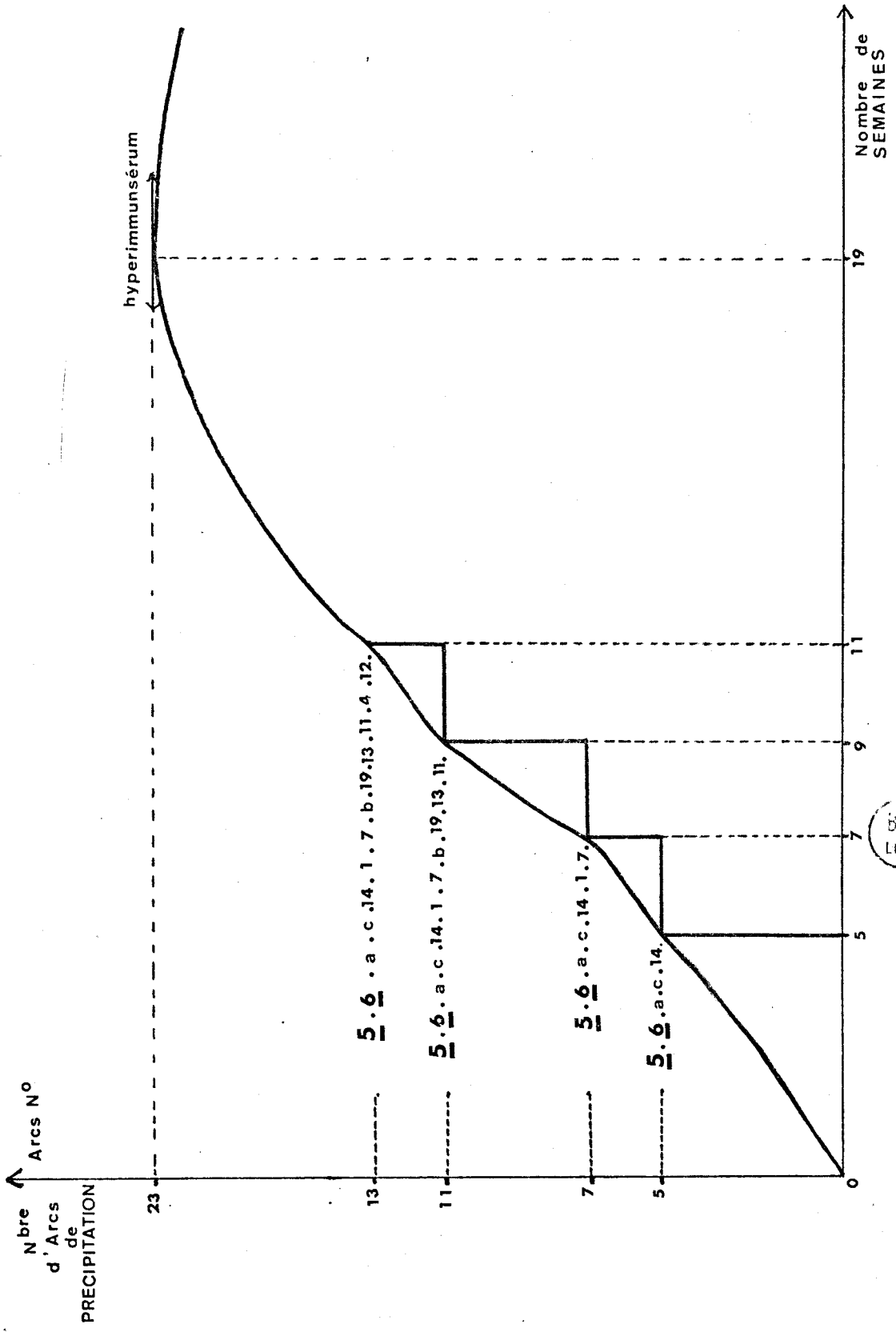


Tableau 1 .

Lapin 447. Immunisation avec de l'antigène T. cruzi 1 % par voie "sous claviculaire".

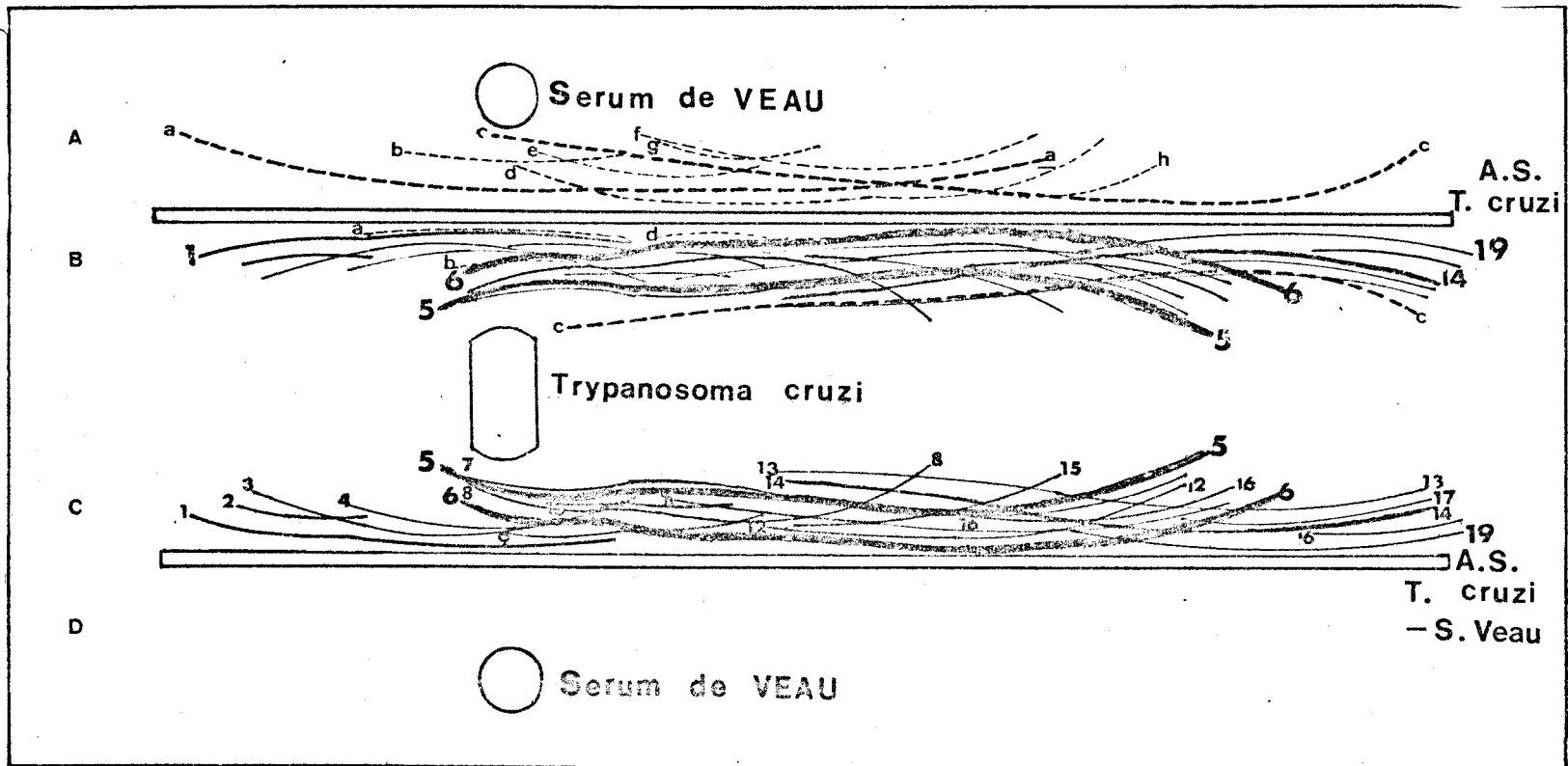
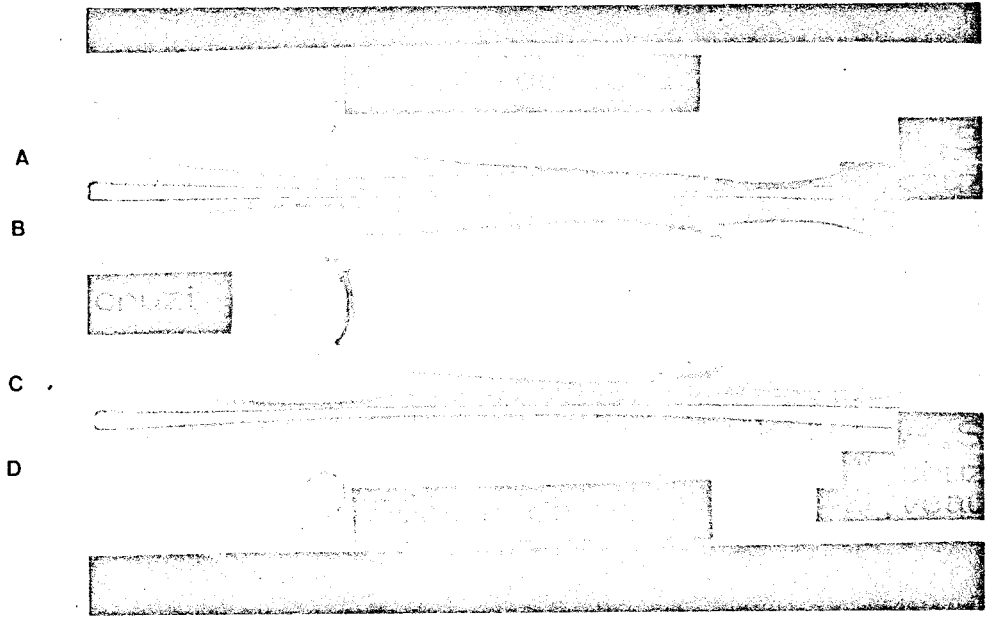


