

ACADÉMIE DE LILLE

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

T H È S E

présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille,
pour obtenir le grade de Docteur ès Sciences Naturelles

LE CARACTÈRE ANTIGÉNIQUE DES
TRYPANOSOMATIDAE HÉTÉROXÈNES PARASITES
DE L'HOMME :

TRYPANOSOMA (S.) CRUZI,
TRYPANOSOMA (T.) B. GAMBIENSE
ET *LEISHMANIA DONOVANI*.

par

Daniel AFCHAIN

Soutenue le 30 Septembre 1976, devant la Commission d'Examen.

JURY : M. M. DURCHON
M. E. VIVIER
M^{me} J. BEISSON
M. J. BIGUET
M. S. AVRAMEAS
M. A. CAPRON

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS,
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M.	BACCHUS Pierre	Astronomie
M.	BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M.	BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BILLARD Jean	Physique du Solide
M.	BIAYS Pierre	Géographie
M.	BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M.	BOUGHON Pierre	Algèbre
M.	BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M.	CÉLET Paul	Géologie Générale
M.	CONSTANT Eugène	Electronique
M.	DECUYPER Marcel	Géométrie
M.	DELATTRE Charles	Géologie Générale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique
M.	DERCOURT Michel	Géologie Générale
M.	DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M.	FAURE Robert	Mécanique
M.	FOURET René	Physique du Solide
M.	GABILLARD Robert	Electronique
M.	GLACET Charles	Chimie Organique
M.	GONTIER Gérard	Mécanique
M.	GRUSON Laurent	Algèbre
M.	GUILLAUME Jean	Microbiologie
M.	HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M.	LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislav	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M ^{lle} DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M ^e EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FORELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M ^{lle} KOSMAN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M ^{lle} LEGRAND Denise	Algèbre
M ^{lle} LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M ^e N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie
M ^{lle} SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STEEN Jean-Pierre	Informatique

M. THERY Pierre
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNIER Georges
M. WATERLOT Michel
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Géologie Générale
Algèbre

Je dédie cette thèse :

à ma femme

à mon fils

à mes parents

C'est une joie d'exprimer ici ma gratitude envers les éminents maîtres dont les conseils éclairés et le soutien constant m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je remercie tout particulièrement :

- Monsieur le Professeur DURCHON,
vous me faites le grand honneur de présider cette thèse. Vous m'avez formé à la Biologie Animale et je voudrais que vous trouviez ici le témoignage de mon admiration et de ma vive reconnaissance.

- Monsieur le Professeur VIVIER,
vous avez eu la bienveillance de m'accueillir à de multiples reprises dans votre laboratoire et de m'initier à la microscopie électronique.

Vous me faites aujourd'hui l'honneur de faire partie de ce jury, je vous prie d'accepter l'expression de ma profonde gratitude.

- Monsieur le Professeur BIGUET,

Je suis très honoré de vous compter parmi mes juges. Je ne saurais oublier l'aide si chaleureuse que vous m'avez apportée dès mon arrivée dans le service de Parasitologie. Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

- Monsieur le Professeur CAPRON,

C'est sous votre haute compétence que j'ai fait mes premiers pas dans la recherche. Vous m'avez ensuite confié ce travail que j'ai mené avec le plus grand plaisir, car partager la vie de votre équipe, bénéficier de votre dynamisme et de votre culture, est source d'enthousiasme et d'enrichissement. Je voudrais exprimer ici ma gratitude et mon respectueux attachement.

- Madame BEISSON, Directeur de Recherche au C. N. R. S.

Je vous remercie d'avoir bien voulu juger cette thèse et vous prie de croire en mes sentiments déferents.

- Monsieur AVRAMEAS, Directeur de Recherche au C. N. R. S.

Je suis très honoré de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie également :

- Monsieur le Professeur JADIN, qui m'a si souvent accueilli dans son laboratoire à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers pour m'initier aux cultures de trypanosomes. Je lui suis redevable de nombreuses souches.

- Monsieur le Professeur DEBLOCK, qui fut un guide particulièrement précieux pour la rédaction de cette thèse.

- Mademoiselle FRUIT, Messieurs LE RAY et VAN MEIRVENNE, envers lesquels j'ai une vive reconnaissance pour leur collaboration très efficace et amicale.

- Mesdames LEPRESLE et LEMAIRE, Mademoiselle PIRON et Monsieur LEJEUNE, qui m'ont successivement apporté leur collaboration technique.

- Messieurs PETITPREZ et JACOB, qui m'ont beaucoup aidé dans la réalisation du travail de microscopie électronique.

- Que Messieurs les Professeurs LAPIERRE, PRATA, QUILICI, GENTILINI, RIOUX, et les Docteurs SEGURA, BEN RACHID, WERY, TONNEL, soient remerciés pour les envois de matériel et de sérums humains.

- Que Monsieur le Professeur VERNES, Madame DURIEUX, Messieurs TAILLIEZ, WILLAERT, BOUT, YARZABAL et DUPAS, ne soient pas oubliés ; leurs conseils m'ont permis à maintes reprises de mieux orienter ce travail.

- Que toutes les personnes, qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur concours, trouvent ici un témoignage de mon amitié.

- Que Madame COULEMBIER accepte mes remerciements les plus chaleureux pour sa collaboration à la réalisation des planches photographiques.

- et que Madame MASSARD, soit remerciée très sincèrement pour la mise en page du présent travail.

TABLE DES MATIERES

	Page
<u>Chapitre 1. Introduction.....</u>	1
1.1. Classification.....	1
1.2. Cycles évolutifs.....	2
1.3. Historique des études immunologiques.....	3
1.3.1. Antigènes hétérophiles.....	4
1.3.2. Antigènes parasitaires.....	5
1.4. L'analyse immunoélectrophorétique.....	9
1.4.1. Définition, valeur.....	9
1.4.2. Ses limites.....	10
<u>Chapitre 2. Techniques.....</u>	13
2.1. Souches.....	13
2.2. Obtention des parasites.....	16
2.2.1. Culture <u>in vitro</u>	17
2.2.2. Formes sanguicoles.....	19
2.3. Préparation des extraits antigéniques.....	20
2.3.1. Récolte des organismes multipliés <u>in vitro</u> et <u>in vivo</u>	20
2.3.2. Préparation d'extraits antigéniques hydro- solubles.....	21
2.4. Préparation des immunosérums.....	21
2.4.1. Méthode classique par voie sous-scapulaire.....	22
2.4.2. Méthode de VAITUKAITIS <u>et al.</u>	22
2.5. Techniques immunologiques.....	23
2.5.1. Précipitation en gel.....	24
2.5.1.1. Double diffusion en gel (D.D.G.).....	24
2.5.1.2. Immunoélectrophorèse (I.E.P.).....	27
2.5.1.3. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle...	30
2.5.2. Epreuve d'absorption croisée.....	34
2.5.3. Immunofluorescence indirecte (I.F.I.).....	36
2.5.4. Technique indirecte de marquage enzymologique à la peroxydase et ses applications en micros- copie optique et électronique.....	38