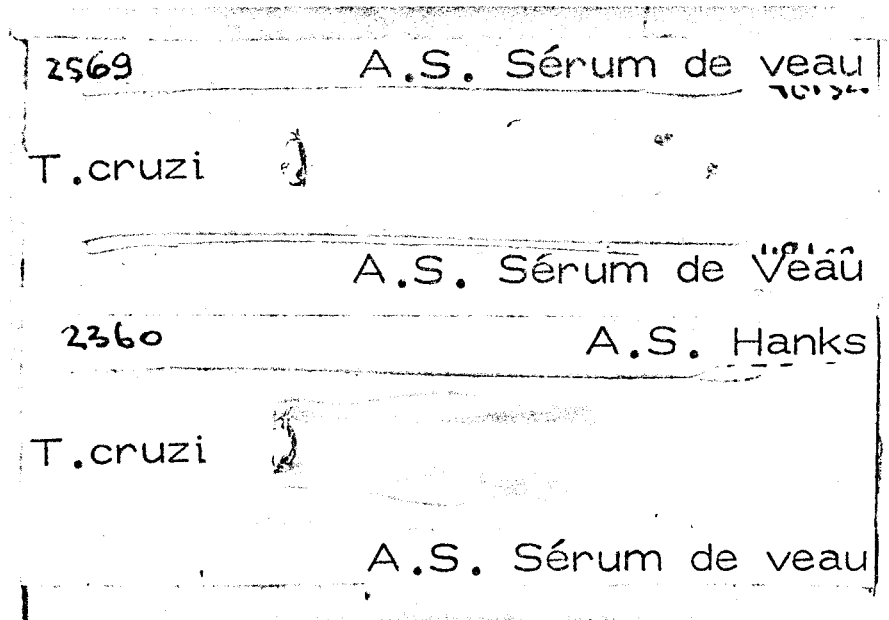
Diagramme 1 :

Représentation des arcs de précipitation après analyse immunoélectrophorétique de l'extrait soluble de Trypanosoma cruzi révélé par un immunsérum homologue de lapin.





Photographie n°5 - Analyse immunoélectrophorétique de l'extrait soluble de Trypanosoma cruzi révélé par un immunsérum homologue.



Photographie n°6 - Immunoélectrophorégramme, en microtechnique, de l'extrait soluble de T. cruzi révélé par un immusérum anti-sérum de Veau.

Ces trois résultats, à première vue contradictoires, peuvent néanmoins trouver une explication logique. Les formes Epimastigote et Amastigote contiennent, soit par absorption en surface, soit dans les vacuoles endoplasmiques après pinocytose, des traces de protéines sériques de veau provenant du milieu de culture (x).

Lors des immunisations expérimentales, les traces de sérum de veau contenues dans l'antigène T. cruzi sont très immunogènes pour le lapin et déterminent précocement un nombre important de systèmes précipitants (8 "fractions" antigéniques vis à vis de l'antigène sérum de veau).

Par contre l'antigène T. cruzi ne révèle, vis à vis de son immunsérum homologue ou d'un immunsérum anti-sérum de Veau, que 4 arcs de précipitation en raison de la très faible concentration en protéines sériques de Veau dans l'extrait de T. cruzi (diagramme n°1 page 25 (B)).

Conclusion : Il est donc nécessaire pour analyser la mosaïque antigénique parasitaire de l'extrait soluble de T. cruzi, de réaliser l'adsorption des immunsérums anti-T. cruzi par de l'antigène sérum de veau lyophilisé ou de l'antigène milieu de culture .

c) adsorption

L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait antigénique soluble de T. cruzi, révélé par un immunsérum homologue de lapin, met en évidence l'existence de 23 "fractions" antigéniques (diagramme n°1 page 25 (B), photographie n°5 page 26).

L'adsorption de l'immunsérum anti-T. cruzi, par le sérum de veau lyophilisé ou par le milieu de culture, révèle l'existence de 19 "fractions" parasitaires, numérotées 1 à 19 de la cathode à l'anode (diagramme n° 1 (C)).

L'absence d'arc de précipitation (diagramme n°1 (D)) nous montre la disparition totale des systèmes précipitants sérum de veau dans l'immunsérum anti T. cruzi.

(x) - Nous ne pouvons exclure l'existence éventuelle d'antigènes communs entre T. cruzi et le milieu de culture par suite d'une très longue adaptation^{ique} de la souche au milieu mais, s'ils existent, leur nombre ne peut être limité.

Conclusions :

Le nombre important de "fractions" antigéniques observées dans l'antigène T. cruzi témoigne d'une complexité antigénique au moins égale à celle observée chez les Helminthes par CAPRON et Coll. (1968) ou les champignons parasites par BIGUET et Coll. (1965b). On notera particulièrement l'existence d'un arc remarquable par son intensité (arc n°5), dans le diagramme immunoélectrophorétique, et dont les anticorps précipitants correspondants apparaissent les premiers au cours de l'immunisation expérimentale du lapin (tableau n°1 page 24).

2) Incubation des corps cellulaires de T. cruzi dans la solution saline glucosée de Hanks.

Nous pensions qu'une incubation des corps cellulaires, dans une solution saline glucosée de Hanks pendant 48 heures à 28°C, était suffisante pour éliminer sinon la totalité, du moins une grande partie des protéines sériques de veau incorporées par les flagellés par suite de pinocytose.

Cette incubation aurait pu favoriser le détachement des protéines sériques de veau absorbées sur la membrane cellulaire des flagellés.

Nous nous sommes donc proposé de réaliser un extrait soluble avec des corps cellulaires, après incubation 48h dans une solution saline glucosée dépourvue de toute antigénicité.

a) Récolte et préparation de l'extrait antigénique soluble.

Le milieu de culture G. L. S. H. ensemencé depuis 10 jours est centrifugé, à 2500 t.p. mn. pendant 15 mn., dans des pots stériles de 45 ml fermés avec des bouchons aluminium à vis possédant un joint de caoutchouc. Nous procédons alors à 4 lavages stériles avec la solution saline glucosée de Hanks à 4°C.

Toutes ces manipulations sont réalisées en chambre stérile; les culots de centrifugation après resuspension sont collectés avec une seringue stérile de 20 ml.

Les formes Epimastigote et Amastigote (l'équivalent de 500 mg en poids humide) sont mises à incuber 48 h à 28° dans des flacons à sirop de 250 ml contenant 40 ml de la solution saline glucosée de Hanks.

Après 48 heures, nous contrôlons la stérilité du milieu et la vitalité des flagellés en microscopie optique. La mobilité et la vitalité des formes en culture sont très diminuées; on observe au microscope de nombreux flagellés lysés ou en voie de lyse (cette incubation entraîne une baisse de rendement en poids humide de l'ordre de 50%/o).

Après 7 lavages successifs, en solution saline glucosée de Hanks, les corps cellulaires sont lysés dans de l'eau distillée (5 ml); puis 3 cycles de congélation (-70°C) décongélation (+4°C) assurent une parfaite désintégration cellulaire et la libération des protéines solubles somatiques. Cette solution est ensuite congelée en surface à -70°C puis lyophilisée. Nous obtenons ainsi l'antigène corps cellulaire "brut" de T. cruzi. L'antigène "brut" (environ 500 mg) est additionné d'une solution de chlorure de sodium à 0,017 M et nous procédons à l'extraction classique des protéines solubles. On obtient par cette méthode l'extrait soluble des corps cellulaires mis en incubation (antigène T. cruzi W.).

b) résultats

Nous avons immunisé un lapin par voie "sous claviculaire" et l'analyse immunoélectrophorétique de cet extrait antigénique, révélé par un hyperimmunsérum homologue, met en évidence l'existence de 20 "fractions" antigéniques (photographie n°7 page 31 (A) dont 3 sont communes au sérum de veau.

L'immunoélectrophorégramme de l'antigène sérum de veau et Hanks vis à vis d'un immunsérum anti-T. cruzi W. permet de révéler 6 "fractions" (photographie n°7 page 31 (B)).

A des différences près, (trop minimes pour être interprétables), ces résultats sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec l'extrait antigénique soluble normal.

c) conclusion

Avec les résultats négatifs, observés précédemment, nous ne pouvons pas affirmer que la pinocytose ne joue pas un rôle important dans la souillure de l'antigène T. cruzi. Le temps d'incubation (48h) est probablement insuffisant mais, vu la lyse trop importante dans la solution saline glucosée de Hanks, il serait souhaitable d'entreprendre la même expérience dans une solution contenant des acides aminés (Par-Ker 199) ce qui permettrait une survie prolongée des flagellés. Mais seule la microscopie électronique, par le biais des anticorps marqués, pourra exactement nous permettre de localiser les protéines sériques de Veau éventuellement présentes dans la cellule et nous indiquer la part de la pinocytose, celle de l'absorption et celle de l'acquisition

éventuelle du parasite à la suite d'une longue adaptation.

3) Mise en évidence de "l'arc remarquable" n°5

L'étude de la structure antigénique des Helminthes (CAPRON et Coll. 1968) a révélé l'existence pour chaque parasite d'au moins un arc remarquable par son intensité, qui détermine des anticorps précipitants correspondants, lesquels apparaissent les premiers au cours de l'immunisation expérimentale du lapin et de l'infestation expérimentale et humaine.

Nous basant sur ces résultats, nous nous sommes proposé d'étudier l'apparition précoce de la "fraction" n°5 au cours de l'immunisation expérimentale de lapins par voie sous cutanée ou sous claviculaire avec de l'antigène T. cruzi "frais".

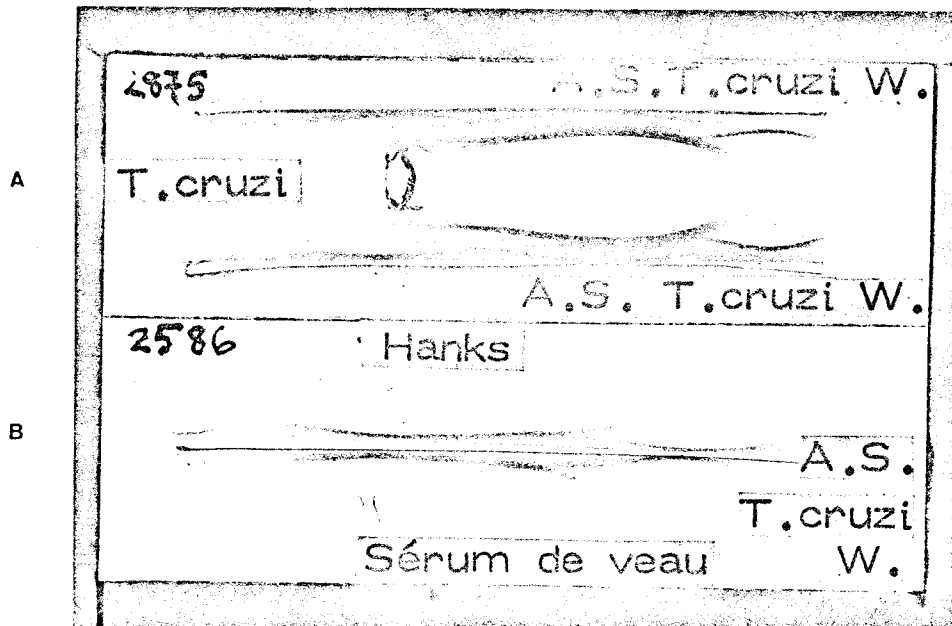
Avec l'antigène 1°/oo, les résultats mentionnés sur le tableau n°1 (page 24), nous montrent dès la première prise de sang un minimum de 5 "fractions" antigéniques. Aussi est-il nécessaire d'immuniser avec de l'antigène total "frais", moins facilement diffusible dans l'organisme, pour observer dès les premières prises de sang un nombre très limité d'arcs de précipitation.

L'antigène T. cruzi "frais" est obtenu par incubation durant 48 h des corps cellulaires dans la solution saline glucosée de Hanks.

Après les 7 lavages classiques, le culot de formes Epimastigote et Amastigote intactes est additionné d'un volume égal d'adjuvant de Freund. Emulsionné, le mélange est injecté soit par voie sous claviculaire soit par voie sous cutanée.

Les résultats mentionnés sur le tableau n°2 (page 32), nous montrent, pour différents lapins et avec deux modes d'immunisation possibles, l'apparition précoce de la "fraction" n°5 de l'antigène total, dans les immunsérums anti-T. cruzi "frais", anti-T. cruzi W. et anti-T. cruzi 1°/oo.

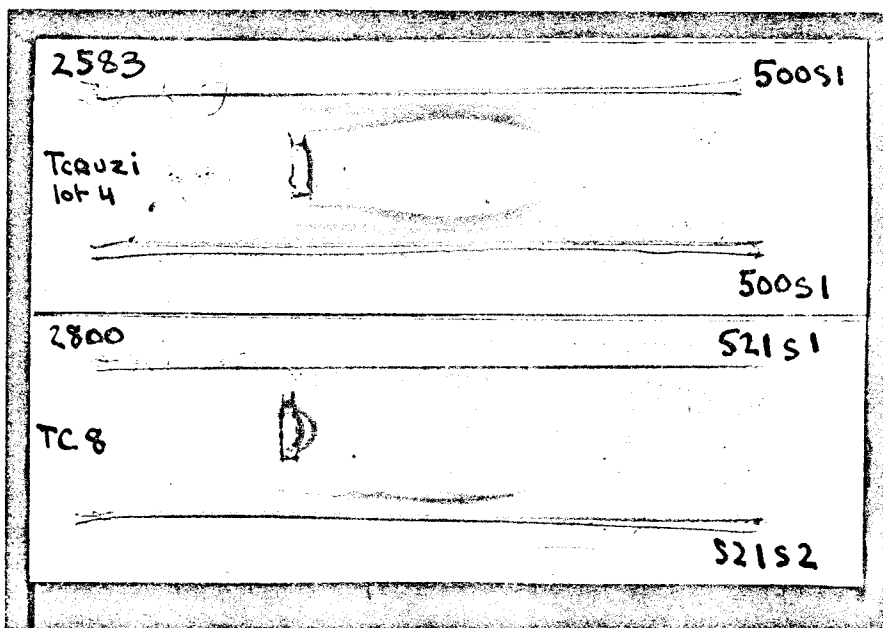
Il est important aussi de noter l'apparition précoce des "fractions" antigéniques n°6 (parasitaire) et C (albumine bovine).



Photographie n°7

A - Analyse immunoélectrophorétique en microméthode de l'extrait soluble de T. cruzi W. (corps cellulaires mis en incubation 48 heures à 28°C dans la solution saline glucosée de Hanks) révélé par un immunsérum homologue de lapin.

B - Immunoélectrophorégramme en microméthode, de l'antigène Hanks et sérum de veau vis à vis d'un immunsérum anti-T. cruzi W.



Photographie n°8

Apparition précoce de la fraction parasitaire "remarquable" n°5 de l'antigène total, révélée par des immunsérums anti-T. cruzi de lapin, dès la première prise de sang.

Lapins Mode d'immunisation	Nbre de semaines après la 1ère injection.	n° des "fractions" antigéniques.												
		5	c	6	a	8	7	1	14	b	19	13	11	4
Lapin n° 500	2e semaine	+	+	+		+								
Antigène T.cruzi "frais"	4e semaine	+	+	+	+	++	+			+				
Immunisation par voie "sous-claviculaire".	5e semaine	+	+	+	+	++	+	+		+				
Lapin n° 508	1e semaine	+	+											
Antigène T.cruzi "frais"	2e semaine	+	+	+	+	+								
Immunisation par voie "sous-cutanée".	3e semaine	+	+	+	+	++					+			
Lapin n° 521	1e semaine	+	+	+										
Antigène T.cruzi "frais"	2e semaine	+	+	+		+								+
Immunisation par voie "sous-cutanée".	3e semaine	+	+	+	+	+								+
	4e semaine	+	+	+	+	+	+		+		+			+
	5e semaine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
Lapin n° 489	5e semaine	+	+		+	+								
Ant. T.cruzi Wallace 1%	7e semaine	+	+	+	+	+	+							+
Immunisation par voie "sous-claviculaire".	5e semaine	+	+	+	+					+				
Lapin n° 447	7e semaine	+	+	+	+		+	+	+					
Antigène T.cruzi 1 %	9e semaine	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Immunisation par voie "sous-claviculaire".	11e semaine	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
cf tableau 1 page														

Conclusion : "Fraction parasitaire remarquable" = n° 5

Tableau 2

Apparition des anticorps précipitants dans la trypanosomiase américaine en fonction du mode d'immunisation expérimentale.

Mise en évidence de la "fraction remarquable".

La photographie n°8 (page 31) illustre bien la précocité du système précipitant n°5 au cours de l'immunisation expérimentale du lapin (x).

Conclusion : Comme pour la plupart des antigènes d'Helminthes, l'étude de la cinétique de l'apparition des anticorps précipitants, au cours de l'immunisation expérimentale du lapin, a permis de mettre en évidence dans l'antigène T. cruzi une "fraction" antigénique "remarquable" (arc n°5).

C - COMMUNAUTES ANTIGENIQUES DE T. CRUZI AVEC LES HELMINTHES et les CHAMPIGNONS -

Ces réactions croisées ont pu être réalisées facilement grâce à l'utilisation de nombreux antigènes d'Helminthes et de champignons parasites préparés au Laboratoire de Parasitologie de LILLE.

10 antigènes différents d'Helminthes et 20 antigènes fongiques ont été confrontés à des immunsérums divers anti-T. cruzi par les méthodes d'Ouchterlony et d'immunoélectrophorèse.

Nous n'avons pas constaté de communauté antigénique entre T. cruzi et divers Helminthes (Nématodes, Cestodes et Trématodes). Un arc de précipitation seulement a été obtenu avec l'antigène soluble Angiostrongylus cantonensis (Nématode, Metastrongyloïdés, vivant à l'état adulte dans les vaisseaux sanguins pulmonaires du Rat); cette "fraction" antigénique est due aux communautés sériques existant entre le Veau et le Rat (la réaction croisée, effectuée avec un immunsérum anti-T. cruzi adsorbé par l'antigène sérum de Veau, ne donne plus d'arc de précipitation.)

7 antigènes fongiques sur 20 (Levure : Candida albicans; Moisissures : Alternaria tenuis, Mucor mucedo; Dermatophyte : Trichophyton violaceum; Actinomycètes : Nocardia asteroides, Actinomyces israeli, Thermoactinomyces vulgaris) ont présenté vis à vis d'immunsérums anti-T. cruzi 1 arc de précipitation en immunoélectrophorèse et très rarement 2 en Ouchterlony. La localisation de cet arc de précipitation en immunoélectrophorèse (sous la fente servant au dépôt de l'antigène donne lieu de penser qu'il s'agit d'un précipité de nature non immunologique de type substance C - protéine anti-C (précipité norma-

(x) - Les travaux, poursuivis actuellement avec LE RAY sur les réactions croisées entre T. cruzi et T. brucei, nous indiquent qu'il existe des communautés antigéniques, portant sur 4 à 5 fractions, entre ces deux Trypanosomes. Celles-ci n'intéressent pas la "fraction" n°5 de T. cruzi, par contre la n°6 semble être une "fraction" commune entre ces deux antigènes.

lement soluble dans le citrate trisodique). Cet arc intense à frais n'est pas entièrement dissous par le citrate trisodique (peut être en raison du blocage de la protéine, support de la substance C, par les anticorps produits en quantité très importante lors des immunisations expérimentales du lapin).

Une étude plus approfondie nous permettra de préciser ultérieurement qu'il s'agit d'une réaction immunologique ou d'un précipité aspécifique de type substance C - protéine anti C.