2.6. Purifications biochimique et immunochimique.....	40
2.6.1. Chromatographie sur gel de Séphadex.....	40
2.6.2. Immunoadsorption.....	41
2.6.2.1. Protocole proposé par AXEN <u>et al.</u>	41
2.6.2.2. Protocole proposé par AVRAMEAS et TERNYNCK.....	42

Chapitre 3. Structures antigéniques des extraits hydrosolubles des trypanosomatidae hétéroxènes parasites de l'homme : T. cruzi,

<u>T. rangeli</u> , <u>T. b. gambiense</u> , <u>L. donovani</u>	44
3.1. Les antigènes hétérospécifiques.....	44
3.1.1. Les polysaccharides du type de la substance C.....	45
3.1.2. Parentés de hasard (antigènes ubiquistes).....	46
3.1.2.1. Helminthes - Champignons.....	46
3.1.2.2. <u>L. donovani</u> - <u>Mycobacteriaceae</u>	47
3.1.3. Relations avec le milieu de culture ou l'hôte vertébré.....	47
3.1.3.1. Contrôle immunologique des conditions de lavage lors de la récolte.....	48
3.1.3.2. Composants sériques dans les extraits antigéniques parasitaires.....	51
3.1.3.3. Absorption des anticorps anti-milieu ou anti-hôte vertébré.....	53
3.2. Les antigènes strictement d'espèce.....	54
3.2.1. Etude complète d'une structure antigénique par immunoélectrophorèse : <u>T. cruzi</u> Tehuantepec, en culture <u>in vitro</u>	54
3.2.1.1. Cinétique de l'apparition des anticorps expérimentaux chez le lapin.....	54
3.2.1.2. Structure antigénique parasitaire.....	56
3.2.1.3. Mise en évidence du composant antigénique "remarquable" n°5.....	56
3.2.1.4. Stabilité antigénique en culture.....	57
3.2.2. Structure antigénique parasitaire de <u>T. rangeli</u> en culture <u>in vitro</u>	58
3.2.3. Salivaria : <u>T. b. gambiense</u> (ELIANE). Structure antigénique des formes de culture et des formes sanguicoles.....	59

3.2.4. <u>Leishmania donovani</u> en culture <u>in vitro</u>	60
3.2.4.1. Structure antigénique parasitaire.....	60
3.2.4.2. Mise en évidence des composants "remar- quables" n°4 et 24.....	60
3.2.4.3. Stabilité antigénique au cours du main- tien <u>in vitro</u>	61
3.3. Conclusions.....	62
<u>Chapitre 4. Relations immunotaxonomiques entre les Trypanosomatidae</u> <u>hétéroxènes</u>	63
4.1. Relations intraspécifiques : souches d'origines géo- graphique et parasitaire diverses.....	63
4.1.1. <u>T. cruzi</u>	63
4.1.2. <u>T. b. gambiense</u>	64
4.1.3. <u>L. donovani</u>	65
4.2. Relations antigéniques au sein du groupe-espèce : le complexe <u>brucei</u>	65
4.3. Relations au sein de la section : les trypanosomes Ster- coraria.....	68
4.4. Relations au sein du genre : le genre <u>Leishmania</u>	70
4.5. Parentés entre les trypanosomes Salivaria, les trypano- somes Stercoraria et les <u>Leishmania</u>	73
4.6. Synthèse des relations immunotaxonomiques.....	75
<u>Chapitre 5. Les composants spécifiques de T. (S.) cruzi, de</u> <u>L. donovani</u> et de <u>T. (T.) b. gambiense</u>	76
5.1. Composant n°5 spécifique de <u>T. (S.) cruzi</u>	76
5.2. Composants n°4 et 24 de <u>L. donovani</u>	77
5.3. Composants de <u>T. (T.) b. gambiense</u>	79
5.3.1. Spécificités liées au stade évolutif.....	79
5.3.2. Spécificités liées au type antigénique (anti- gènes variables).....	81
5.4. Conclusions.....	82
<u>Chapitre 6. Intérêt diagnostique des antigènes spécifiques des</u> <u>Trypanosomatidae</u>	84
6.1. Diagnostic immunoélectrophorétique des affections humaines à <u>Trypanosomatidae</u>	84
6.1.1. Maladie de Chagas.....	84
6.1.1.1. Développement des anticorps précipi- tants au cours de l'infection expéri- mentale de la souris.....	84

6.1.1.2. Diagnostic immunoélectrophorétique de la maladie de Chagas.....	85 bis
6.1.2. Leishmaniose viscérale.....	87
6.1.2.1. Les anticorps précipitants chez le hamster expérimentalement infecté et chez le chien naturellement infecté.....	88
6.1.2.2. Diagnostic immunoélectrophorétique du kala-azar.....	88
6.1.3. Diagnostic immunoélectrophorétique de la maladie du sommeil à <u>T. b. gambiense</u>	91
6.2. Réactions croisées entre <u>T. cruzi</u> , <u>T. b. gambiense</u> , <u>T. b. brucei</u> et <u>L. donovani</u> , observées en immunoélectrophorèse, dans les infections expérimentales et humaines.....	95
6.3. Etude diagnostique comparative par immunofluorescence indirecte.....	97
6.4. Synthèse.....	99
<u>Chapitre 7. Purification des antigènes spécifiques de <u>T. cruzi</u> et de <u>T. b. brucei</u>. Obtention d'antisérums monospécifiques.....</u>	100
7.1. Purification du composant spécifique n°5 de <u>T. cruzi</u>	100
7.1.1. Essais de purification biochimique par chromatographie sur gel de Séphadex. Obtention d'un extrait "semi-purifié".....	100
7.1.2. Purification immunochimique par chromatographie d'affinité.....	105
7.1.2.1. Obtention d'un sérum monospécifique.....	106
7.1.2.2. Immunoabsorption et contrôles immuno-chimiques de pureté de l'antigène obtenu.....	106
7.2. Purification du composant V de <u>T. b. brucei</u> , spécifique du type antigénique AnTat-1.....	107
7.2.1. Rappel des résultats immunoélectrophorétiques obtenus par LE RAY (1975).....	107
7.2.2. Purification immunochimique du composant V.....	107
<u>Chapitre 8. Localisation en surface des antigènes spécifiques de <u>T. b. brucei</u> et de <u>T. cruzi</u>. Microscopie optique et électronique...</u>	110
8.1. Localisation de l'antigène variable V de <u>T. b. brucei</u> au niveau du manteau des formes sanguicoles. Immunofluorescence et immunoperoxydase indirectes.....	110
8.2. Localisation du composant n°5 de <u>T. cruzi</u> au niveau de la surface des formes de culture. Immunofluorescence et immunoperoxydase indirectes.....	112