D - CARACTERISATION DES TYPES D'ACTIVITE ENZYMATIQUE DANS LES BROYATS DE T. CRUZI APRES IMMUNOELECTROPHORESE (ETUDE PRELIMINAIRE) -

Afin d'éviter la dénaturation éventuelle de l'activité enzymatique, voire la destruction totale des enzymes, il convient d'utiliser une méthode de préparation évitant une élévation de température, la lyophilisation, et la conservation prolongée de l'antigène. C'est pourquoi nous préparons un antigène extemporanément comme suit :

Les formes de culture d'un flacon de 250 cc sont centrifugées, lavées 7 fois dans une solution saline glucosée à 4°C. Le culot de centrifugation, additionné de 2 à 3 ml de tampon véronal pH 8,2, est broyé une fois, après congélation à -20°C jusqu'à liquéfaction à 4°C.

Cette solution est centrifugée à 6000 t.p. mn pendant 20 mn. à 4°C; le surnageant, contenant les protéines solubles, après avoir concentré 10 fois son volume avec du Substosan, sert à remplir le réservoir d'antigène des lames d'immunoélectrophorèse.

La migration électrophorétique de l'antigène frais doit se faire à la température de 4°C puis la révélation s'obtient avec un hyperimmunsérum homologue de lapin.

Après déminéralisation, les lames sont révélées par différents substrats solubles qui, après fixation sur l'excès d'antigène correspondant, précipitent et entraînent une coloration spécifique à la ou aux "fractions" contenant cet enzyme.

Une étude préliminaire nous a déjà permis de mettre en évidence 2 activités estérasiques et une déshydrogénasique (ces 3 activités ne sont pas localisées sur l'arc n°5). Beaucoup de réactions se sont révélées

négatives en raison de la trop faible concentration d'antigène employé. En effet, l'hyperimmunsérum homologue bloque tous les sites libres de l'antigène et empêche ainsi la fixation du substrat soluble. Aussi, nous envisageons de réaliser les caractérisations enzymatiques, soit après électrophorèse simple de l'antigène, soit par surcharge en antigène après immunoelectrophorèse.

E - CINETIQUE DE L'APPARITION DES PRECIPITINES SERIQUES
DANS LA TRYPANOSOMIASE EXPERIMENTALE DE LA SOU-
RIS - REPERCUSSIONS SUR LA TRYPANOSOMIASE AMERICAI-
NE HUMAINE -

1) entretien in vivo de T. cruzi -

Passage mécanique : Le passage mécanique consiste à prélever quelques gouttes de sang à la queue d'une souris parasitée et à l'injecter, à l'aide d'une pipette Pasteur double effilure, par voie intrapéritonéale à une souris saine de 20 g environ.

Deux souches de T. cruzi (Tulahuen et Téhuentepec) sont ainsi régulièrement entretenues sur souris.

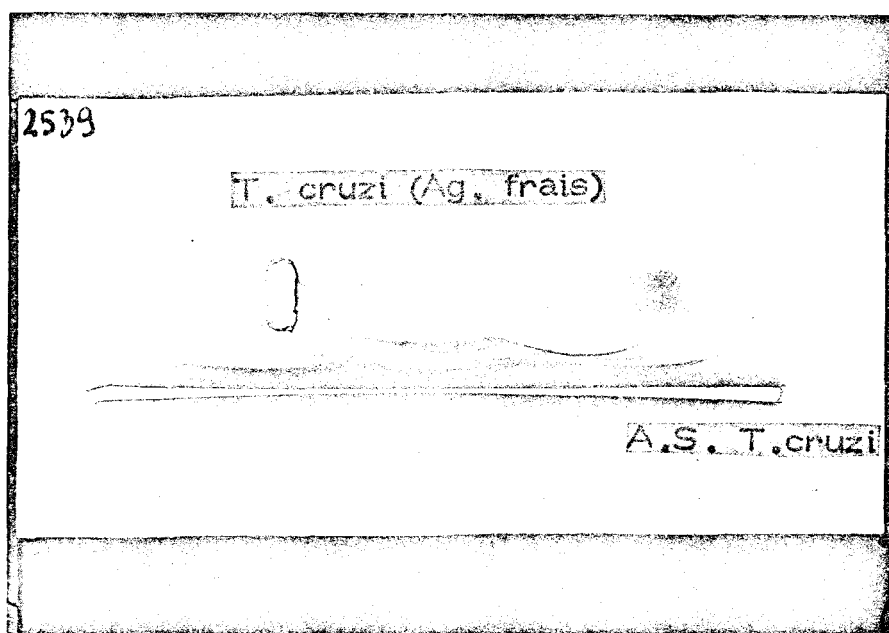
Le sang des souris infectées avec les deux souches de T. cruzi présente, 15 jours après l'inoculation, une parasitémie, à l'examen microscopique, de l'ordre de 2 à 3 formes Trypomastigote par champ (oc. x6, obj. x10). Après une mortalité de l'ordre de 60% vers le 20ème au 30ème jour, la parasitémie s'atténue jusqu'à devenir presque nulle.

2) courbe d'apparition des précipitines sériques chez la souris infectée par T. cruzi.

a) au cours de l'entretien in vivo des 2 souches de T. cruzi sur souris, nous avons procédé à de nombreuses prises de sang échelonnées dans le temps. La ponction se fait à l'aide d'une pipette Pasteur dans le sinus veineux de l'oeil. Cette technique demande de grandes précautions, mais avec l'habitude il est possible d'obtenir 1 ml de sang tous les 15 jours sans entraîner la mort de l'animal.

70 sérums de souris infectées avec la souche Tulahuen et 40 sérums de souris infectées avec la souche Tehuentepec ont été testés soit par la méthode d'Ouchterlony, soit en immunoelectrophorèse (microméthode).

Grâce à cette expérience de base, nous avons pu constater que :



Photographie n°9 - Immunoélectrophorégramme de l'antigène T. cruzi "frais" révélé par un immunsérum homologue de lapin. (coloration à l'amidoschwartz).

- . l'extrait antigénique de T. cruzi permet de révéler l'existence d'anticorps précipitants au cours de la trypanosomiase expérimentale de la souris (photographie n°10 page 38)
- . 3 à 11 systèmes précipitants ont pu être décelés du 90 ème jour au 280ème jour d'infection; il est particulièrement intéressant de noter que le premier est décelable entre la 3ème et la 4ème semaine (photographie n°11 page 38) et correspond aux anticorps produits par la "fraction 5" de l'antigène total, également responsable des premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation expérimentale du lapin.

b) Avec la réponse immunologique de ces 110 souris, il n'était pas possible de réaliser une courbe valable d'apparition des précipitines sériques en fonction du temps d'infestation, car aucune n'avait reçu la même dose parasitaire infectieuse lors de l'inoculation mécanique.

Nous avons alors infecté 50 souris souche "Swiss" avec une dose infectieuse de 2000 Trypomastigote par souris (souche Tulahuen).

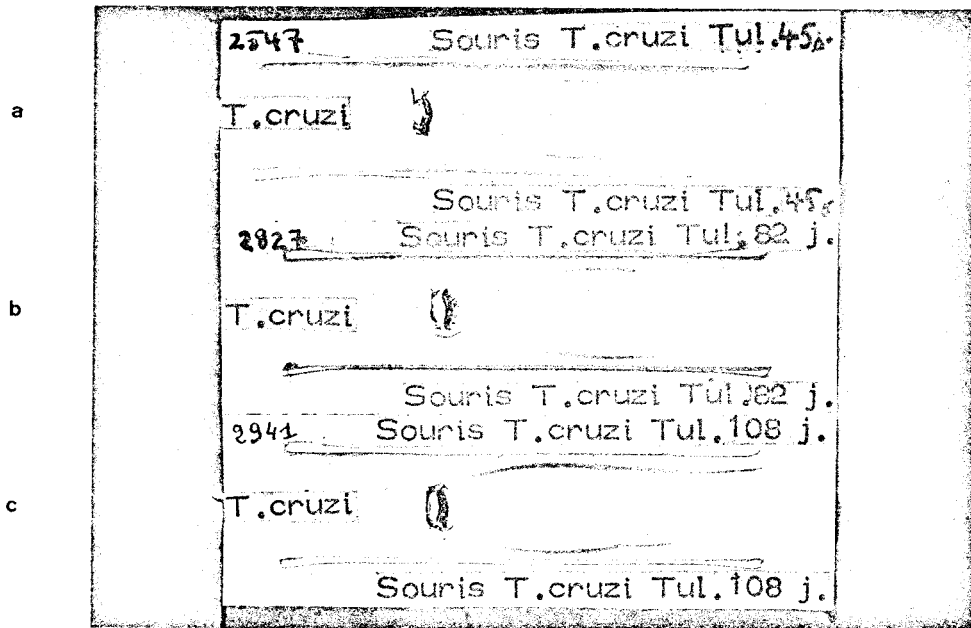
. le tableau n°3 (page 39) nous montre le nombre de systèmes précipitants mis en évidence en immunoélectrophorèse par l'antigène T. cruzi. La première "fraction" antigénique observée est la fraction n°5. Sa présence restera constante pour tous les sérums de souris.

Le nombre moyen de systèmes précipitants se situe entre 7 et 8 du 80 ème jour au 280 ème jour mais pour 2 souris, entre le 220 ème et le 280 ème jour nous avons observé 11 précipitines sériques (photographie n°12 page 41).