Chapitre 9. Discussion.....	114
9.1. Apport de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des structures antigéniques des <u>Trypanosomatidae</u> hétéroxènes.....	114
9.1.1. Reproductibilité des résultats obtenus.....	114
9.1.2. Notion de mosaïque antigénique complexe.....	115
9.1.2.1. Antigènes hétérospécifiques.....	116
8.1.2.2. Les antigènes "propres à l'espèce".....	119
9.2. Apport de la connaissance des antigènes extraits des formes de culture.....	120
9.2.1. Taxonomie et phylogénèse.....	120
9.2.2. Notion de personnalité antigénique.....	124
9.2.3. Conséquences diagnostiques.....	125
9.2.4. Isolement du composant n°5 de <u>T. cruzi</u> , sa localisation au niveau de la surface des formes de culture.....	126
9.3. Apport de la connaissance des antigènes extraits des formes sanguicoles des <u>Salivaria</u>	128
9.3.1. Spécificités de stade évolutif et de type antigénique chez <u>T. b. gambiense</u> . Répercussions diagnostiques.....	129
9.3.2. La variation antigénique chez <u>T. b. brucei</u> . Isolement et localisation du composant variable....	132
CONCLUSION.....	136
RESUME.....	138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	142

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1.1. CLASSIFICATION

La maladie de Chagas à Trypanosoma cruzi, la leishmaniose viscérale (kala-azar) à Leishmania donovani et la maladie du sommeil à Trypanosoma brucei gambiense et à Trypanosoma brucei rhodesiense sont dues à des Protozoaires parasites de la famille des Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Ordre des Kinetoplastida, classe des Zoomastigophorea). Ces parasites obligatoires sont caractérisés par la présence d'un flagelle et d'un kinétoplaste et par l'absence de sexualité. Ils font partie des Trypanosomatidae hétéroxènes : leur cycle évolutif s'accomplit successivement dans le tractus digestif d'un invertébré Arthropode piqueur puis chez un hôte vertébré pour les genres Trypanosoma et Leishmania. La nomenclature infrafamiliale, unanimement acceptée, est celle de WALLACE (1966) et de HOARE (1966). Dans le genre Trypanosoma, une distinction a été effectuée (HOARE, 1966) entre les trypanosomes Salivaria, à transmission inoculative, représentés par T. brucei, et les trypanosomes Stercoraria, à transmission contaminative, représentés par T. cruzi (Tableau I).

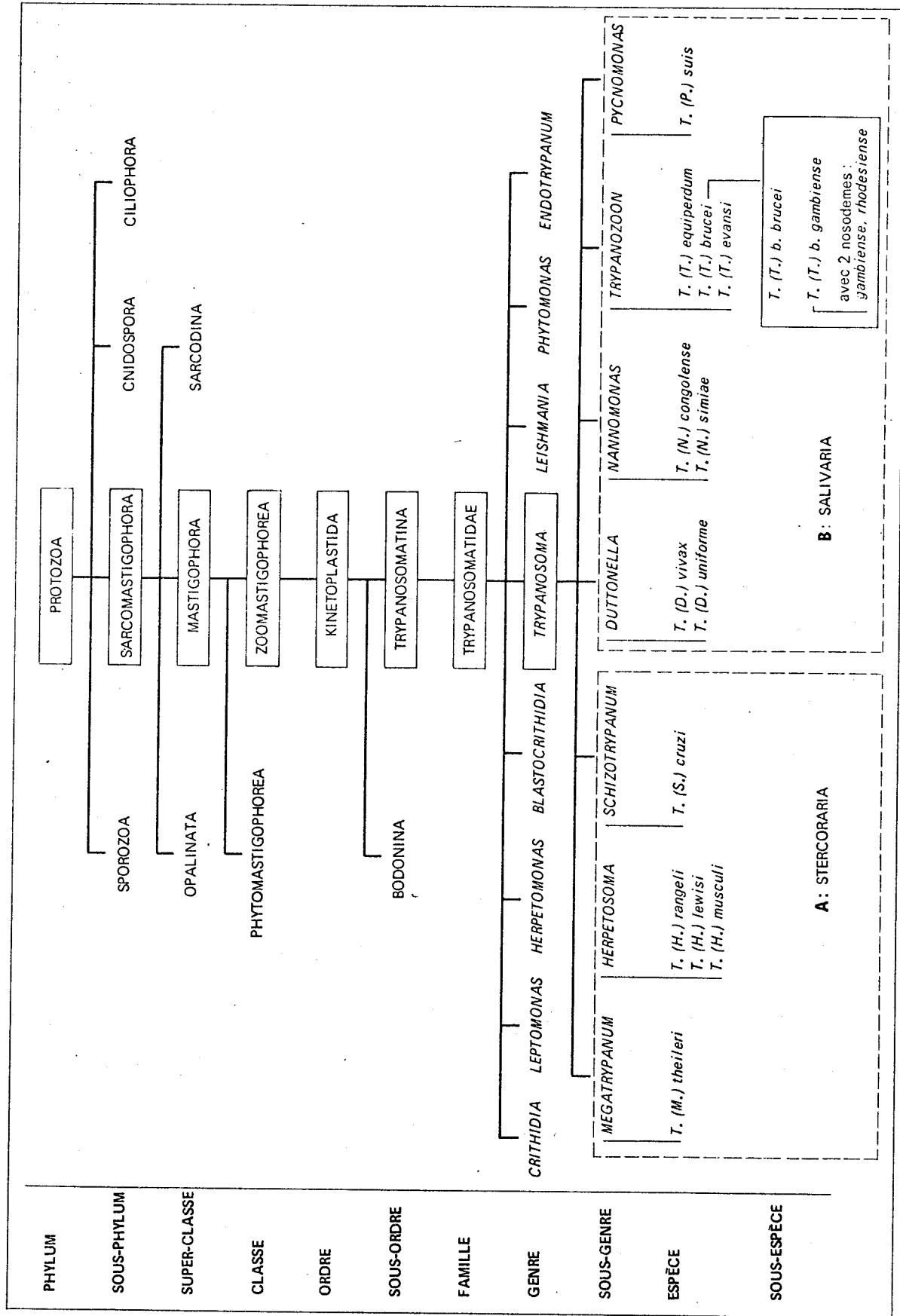
Dans la section des trypanosomes Stercoraria, sont distingués différents sous-genres : Megatrypanum : T. (M.) theileri ; Herpetosoma : T. (H.) rangeli, T. (H.) lewisi ; Schizotrypanum : T. (S.) cruzi, T. (S.) dionisii (tableau I).

Dans la section des trypanosomes Salivaria, le sous-genre intéressant la parasitologie humaine est le sous-genre Trypanozoon : T. (T.) brucei, T. (T.) evansi, T. (T.) equiperdum. L'espèce T. (T.) brucei comporte 2 sous-espèces : T. (T.) b. brucei et T. (T.) b. gambiense, cette dernière comprenant deux nosodèmes : gambiense et rhodesiense (tableau I).

En ce qui concerne le genre Leishmania, la classification des espèces parasites de l'homme repose essentiellement sur des critères cliniques. C'est ainsi que trois grands types nosogéographiques peuvent être retenus :

- (i) la leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde ;
- (ii) les leishmanioses cutanéomuqueuses sud-américaines ;
- (iii) et la leishmaniose viscérale.

Tableau I. CLASSIFICATION DE QUELQUES TRYPANOSOMES IMPORTANTS DE MAMMIFÈRES



(i) La leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde, ou Bouton d'Orient, due à L. tropica, se caractérise cliniquement par une lésion cutanée évoluant en une ulcération croûteuse.

Les auteurs distinguent : - une forme "humide" du Bouton d'Orient, principalement rurale, due à L. tropica major ;

- une forme "sèche", principalement urbaine, due à L. tropica minor.

(ii) Les leishmanioses cutanéomuqueuses sud-américaines ont été individualisées en quatre types principaux :

- l'ulcère des Gommiers ("Ulcera de los chicleros"), dû à L. mexicana ;
- la leishmaniose cutanée panaméenne, due à L. guyanensis ;
- l'"Espundia" ou leishmaniose cutanéomuqueuse, due à L. braziliensis ;
- et la leishmaniose cutanée péruvienne ("Uta") due à L. peruviana.

(iii) La leishmaniose viscérale, due à L. donovani, détermine une atteinte profonde du système réticulo-histiocytaire. Il est classique de signaler plusieurs types épidémiologiques : le kala-azar indien, la leishmaniose viscérale d'Asie Centrale, la forme sud-américaine, le kala-azar soudanais et la leishmaniose viscérale infantile localisée au bassin méditerranéen.

Chez les Trypanosomatidae, le kinétoplaste, expansion mitochondriale renfermant de l'ADN fibrillaire (STEINERT, 1960 ; CLARCK et WALLACE, 1960 ; SIMPSON, 1972), revêt une importance déterminante au point de vue biologique et sur le plan taxonomique. Morphologiquement, la position du kinétoplaste et du flagelle par rapport à l'organisation générale de la cellule, a conduit HOARE et WALLACE (1966) à la constitution d'une série de types morphologiques correspondant à un stade de développement du parasite. Les différents genres de la famille des Trypanosomatidae ont été établis par HOARE (1967) suivant la séquence des stades parcourus au cours du cycle par un organisme (figure 1).

1.2. CYCLES EVOLUTIFS

Le cycle évolutif des trois principaux Trypanosomatidae parasites de l'homme est schématisé sur les figures 2 (T. cruzi), 3 (T. gambiense) et 4 (L. donovani).

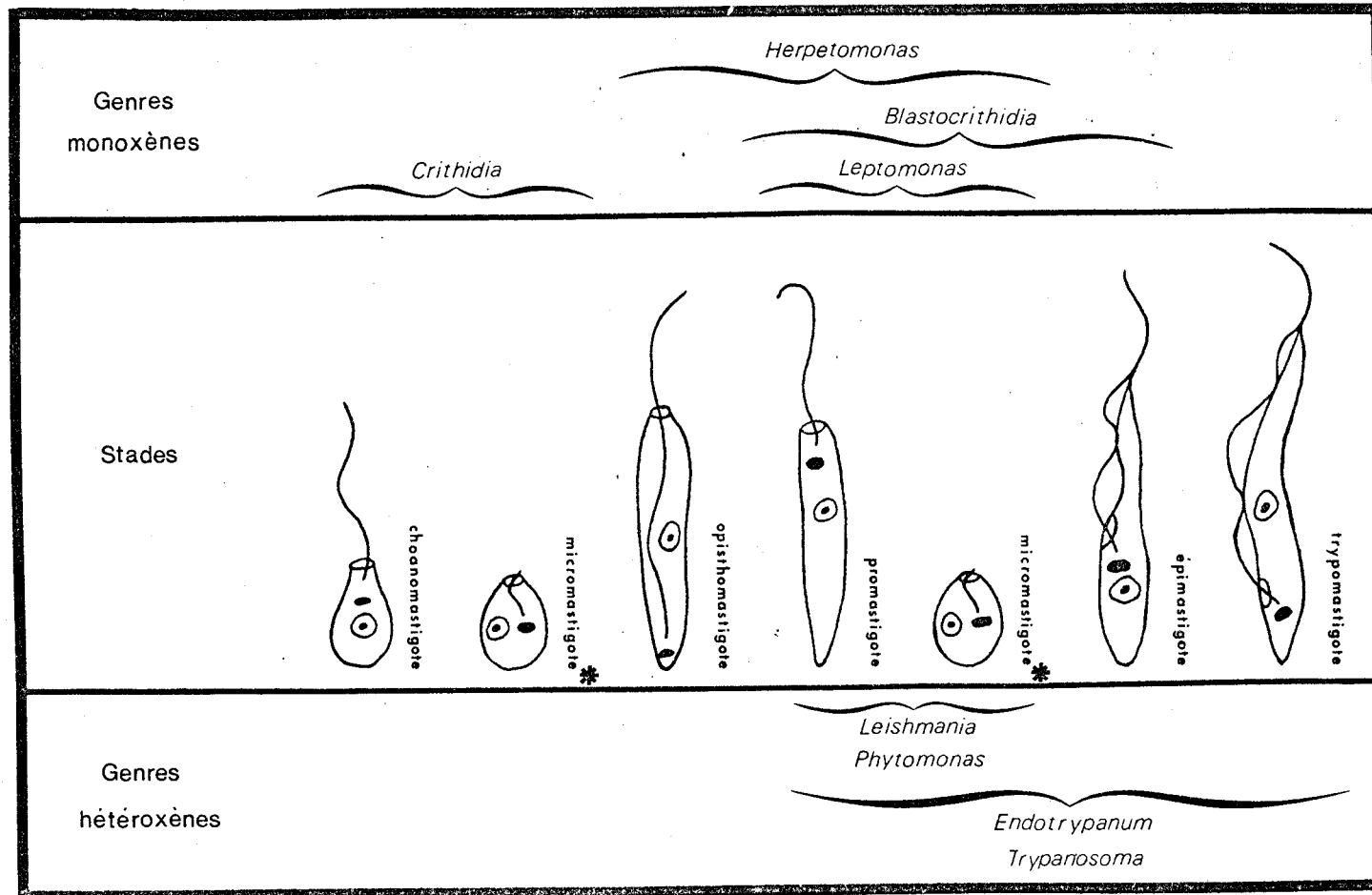


Figure 1 : Classification des différents genres des Trypanosomatidae d'après leurs stades de développement (suivant HOARE, 1967 ; redessiné).