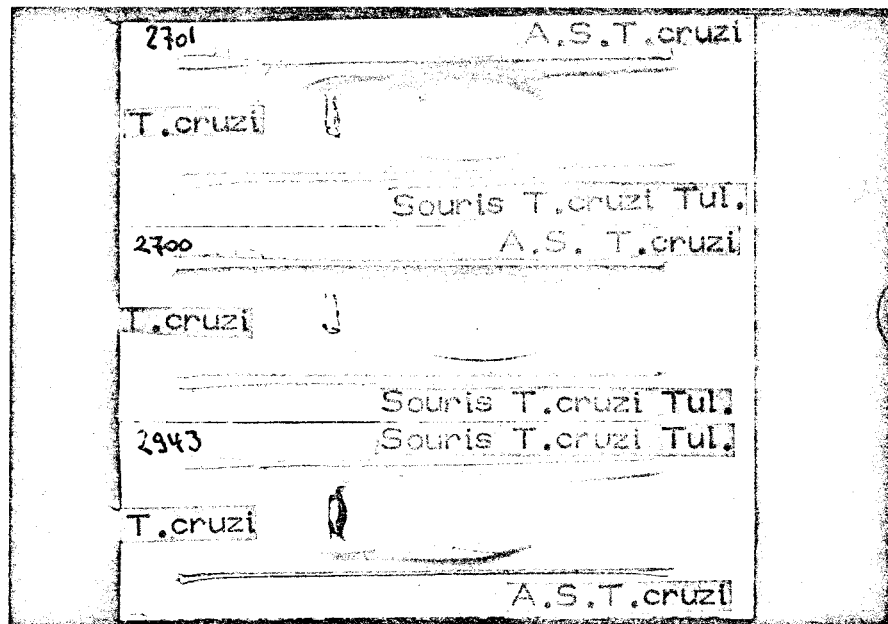
. la courbe n°1 (page 40) nous montre le nombre moyen d'arcs de précipitation et la parasitémie en fonction du temps d'infection.

Quand la parasitémie est importante entre le 15ème et le 20ème jour, le nombre de précipitines sériques est presque nul (il y a quelquefois présence de l'arc "remarquable" n°5)

Puis, brutalement, la parasitémie diminue pour s'éteindre presque totalement vers le 45ème jour, alors que le nombre moyen de systèmes précipitants augmente considérablement. En fonction du temps on observe après la période de parasitémie de la maladie une progression presque régulière du nombre moyen de précipitines sériques.



Photographie n°10 - Anticorps précipitants décelés chez la souris expérimentalement infectée depuis 45 jours (a), 82 jours (b), et 108 jours (c).



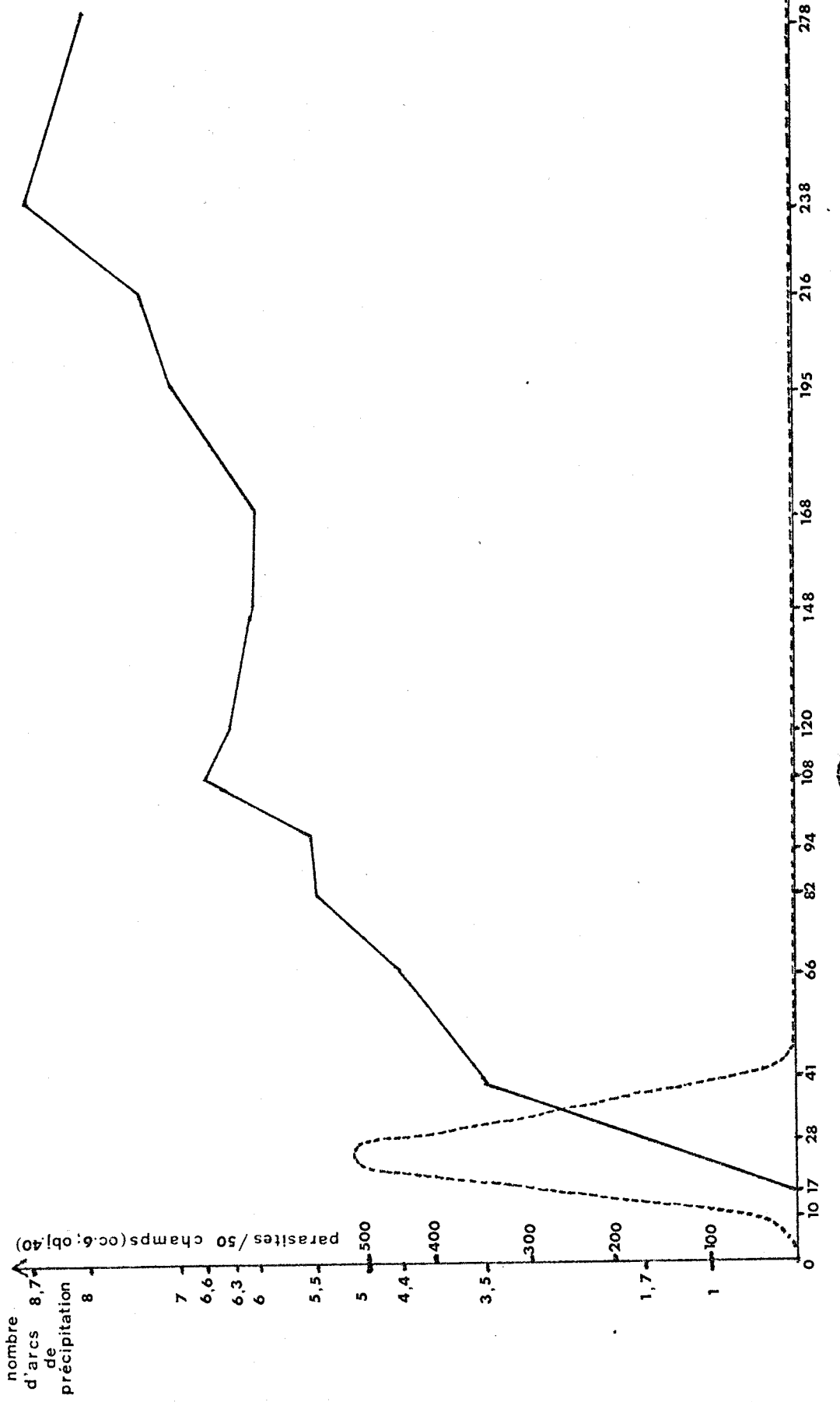
Photographie n°11 - Mise en évidence du système précipitant n°5 par l'antigène total *T. cruzi* chez des souris entre la 3ème et la 4ème semaine d'infection; comparaison avec les premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation expérimentale du lapin.

Age des sérums (jours)	Nombre de sérums	Immunoélectrophorèse Nombre d arcs											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0 - 20	5	5											
21 - 40	3		1	2									
41 - 60	4				2	2							
61 - 80	3					2	1						
81 - 100	10					2	2	2	2	2			
101 - 119	5							3	1	1			
120 - 140	5					1			4				
141 - 160	5				1				4				
161 - 180	5						1	2	2				
181 - 200	2								2				
201 - 220	3							1		2			
221 - 240	4								1	1	1		1
241 - 280	4								1	1	1		1

Présence constante de l'arc "remarquable" n° 5.



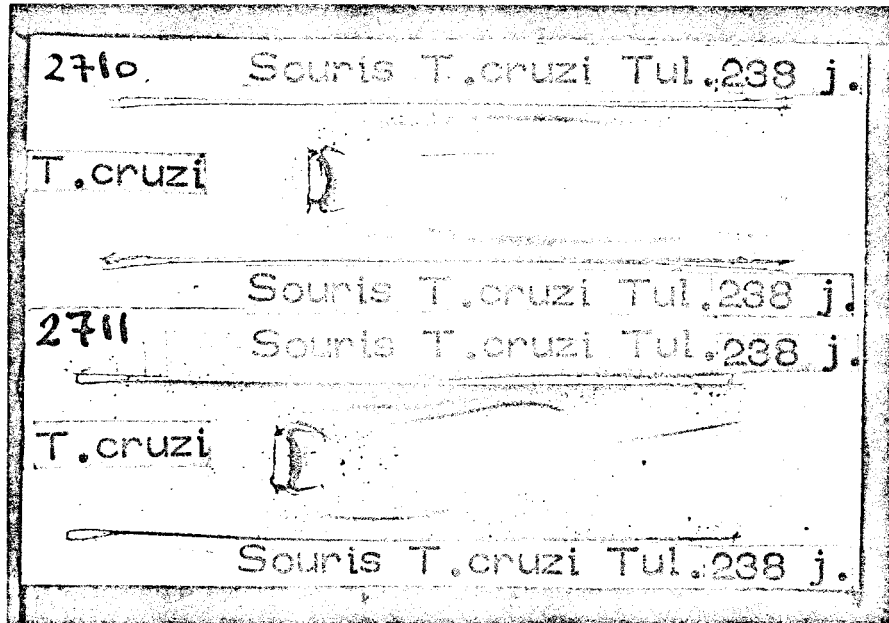
Tableau 3. Nombre de systèmes précipitants mis en évidence en immuno-électrophorèse par l'antigène T. cruzi dans les sérums de souris infectées par T. cruzi et répartis selon la durée de l'infection.



Courbe 1 .

Apparition des Précipitines sériques en immunoelectrophorèse chez la souris infectée expérimentalement par T. cruzi.

- (_____ courbe des précipitines sériques)
- (_____)
- (- - - - parasitémie.)



Photographie n°12 - Anticorps précipitants décelés chez la souris expérimentalement infectée depuis 238 jours.

Conclusion : La courbe d'apparition des précipitines sériques, par la méthode d'immunoélectrophorèse, nous montre:

- . qu'en période de parasitémie, le nombre de systèmes précipitants est très faible (le premier système précipitant décelable dans la trypanosomiase expérimentale de la souris est toujours celui qui correspond aux anticorps produits par la "fraction" n°5 de l'antigène total)
- . qu'en absence de parasitémie, le nombre des systèmes précipitants est très élevé (en moyenne 7 à 8). (x)(1)
Il peut être intéressant de confronter cette observation, originale chez les protozoaires, avec celle de l'évolution comparée de la microfilarémie et des anticorps dans l'étude expérimentale de la filaire : Dipétalonema viteae.

3) Les précipitines sériques dans la Trypanosomiase américaine humaine.

Nous avons disposé de 3 groupes de sérum de sujets atteints de maladie de Ghagas (x) (2) :

a) 27 sérums de malades confirmés sérologiquement (fixation du complément : F C' +) et cliniquement :

- . 10 malades en phase aiguë
- . 17 malades en phase chronique

b) 16 sérums de malades à sérologie positive (F C') mais sans signes cliniques.

c) 11 sérums de malades suspects à sérologie négative (F C')

L'étude des précipitines sériques, effectuée en immunoélectrophorèse, fut réalisée en confrontant les divers sérums humains concentrés au 1/3 avec l'extrait soluble de T. cruzi. Les tableaux 1, 2, 3 et 4 résument les résultats qu'il fut possible d'obtenir et autorisent les quelques commentaires suivants :

- 1- (x) - La comparaison structurale des antigènes T. cruzi et T. brucei, entreprise avec LE RAY (Institut de Médecine Tropicale d'Anvers, Service Protozoologie du Professeur JADIN), nous a permis de montrer que l'antigène T. brucei révèle la "fraction" antigénique n°6 dans les sérums de souris infectées par T. cruzi. L'arc "remarquable" n°5 reste spécifique de l'extrait soluble de T. cruzi.
- 2- (x) - Nous remercions très vivement Mr le professeur PRATA, de l'Université de Salvador-Bahia, Brésil, pour l'extrême obligeance avec laquelle il a bien voulu nous procurer ces sérums et les renseignements concernant les malades.

a) sérums de malades confirmés sérologiquement (F C') et cliniquement (Tableau n°1 page 44b : en phase aiguë, tableau n°2 page 44 c : en phase chronique).

En phase aiguë et chronique, on décèle l'existence d'une réaction de précipitation positive pour la totalité des cas. (Photographie n°13A page 44 a). Il est important de noter la présence presque constante (94% en phase chronique, 60% en phase aiguë) des anticorps produits par la fraction n°5 de l'antigène total, également responsable des premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation artificielle du lapin et la trypanosomiase expérimentale de la souris (photographie n° 13 B page 44 a). La majorité des réactions s'exprime par une moyenne de 1,9 arcs de précipitation en phase aiguë et de 4,4 en phase chronique; le maximum observé pour un cas est de 9 systèmes précipitants.

b) Sérums de malades à sérologie positive (F C') mais sans signes cliniques (Tableau n°3, page 44d).

Sur les 16 sérums étudiés, nous avons pu révéler des précipitines sériques dans 56,25% des cas, l'arc n°5 étant pratiquement toujours présent. La majorité des réactions positives s'exprime par un ou deux arcs de précipitation.

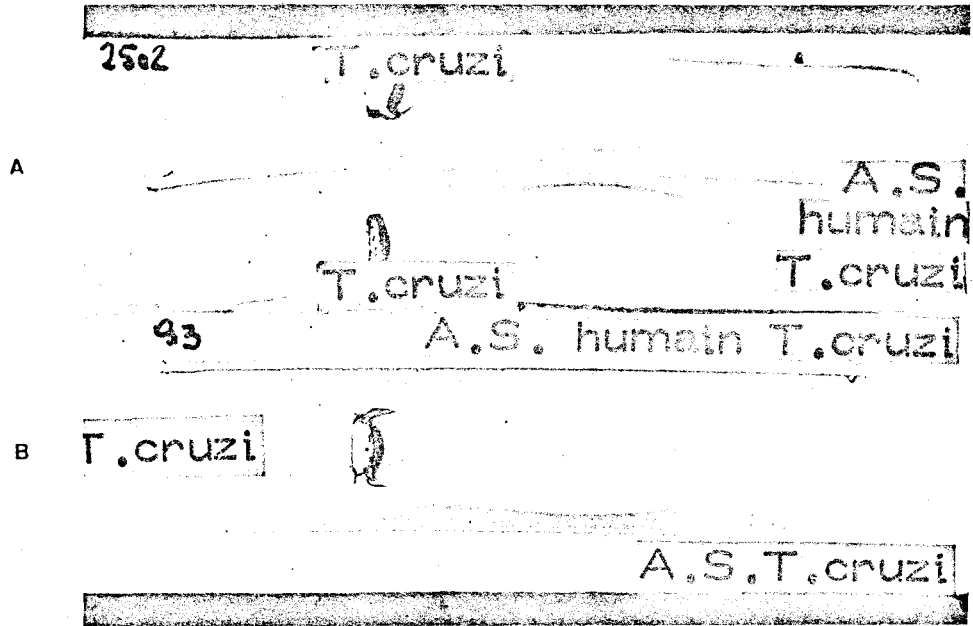
c) Sérums de malades suspects à sérologie négative (F C'). (Tableau n°4 page 44e).

Dans les 11 sérums étudiés, nous avons pu déceler des précipitines en nombre élevé pour 4 cas avec une présence constante de l'arc remarquable n°5.

CONCLUSION -

Ce travail préliminaire, réalisé en immunoélectrophorèse, révèle pour la première fois, de manière précise, l'existence d'anticorps précipitants en faible nombre dans le sérum de sujets en phase aiguë de la maladie. Par contre, une augmentation significative du taux d'anticorps s'observe dans les sérums de malades en phase chronique.

La présence pratiquement constante dans les sérums des anticorps correspondants à la "fraction" n°5 de l'antigène total, la haute spécificité des réactions, mettent en lumière les possibilités nouvelles de l'immunoélectrophorèse pour le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas.



Photographie n°13 - Systèmes précipitants mis en évidence en immunoélectrophorèse (microméthode) par l'antigène soluble T. cruzi dans les sérums de sujets atteints de la maladie de Chagas (A - B).

(B) - Mise en évidence du système précipitant n°5 par l'antigène total T. cruzi; comparaison avec les premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation expérimentale du lapin.



Sérums humains <u>T. cruzi.</u>	Age	Sexe	Race	Début de maladie (jours).	F C'	Immuno- électrophorèse.	
						Nombre d'arcs	Arc n° 5
B. P. 61	8	M	M	10 j	+	1	-
J.A.S.J. 201	12	M	M	44 j	+	2	+
M.N.S. 205	12	F	M	39 j	+	1	?
A.B.S. 234	2	M	M	17 j	+	2	+
M.J.D. 248	4	F	M	18 j	+	1	-
J.N.S. 255	5	M	M	36 j	+	3	+
N.P. 259	9	M	N	84 j	+	2	+
J.C. 382	3	M	M	7 j	+	3	+
A.C. 389	7	M	M	20 j	+	2	+
A.S.R. 391	4	M	N	9 j	+	2	?

Tableau n° 1

Nombre de systèmes précipitants mis en évidence par l'antigène T. cruzi dans les sérums de malades confirmés, en phase aiguë.

Abréviations employées dans les tableaux 1 à 4.

Race : M = mulâtre
N = noir
B = blanc

Age : Ad = Adulte

F C' : fixation du complément.

C.H.F. : congestive heart failure.

M. O. : megaoesophage.

Sérums humains <u>T. cruzi</u>	Age	Sexe	Race	Déb. mal. (années).	Remarques.	F C'	Immuno- électrophorèse	
							Nbre d'arcs	Arc n° 5
A.S.	4	M	N	2		+2,50	4	+
J.S.	5	M	M	4		+3,72	4	+
H.M.	40	F	M	1		+2,41	6	+
J.A.	7	M	M	3		+3,42	7	+
G.B.	19	M	M	?	C.H.F.	+3,74	7	+
M.J.D.	6	F	M	1		+5,28	5	+
D.P.S.	33	M	N	?	M.O.	+3,63	3	+
M.L.C.S.	40	F	N	?	C.H.F.	+2,52	6	+
D.M.F.	34	M	M	?	C.H.F.	+3,27	3	+
A.J.	48	F	M	?	M.O.	+3,50	9	+
G.G.F.	23	F	M	?	M.O.	+3,16	1	?
R.B.S. 3671	Ad	M		?		+	2	+
J.L.S. 3673	Ad	M		?		+	5	+
E.B.J. 3701	Ad	M		?		+	4	+
J.P. 3726	Ad	M		?		+	2	+
A.J.A. 3736	Ad	M		?		+	5	+
I.J.G. 3743	Ad	M		?		+	1	+

Tableau n° 2

Nombre de systèmes précipitants mis en évidence par l'antigène T. cruzi dans les sérums de malades confirmés, en phase chronique.



Sérums humains <u>T. cruzi</u>	F C'	Immuno- électrophorèse.	
		Nombre d'arcs	Arc n° 5
n° 1	+	1	+
n° 2	+	0	
n° 3	+	2	+
n° 4	+	0	
n° 5	+	1	+
n° 6	+	1	+
n° 7	+	1	-
n° 8	+	0	
n° 9	+	0	
n° 10	+	1	+
n° 11	+	2	+
n° 12	+	0	
n° 13	+	1	+
n° 14	+	2	+
n° 15	+	0	
n° 16	+	0	



Tableau n° 3

Nombre de précipitines sériques décelés par l'antigène T. cruzi dans les sérums de malades à sérologie positive (F C') mais sans signes cliniques.

Sérums humains <u>T. cruzi.</u>	Age	Sexe	Race	Déb. mal. (année).	F	C'	Immuno- électrophorèse.	
							Nombre d'arcs	Arc n° 5
J.C.	5	M	N	2	-	-	0	
B.P.	10	M	M	3	-	-	8	+
A.J.A. 3637	Ad	M	?	? ch?	-	-	5	+
N.S.R.	21	F	M	?	-	-	0	
E. A. N.	27	M	M	?	-	-	0	
L.A.C.	12	F	B	?	-	-	0	
J.L.L.	67	M	B	?	-	-	0	
B.S.E.	45	M	B	?	-	-	0	
L.M.J.	33	F	M	?	-	-	4	+
A.C.O.	78	M	B	?	-	-	3	+
M.E.M.B.	12	F	M	?	-	-	0	

Tableau n° 4

Nombre de systèmes précipitants mis en évidence par l'antigène T. cruzi dans les sérums de malades suspects à sérologie négative (F. C').

CONCLUSION

1) L'ensemble des travaux, réalisés depuis ces dix dernières années grâce aux méthodes de précipitation en milieu gélifié (double diffusion en gélose et immunoélectrophorèse), avait pu laisser croire à la simplicité de la mosaïque antigénique des Trypanosomatidae. Or des travaux récents sur les plasmodium, les amibes et quelques trypanosomes nous montrent que la structure antigénique de l'extrait soluble des Protozoaires est au moins aussi complexe à celle observée chez les Helminthes et les champignons parasites.