* Sur le schéma original, HOARE et WALLACE (1966) avaient appelé cette forme sous le nom d'amastigote ; cependant, l'observation en microscopie électronique d'un flagelle (RUDZINSKA et al., 1964 ; CREEMERS et JADIN, 1967 ; JADIN, 1971 ; DWYER et al., 1974) recommande l'appellation de micromastigote préconisée par CREEMERS et JADIN (1967) et JADIN (1971).

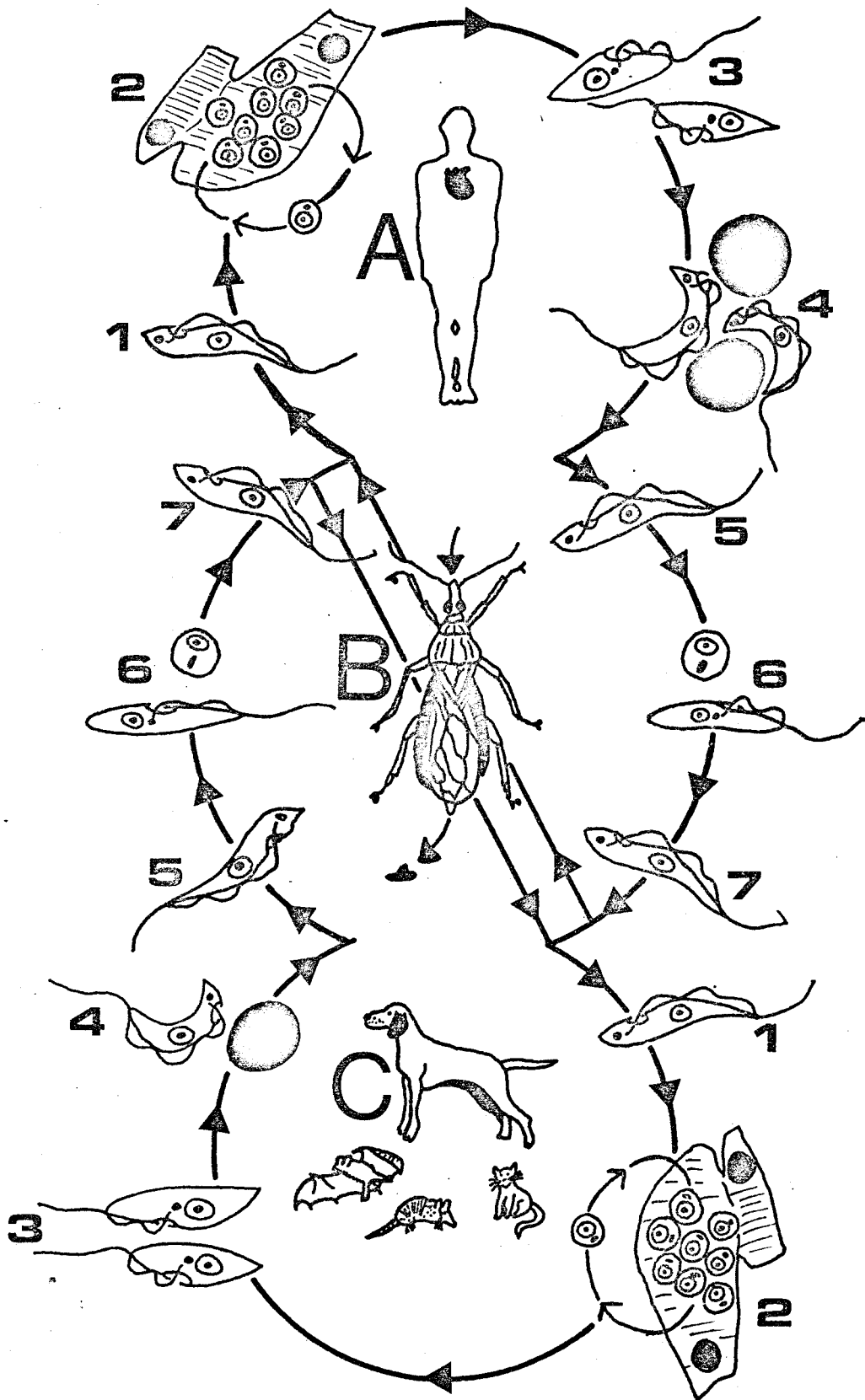


Figure 2. Cycle évolutif de la maladie de Chagas due à *T. cruzi*. A et C = évolution chez l'homme et le "réservoir de virus" (chien, chat, rongeurs, sarigues, tatous, chauve-souris) : 1) trypomastigotes métacycliques transmis avec les déjections de la punaise sur la peau ou les muqueuses. 2) phase de multiplication des amastigotes dans les fibres musculaires. 3) épimastigotes. 4) trypomastigotes dans le sang périphérique. B = évolution dans le tube digestif d'une punaise (*Triatoma*, *Rhodnius*). 5) trypomastigotes après ingestion. 6) phase de multiplication des amastigotes et des epimastigotes. 7) trypomastigotes métacycliques dans les déjections de l'insecte vecteur.

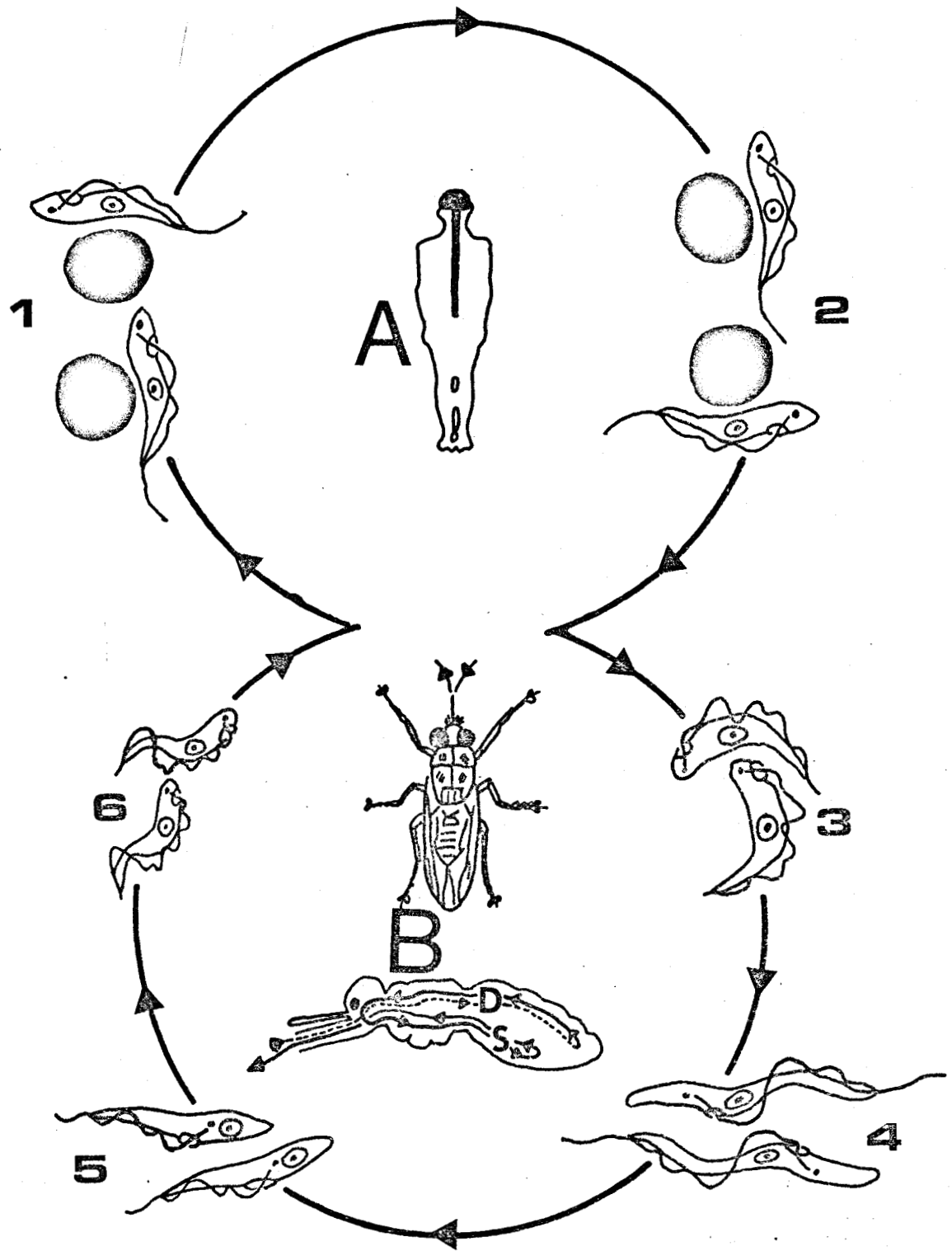


Figure 3. Cycle évolutif de la maladie du sommeil à *T.b.gambiense*. A = évolution chez l'homme : trypomastigotes dans le sang périphérique puis invasion du système nerveux central. 1-2) trypomastigotes. B = évolution chez l'insecte vecteur, la mouche tsé-tsé (*Glossina*). 3) trypomastigotes après ingestion. 4-5) phase de multiplication des trypomastigotes et des epimastigotes dans l'intestin (D). 6) trypomastigotes métacycliques dans les glandes salivaires (S). Transmission à l'homme lors de la piqûre par inoculation de la salive.