- 2) a) - L'analyse immunoélectrophorétique, en permettant :
- d'observer la progression du taux des anticorps précipitants au cours de l'immunisation artificielle du lapin ou de l'infection expérimentale de la souris,
 - de contrôler, grâce à un antisérum de titre connu, la qualité antigénique des différents lots étudiés,

apparaît comme une méthode de choix pour la standardisation des antigènes parasitaires pour toute étude immunologique fondamentale ou appliquée.

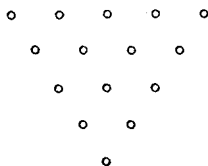
b) - L'emploi en Protozoologie, de très nombreux milieux de culture semi-synthétiques très riches en protéines sériques humaines ou bovines, est un handicap certain pour la standardisation des antigènes et leur étude immunochimique. Aussi l'immunoélectrophorèse, en permettant de réaliser la cinétique de la disparition des protéines du milieu de culture dans les eaux de lavage successives lors de la récolte, semble être une méthode originale applicable à la purification et la standardisation des antigènes de Protozoaires.

En combinant l'immunoélectrophorèse et la technique de l'adsorption il est ainsi possible de réaliser l'analyse d'antigènes exclusivement parasitaires.

3) La connaissance précise de la structure antigénique de l'extrait soluble de T. cruzi, nous a permis d'envisager l'étude qualitative des anticorps précipitants au cours de la Trypanosomiase américaine humaine et expérimentale de la souris. Comme pour la plupart des antigènes d'Helminthes l'étude de la cinétique de l'apparition des anticorps précipitants, au cours de l'immunisation artificielle du lapin, de l'infection humaine et expérimentale de la souris, a permis de mettre en évidence dans l'antigène T. cruzi une "fraction" antigénique "remarquable" (arc n°5).

4) Dans ce travail, il n'a/été possible de mettre en évidence, les communautés antigéniques entre les protéines du milieu de culture et T. cruzi Or l'importance de ces communautés antigéniques pour les systèmes Helminthiques (CAPRON et Coll. 1968, SMITHERS et Coll. 1969) nous incite, dans des travaux ultérieurs, à envisager de les mettre en évidence grâce

à l'étude de la structure fine des Protozoaires mis au contact
de systèmes immuns.



-RESUME-

a) L'analyse immunoélectrophorétique de l'extrait antigénique de T. cruzi, révélé par un immunsérum homologue de lapin, met en évidence l'existence de 23 "fractions" antigéniques. L'analyse antigénique du sérum de veau, seul matériel antigénique contenu dans le milieu de culture, par l'immunsérum anti-T. cruzi, permet de révéler 8 "fractions." L'adsorption de l'immunsérum anti-T. cruzi, soit par le sérum de veau, soit par le milieu de culture lyophilisé, met en évidence 19 "fractions" parasitaires, numérotées 1 à 19 de la cathode à l'anode. Le nombre important d'arcs de précipitation témoigne d'une complexité antigénique au moins égale à celle observée chez les Helminthes ou les champignons parasites, etc. On notera particulièrement l'existence d'un arc, remarquable par son intensité (arc n°5), dans le diagramme immunoélectrophorétique, et dont les anticorps précipitants correspondants apparaissent les premiers au cours de l'immunisation expérimentale du lapin.

b) L'utilisation des méthodes de révélation enzymatiques en immunodiffusion a permis de révéler, sur nos diagrammes immunoélectrophorétiques, l'existence de 3 activités enzymatiques: 2 activités estérasiqes et une activité déshydrogénasique.

c) L'extrait antigénique de T. cruzi permet de révéler l'existence d'anticorps précipitants au cours de la trypanosomiase expérimentale de la souris (jusqu'à 11 arcs vers le 235ème jour d'infection.) Il est particulièrement intéressant de noter que le premier est décelable entre la 3ème et la 4ème semaine et correspond aux anticorps produits par "la fraction" 5 de l'antigène total, également responsable des premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation expérimentale du lapin.

d) Il a été possible, suivant les mêmes procédés techniques, de mettre en évidence des précipitines sériques dans les sérums de patients atteints de la maladie de Chagas. De 1 à 9 systèmes précipitants ont pu être décelés; ils apparaissent en nombre plus élevé dans la phase chronique de la maladie. On notera particulièrement la présence pratiquement constante de la "fraction" n°5 dans les sérums de malades confirmés sérologiquement et cliniquement.

Ce travail préliminaire met en lumière les possibilités techniques de l'analyse immunoélectrophorétique dans l'étude des phénomènes immunologiques observés au cours de la Trypanosomiase américaine.

B I B L I O G R A P H I E

ABELEV (G.I.) et ZVETKOF (U.S.). 1960 - Extraction d'un antigène spécifique d'hépatome transplantable de souris par la méthode d'immunofiltration.

Voprosyi Onkologiyi, 6, 57. (en russe).

ADLER (S.). 1934 - Culture of leishmanias and other Trypanosomidae in haemoglobinfree media.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 28, 201.

AFCHAIN (D) et CAPRON (A.). 1969 - Etude préliminaire des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris.

C.R Acad. Sc. Paris, 269, 272.

BAKER (J.R.) . 1966 - Studies on Trypanosoma avium - IV - The développement of infective metacyclic trypanosomes in cultures grown in vitro.

Parasitology, 56, 15.

BIGUET (J.), ANDRIEU (S.) et TRAN VAN KY (P.). 1961 - Application des méthodes électrophorétiques et immunochimiques à l'étude des fractions antigéniques des Dermato-phytes.

(Trichophyton mentagrophytes). C.R. Acad. Sc. Paris., 253, 167.

BIGUET (J.), CAPRON (A.) et TRANVAN KY (P.). 1962 - Les antigènes de Schistosoma mansoni. I. Etude électrophorétique. Caractérisation des antigènes spécifiques.

Ann. Inst. Pasteur., 103, 763.

BIGUET (J.), HAVEZ (R.) et TRAN VAN KY (P.). 1959 - Les possibilités d'applications aux champignons pathogènes de la méthode d'Ouchterlony et l'immunoélectrophorèse.

C.R. Acad. Sc. Paris., 249, 895.

BIGUET (J.), ROSE (F.), CAPRON (A.) et TRAN VAN KY (P.). 1965 (a) - Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification, et le diagnostic des Helminthiases par immunoélectrophorèse.

Rev. Immun., 29, 5.

- BIGUET (J.), TRAN VAN KY (P.), ANDRIEU (S.) et FRUIT (J.) . 1965 (b) - Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématiques des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses. Mycopathol. Mycol. Appl., 26, 241.
- BISHOP (Ann.). 1967 - Problems in the cultivation of some parasitic Protozoa. Advances in Parasitology, 5, 93.
- BONE (G. J.) et PARENT (G.). 1963 - Stearic acid, an essential growth factor for Trypanosoma cruzi. J. Gen. Microbiol., 31, 261.
- BROWN (K. N.) et WILLIAMSON (J.) . 1964 - The chemical composition of Trypanosomes IV. Localisation of Antigens in subcellular fraction of Trypanosoma rhodesienne. Exp. Parasitology, 15, 69.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), ROSE (F.) et VERNES (A.). 1965 (a) - Les antigènes de Schistosoma mansoni. II. Etude immunoélectrophorétique comparée de divers stades larvaires et des adultes des deux sexes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite de la cercaire et de l'adulte S. mansoni. Ann. Inst. Pasteur, 109, 798.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), TRAN VAN KY (P.) et ROSE (G.). 1964 - Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine à Fasciola hépatica. Mise en évidence d'anti-corps sériques par immunoélectrophorèse. Presse Méd., 72, 103.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), et VERNES (A.). 1965 (b) Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Commun. Soc. Franc. Parasit. Paris, Masson Edit.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), VERNES (A.) et AFCHAIN (D.). 1968 - Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol., 16, 121.
- CAPRON (A.), VERNES (A.) et BIGUET (J.). 1966 - Les précipitines sériques dans les Bilharzioses humaines et expérimentales à Schistosoma mansoni, S. haematobium et S. japonicum. Ann. de Parasit. hum. et comp., 41, 123.

- CHANG (S. L.). 1947 - Studies on haemoflagellates. I. Asemi-solid medium and a fluid medium with a solid base for growing various species of Leishmania and Trypanosoma cruzi.
J. Infect. Dis., 80, 164.
- CITRI (N.) et GROSSOWICZ (N.). 1955 - A partially defined culture medium for Trypanosoma cruzi and some other haemoflagellates.
J. Gen. Microbiol., 13, 273.
- CROOK (R. H.), SCOTT (L. V.) et PATNODE (R. A.). 1969 - Characterization of antigens from Leishmania mexicana grown in dialysate culture.
J. Parasit., 55, 977.
- DE SIQUEIRA (A. F.), FERRIOLLI (F.) et CARVALHEIRO (J.). 1966 - Um antígeno solúvel presente no sêro de ratos infetados com Trypanosoma cruzi. Nota previa "a soluble antigen present in the serum of rats infected by T. cruzi."
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo., 8; 148.
- DIAMOND (L. S.) et HERMAN (C. M.). 1954 - Incidence of Trypanosomes in the Canada goose as revealed by bone marrow culture.
J. Parasit., 40, 195.
- DIAZ-UNGRIA (C.). 1966 - "transmission du Trypanosoma cruzi chez les Mammifères."
Ann. de Parasit. hum. et comp., XLI, 549.
- DUPOUEY (P.) et MARECHAL (J.). 1966 - Structure antigénique des Trypanosomes I. Etude des antigènes de trois espèces de Trypanosomes (T. méga, T. cruzi, T. gambiense) par fixation du complément, la précipitation en gel et l'immunofluorescence.
Ann. Inst. Pasteur, 110, 889.
- FIFE (E. H.) et KENT (J. F.). 1960 - Protein and carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 9, 512.
- GARCIA (B. S.). 1965 - Antigénic components of Leishmania tropica.
J. Philippine Med. Ass., 41, 647.
- GARCIA (W.), OELERICH (S.) et MUHLFORDT (H.). 1969 - Relaciones inmunológicas entre Trypanosoma cruzi y Trypanosoma lewisi.
Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 11, 67.

- GOLDMANN (M.) et SIDDIQUI (W. A.) . 1965 - Antigenic comparaison of two substrains of Entamoeba histolytica by gel diffusion and immunoelectrophoresis.
Exp. Parasitology, 17, 326.
- GONZALEZ-CAPPA (S. M.) et KAGAN (I. G.) . 1969 - Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma cruzi.
Exp. Parasitology, 25, 50.
- GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.) . 1953 - Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin.
Bioch. Biophys. Acta., 10, 193.
- GRAY (A. R.) . 1961 - Soluble antigens of Trypanosoma vivax and of other trypanosomes.
Immunology, 4, 253.
- GRAY (A. R.) 1967 - Some principles of the immunology of Trypanosomiasis.
Bull. Org. Mond. Santé, 37, 177.
- GUTTMANN (H. N.) . 1966 - The first defined medium for Trypanosoma spp.
J. Protozool., 13, suppl. : 18.
- GUTTMANN (H. N.) et WALLACE (F. C.) . 1964 - Nutrition and physiology of the Trypanosomatidae.
Biochemistry and Physiology of Protozoa, 3, 459.
- HOARE (C. A.) 1967 - Evolutionary trends in mammalian Trypanosomes.
Advances in Parasitology, 5, 47.
- IRALU (V.) . 1967 - Trypanosoma cruzi, cultivation in trypticase soy broth with hemin and serum.
J. Parasit., 53, 653.
- JADIN (J.) et PIERREUX (G.) . 1960 - Un milieu de culture pour Trypanosomidés.
Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 40, 903.
- JADIN (J.) et LE RAY (D.) 1969 - Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains.
Ann. Soc. Belge. Méd. Trop., 49, 331.

- JADIN (J.) et WERY (M.). 1963 - La culture des Trypanosomidae.
Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 43, 831.
- KELSER (R. A.). 1936 - A complement-fixation test for Chagas disease employing an artificial culture antigen.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 405.
- KOLLERT (W.), BOCK (M.) et GONNERT (R.). 1956 - Die Zuchtung von Trypanosoma cruzi in Gewebe Kulturen.
Ztschr. Tropenmed. Parasit. Stuttgart, 10, 284.
- LEHMANN (D. L.). 1964 - An autoclaved medium for the growth and possible differentiation of African Trypanosomes.
Ann. Trop. Med. Parasit., 58, 6
- LE RAY (D.). 1970 - Analyse immunoélectrophorétique des formes de culture de Trypanosoma brucei.
C.R. Soc. Biol. Paris, Sous presse.
- LITTLE (P. A) et SUBBAROW (Y.). 1945 - A practical liquid medium for cultivation of Trypanosoma cruzi in large volumes.
J. Bact., 50, 57.
- LUMSDEN (W. H. R.). 1967 - Trends in ressearch on the immunology of Trypanosomiasis.
Bull. Org. Mond. Santé, 37, 167.
- LWOFF (M.) .1938 - L'hématine et l'acide ascorbique, facteurs de croissance pour le flagellé Schizotrypanum cruzi.
C.R. Acad. Sc. Paris, 206, 540.
- LWOFF (M.). 1940 - Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés Trypanosomidés.
Masson et cie, Paris
- LWOFF (M.) 1951 - The nutrition of parasitic flagellates (Trypanosomidae, Trychomonadinae).
Biochemistry and Physiology of Protozoa, 1, 129.
- MATHIS (C.). 1906 - Sur une modification au milieu de Novy et Mac-Neal pour la culture des Trypanosomes.
C.R. Seanc. Soc. Biol. Fr., 61, 550.

- MATHOT (C.), ALESANDRO (P.A.), SCHER (S.) et ROTHEN (A.)
1967 - The immune response of golden hamsters to
Leishmania donovani as tested by immunoelectroadsorption.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 16, 443.
- MEYER (H.) et OLIVEIRA (M.X.). 1948 - Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue culture : a four year study.
Parasitology, 39, 91.
- MUNIZ (J.). 1967 - Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogênica do Schizo Trypanosoma cruzi no organismo humano.
Hospital. Rio de Janeiro, 72, 675.
- MUNIZ (J.). 1967 - De l'emploi de la technique de double diffusion en tube (Oakley et Fulthorp) pour l'analyse des cultures de Schizotrypanum cruzi en développement.
C.R. Seanc. Soc. Biol. Fr., 161, 492.
- NICOLLE (C.). 1908 - Culture du parasite du bouton d'Orient.
C.R. Acad. Sc. Paris, 146, 842.
- NJOGU (A.R.) et HUMPHRYES (K.C.). 1967 (a) - Electrophoretic séparation of the soluble proteins of "brucei" subgroup trypanosomes.
Nature (Lond.), 216, 280.
- NJOGU (A.R.), et HUMPHRYES (K.C.). 1967 (b) - Distribution of the soluble dehydrogenases and diaphorases of "brucei" subgroup of trypanosomes in starchgel electroregrams.
Nature (Lond.), 216, 1308.
- NOGUCHI (H.) et WENYON (H.): 1951 - Cultivation of Trypanosoma cruzi.
J. Bact., 61, 709.
- NOVY (F.C.) et MAC NEAL (W.J.). 1904 - On the cultivation of Trypanosoma brucei.
J. Infect. dis., 1, 1.
- NUSSENZWEIG (V.) et GOBLE (F.C.). 1966 - Further studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi.
Exp. Parasitology, 18, 224.

- OELERICH (S.). 1969 - Analyse und präparation von antigenen aus Trypanosoma lewisi.
Zeitschrift für Trop. und Parasit., 20, 397.
- OUCHTERLONY (O.). 1948 - Antigen antibody reaction in gels.
Ark. Kemi., 26 - 1.
- PESSAT (O. An.). 1961 - Milieu diphasique pour la culture de Trypanosoma cruzi.
Bull. Soc. Path. Exo., 54, 16.
- POIRIER (A.). 1948 - Contribution à l'étude des cultures de Trypanosoma cruzi.
Lyon; Imp des Beaux Arts
- RANQUE (J.), QUILICI (M.), DUNAN (S.) et ASSADOURIAN (Y.). 1969
Etude de la structure antigénique de Crithidia (Strigomonas) fasciculata par les méthodes de précipitation en gélose.
Protistologica, 5, 97.
- RICHAUD (J.), FROMENTIN (H.) et DODIN (A.). 1966 - Dosages enzymatiques effectués sur différentes souches de Trypanosoma gambiense.
Ann. de parasit. hum. et comp., 41, 545.
- ROUSSEAU-BAELDE (M.) et MISSELYN (G.). 1963 - Protéines de trypanosomes et leur mobilité électrophorétique.
C.R.Séanc. Soc. Biol. Fr., 153, 1854.
- SAMPATH (A.) et LITTLE (P.). 1949 - Cultivation of Trypanosoma cruzi in liquid media.
J. Bact., 57, 265.
- SCHNEIDER (C.R.) et HERTIG (M.). 1966 - Immunodiffusion reactions of panamanian leishmania.
Exp. Parasitology, 18, 25.
- SENECA (H.), HENDERSON (E.) et HARVEY (M.). 1949 - Purification of hemoglagellates cultures with antibiotics.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 41.

- SENEKJIE (H. A.) 1943 - Biocheminal reactions, cultural characteristics and growth requirements of Trypanosoma cruzi.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 23, 523.
- SENEKJIE (H. A.) et LEWIS 1945 - An inquired into the growth factor or factors of certain blood and tissue flagellates.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 25, 345.
- SHEIDEGGER (J. J.). 1953 - Une microméthode de l'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7, 103.
- SILVA (I. I.) 1954 - Método de cultivo del Trypanosoma cruzi para la preparation de antigenos.
An. Inst. Med. réG Tucum'n, 4, 71.
- SMITHERS (S. R.), TERRY (R. J.) et HOCKLEY (D. J.). 1969 - Host antigens in Schistosomiasis.
Proc. R. Soc. Ser. B., 171, 483.
- STREJAN (G.) 1965 - "Antibody heterogeneity to Trypanosoma cruzi".
Experientia Basle, 21, 399.
- TAYLOR (Ang E. R.) et BAKER (J. R.). 1968 - The cultivation of parasites in vitro.
Macwell Scientific Publication Oxford and Edinburg.
- TOBIE (E. J.). 1964 - Cultivation of mammalian trypanosomes.
J. Protozool., 11, 418.
- TOBIE (E. J.) et REES (C. W.). 1948 - **The** cultivation of Trypanosoma cruzi in dialysate medium.
J. Parasit., 34, 162.
- TORCK-DELCROIX (C.). 1968 - Contribution à la connaissance des Penicillium par l'étude de leurs structures antigéniques.
Thèse doctorat en Pharmacie LILLE.
- TRAN VAN KY (P.), VAUCELLE (T.), CAPRON (A.) et VERNES (A.). 1967 - Caractérisation des types d'activités enzymatiques dans le broyat de Fasciola hepatica après immunoélectrophorèse en agarose.
Bull. Soc. Pathol. Exot., 60, 263.

- URIEL (J.). 1963 - Color reactions for the identification of antigen-antibody precipitates in gel diffusion media.
N. Y. Acad. Sci., 103, 936.
- WARREN (L. G.). 1960 - Metabolism of Schizotrypanun cruzi Chagas.
I. Effet of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasit., 46, 529.
- WEINMAN (D.). 1960 - Trehalose metabolism of Trypanosomes.
Nature, (Lond.), 186, 166.
- WERY (M.) et DE GROODT-LASSEEL (M.). 1966 - Ultrastructure de Trypanosoma cruzi en milieu semi-synthétique.
Ann. Soc. Belge Med. Trop., 46, 337.
- ZUCKERMAN (A.) et RISTIC (M.). 1968 - Blood parasite antigens and antibodies.
Infectious blood Diseases of Man and Animals, 1, 79.