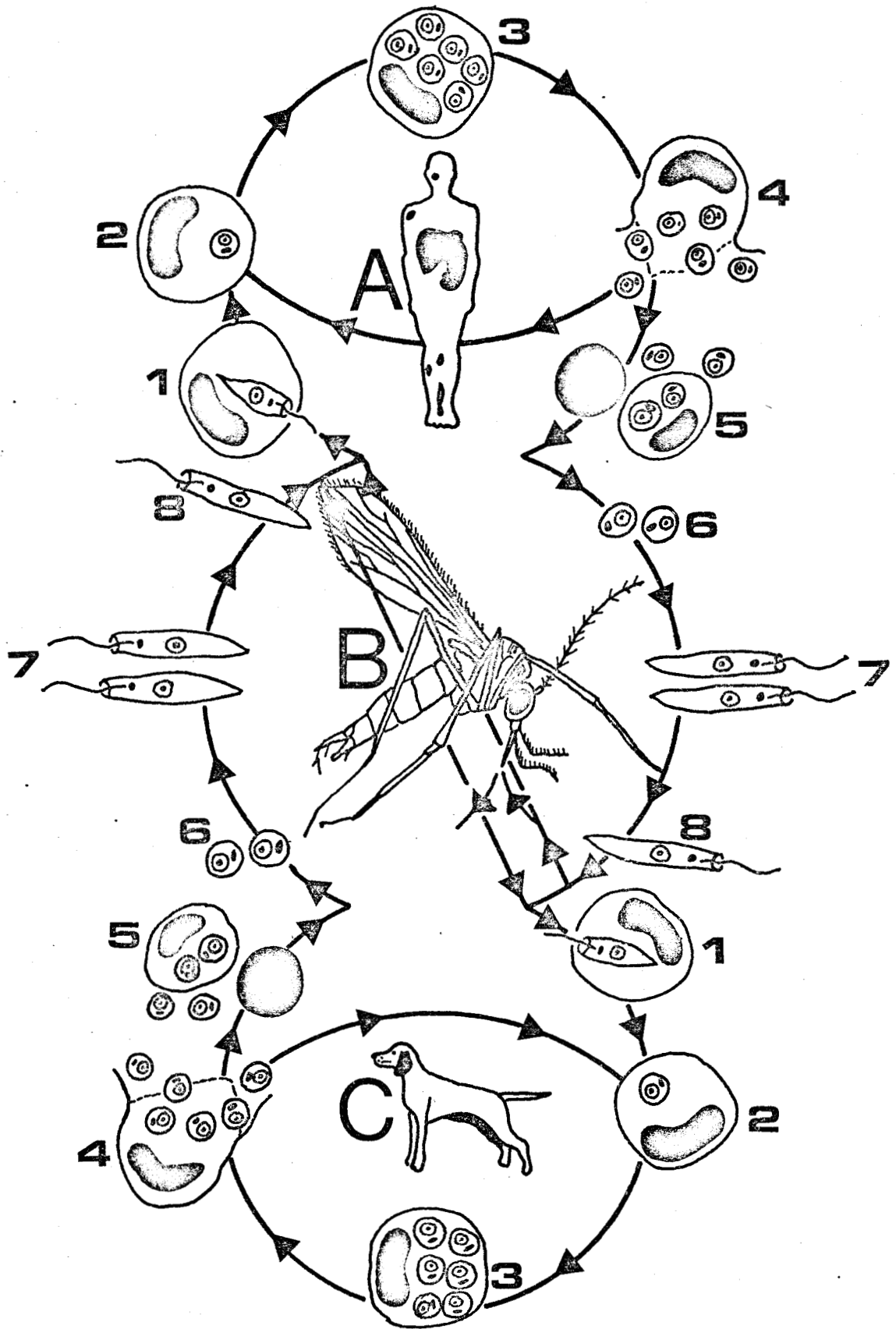


Figure 4. Cycle évolutif de la leishmaniose viscérale due à *L. donovani*. A et C = évolution chez l'homme et le "réservoir de virus" (chien pour la leishmaniose méditerranéenne) : 1) pénétration d'une forme promastigote dans une cellule réticulo-endothéliale. 2 à 4) évolution endocellulaire des formes amastigotes. 5) amastigotes dans le sang périphérique. B = évolution chez l'insecte vecteur (Phlébotome) : 6) amastigotes après ingestion. 7) Phase de multiplication des promastigotes. 8) promastigotes bloqués au niveau du proventricule de l'insecte. Transmission par piqûre (régurgitation).

Ces parasites hétéroxènes présentent chez l'hôte définitif une multiplication binaire parfois multiple, continue ou discontinue, et chez l'hôte intermédiaire (Insecte hématophage) une évolution cyclique aboutissant à un mode de transmission.

La comparaison des cycles évolutifs chez l'hôte définitif met en évidence des différences importantes dans la localisation parasitaire et le mode de développement. En effet, dans la leishmaniose viscérale, l'hôte définitif est uniquement porteur de formes micromastigotes à multiplication endocellulaire. Par contre, dans la trypanosomiase africaine à T. b. gambiense, les formes trypomastigotes exocellulaires se rencontrent dans le sang et les liquides interstitiels. La trypanosomiase américaine à T. cruzi résulte chez l'hôte définitif à la fois d'une phase endocellulaire avec présence de formes micromastigotes à multiplication discontinue et d'une phase sanguicole présentant des formes trypomastigotes.

Chez l'hôte intermédiaire, le développement cyclique et le mode de transmission sont différents pour ces trois parasites. Chez les Stercoraria (T. cruzi), la multiplication des parasites a lieu en station postérieure et la transmission s'effectue par contamination (fèces). Pour les Salivaria (T. b. gambiense), la multiplication des parasites se déroule en station antérieure dans le tractus digestif puis les glandes salivaires, la transmission s'effectuant par inoculation (piqûre). Quant aux leishmanies, cette multiplication des formes promastigotes est antérieure avec blocage au niveau du proventricule ; la transmission s'effectue lors de la piqûre par régurgitation.

1.3. HISTORIQUE DES ETUDES IMMUNOLOGIQUES

Les antigènes des Trypanosomatidae hétéroxènes ont fait l'objet de multiples revues dont les principales sont celles de :

- (i) GRAY (1965), OMS (1969), LUMSDEN (1970), WEITZ (1970) et BRENER (1973) sur les structures antigéniques des trypanosomes ;
- (ii) GRAY (1969 et 1970) sur la variation antigénique des trypanosomes Salivaria ;
- (iii) NEAL et al. (1969), DESOWITZ (1970), GOBLE (1970), SOLTYS (1973) et WOO (1974) concernant l'immunité dans les trypanosomiasés ;
- (iv) et enfin, de ADLER (1965), BRAY (1969), LAINSON et SCHAW (1971) et HEYNEMAN (1971) en ce qui concerne les leishmanies.

Pourtant, notre connaissance de l'antigénicité des Protozoaires est restée longtemps limitée à la réalisation de techniques sérologiques diverses ou à la préparation d'extraits destinés à stimuler la résistance de l'hôte.

De multiples techniques ont été utilisées afin de préciser les caractères antigéniques généraux. Il s'agit des techniques d'agglutination, de lyse ou de neutralisation, d'immunofluorescence ou de fixation du complément. Mais, ce sont en fait surtout les analyses antigéniques réalisées en précipitation en gel au moyen des techniques de double diffusion ou d'immunoélectrophorèse, qui ont apporté les informations les plus précises permettant de conclure que l'antigénicité des Trypanosomatidae hétéroxènes ressort en définitive de structures multiples constituant des antigènes strictement d'espèce joints à des antigènes hétérophiles.

1.3.1. Antigènes hétérophiles

Comme chez de nombreux parasites, il est possible d'identifier chez les trypanosomatidés des antigènes provenant de "l'environnement" (hôte infecté, milieu de culture) ou des antigènes ubiquistes très largement répandus chez les micro-organismes.

Des travaux multiples ont révélé l'existence d'antigènes possédant les mêmes caractères antigéniques que ceux des protéines sériques, aussi bien chez les formes sanguicoles des trypanosomes que chez les formes de culture des trypanosomes et des leishmanies.

Chez les trypanosomes, des protéines sériques en provenance de l'hôte vertébré ont été décrites (Salivaria : T. b. rhodesiense : BIGALKE, 1966 ; T. vivax : KETTERIDGE, 1970, 1971, 1972 ; T. b. brucei : LE RAY, 1975 ; Stercoraria : T. lewisi : ENTNER, 1968 ; D'ALESSANDRO, 1972).

Au niveau des formes de culture, des antigènes en provenance du milieu ont été décelés chez les Salivaria (T. b. brucei : LE RAY, 1969), les Stercoraria (T. theileri : SPLITTER et al., 1967 ; T. cruzi : AFCHAIN et CAPRON, 1969) et les Leishmania (L. donovani : LE RAY et al., 1976a). D'autres auteurs, surtout à propos des leishmanies, ont préconisé l'emploi de milieux de culture non immunogènes, comme le dialysat de NAKAMURA (CROOK et al., 1969 ; OELERICH, 1973) et le bouillon au sang de lapin (RANQUE et al., 1970) lorsque l'animal immunisé est le lapin.

On suggère aussi la présence d'un antigène de type Forssman chez T. rhodesiense (HOUBA et ALLISON, 1966 ; HOUBA et al., 1969) et chez T. cruzi (ENOS et ELTON, 1950). L'existence chez les Leishmania d'antigènes apparentés aux groupes sanguins ou à certains antigènes tissulaires de l'hôte vertébré n'a guère été recherchée jusqu'à présent. A cet égard, RUDZINSKA et al. (1964) ainsi que tout récemment DWYER et al. (1974) ont montré que les formes micromastigotes intracellulaires étaient pourvues d'une membrane limitante double dont le feuillet externe est perdu lors de la transformation en forme promastigote de culture ou du vecteur. La constitution immunochimique de ce feuillet et la participation de constituants de l'hôte à sa formation restent inconnues.

Une troisième classe d'antigènes hétérophiles est constituée par les antigènes ubiquistes. Cette classe comprend essentiellement les antigènes communs aux genres Leishmania et Mycobacterium (RANQUE et al., 1972 ; OELERICH, 1973 ; LE RAY et al., 1976a).

1.3.2. Antigènes parasitaires

Les antigènes parasitaires proprement dits peuvent être caractérisés à trois niveaux : les antigènes d'excrétion-sécrétion, les antigènes de surface et les antigènes somatiques.

- Les antigènes d'excrétion-sécrétion, souvent appelés "exoantigènes" (WEITZ, 1960) chez les Trypanosomatidae, ont été retrouvés chez de très nombreuses espèces.

Leur mise en évidence présente un intérêt certain dans le diagnostic des affections déterminées par les Stercoraria. Ils ont été décrits dans les cultures de T. cruzi (TARRANT et al., 1965 ; MUNIZ, 1967) et dans les infections expérimentales (T. cruzi : DE SIQUEIRA et al., 1966 ; T. lewisi : THILLET et CHANDLER, 1957 ; YASUDA et DUSANIC, 1969 ; D'ALESSANDRO, 1972).

Chez les Salivaria, les "exoantigènes" se rencontrent sous la forme d'antigènes solubles présents dans les infections expérimentales par T. b. brucei (WEITZ, 1960, 1963), T. vivax et T. b. gambiense (GRAY, 1961), T. congolense (DODIN et FROMENTIN, 1962), T. b. rhodesiense (SEED, 1963) et T. evansi (GILL, 1965). L'analyse des multiples travaux consacrés à cet important problème révèle cependant de nombreux éléments contradictoires (ALLSOPP et al., 1971) : d'une part il n'existe aucune évidence directe de la libération de ce type d'antigène in vivo (LANHAM et TAYLOR, 1972) ; d'autre part, lorsqu'ils sont mis en évidence, les protocoles expérimentaux ne permettent pas d'exclure l'in-

tervention d'une souffrance cellulaire induite par des facteurs physiques, biochimiques ou immunologiques.

Il est généralement admis que les antigènes solubles des *Salivaria*, retrouvés à la surface du parasite, sont impliqués dans la variation antigénique et également dans l'élaboration d'une immunité protectrice.

En ce qui concerne les leishmanies, l'existence d'antigènes d'excrétion-sécrétion in vitro a été initialement suggérée par ADLER (ADLER, 1964; 1965 ; ADLER et GUNDERS, 1964) et s'est vue confirmée à l'aide de la précipitation en gel par SCHNUR et al. (1972) et ZUCKERMAN et al. (1973). Ces antigènes exprimeraient des variations intraspécifiques entre populations à un même stade, et ils seraient spécifiques du sérotypes dans le complexe L. tropica-L. donovani (SCHNUR et al., 1972). Néanmoins, la valeur taxonomique de ces antigènes reste à établir.

- Les antigènes de surface ont été particulièrement bien étudiés chez les formes sanguicoles des trypanosomes *Salivaria* par les épreuves d'agglutination ou de lyse (T. b. brucei : LOURIE et O'CONNOR, 1937 ; GRAY, 1962 ; CUNNINGHAM et VICKERMAN, 1962 ; VAN MEIRVENNE et al., 1975a et b ; T. congolense : WILSON et CUNNINGHAM, 1972 ; T. vivax : CLARKSON et AWAN, 1969). Il est généralement admis que les antigènes de surface des *Salivaria* sont impliqués dans la variabilité antigénique. Les observations les plus significatives résultent de la mise en évidence d'un manteau ou manchon protéinique présent à la surface des trypomastigotes métacycliques et sanguicoles, et son absence chez les formes procycliques de culture ou du vecteur (VICKERMAN, 1969, 1972). Ceci suggère que ce manteau, acquis dans les glandes salivaires du vecteur lors de la transformation des épimastigotes en trypomastigotes métacycliques, pourrait constituer une structure d'adaptation du parasite à la vie sanguicole. Plusieurs auteurs (VICKERMAN et LUCKINS, 1969 ; TAKAYANAGI et al., 1973b) ont suggéré une relation entre le type antigénique du parasite (*) et les antigènes de surface. Nos travaux récents (FRUIT et al., 1976) confirment ces résultats et démontrent que les antigènes spécifiques de type antigénique, (donc impliqués dans la variation antigénique), sont effectivement présents au niveau du manteau des trypanosomes sanguicoles.

(*) Le type antigénique ou sérotype est déterminé par les antigènes impliqués dans la variation antigénique.

Les antigènes de surface des Leishmania ont été analysés principalement à l'aide des méthodes d'agglutination (CHANG et NEGHERBON, 1947 ; ADLER, 1964), et plus récemment par des études ultrastructurales après marquage à la ferritine (SAF'JAVONA et AVAKJAN, 1973). Leur caractérisation chimique n'a guère été abordée (GHOSH, 1963). Le recours aux lectines (DWYER, 1974) permet d'envisager, dans un avenir rapproché, une connaissance plus précise des structures de surface des Leishmania.

- Les antigènes somatiques ont pour intérêt de permettre d'apprécier l'importance des parentés et des spécificités antigéniques aux divers niveaux taxonomiques, et de préciser dans quelle mesure la structure antigénique parasitaire est affectée par la différenciation cellulaire du parasite et par la variation antigénique au cours de son cycle évolutif.

Les parentés antigéniques entre les trypanosomatidés détectées à l'aide des méthodes sérologiques traditionnelles (réaction de fixation du complément, hémagglutination passive, immunofluorescence indirecte) sont connues de longue date. Mais l'introduction des méthodes de précipitation en gel a constitué un apport déterminant dans la connaissance de la structure et de la fonction des antigènes.

La précipitation en gel appliquée aux antigènes somatiques des Trypanosomatidae a permis d'accumuler une série d'informations concernant :

a) La structure antigénique des trypanosomes et des leishmanies :

- T. b. brucei (SEED, 1964 ; °LE RAY, 1969 ; °LE RAY et al., 1973a)
- T. cruzi (SENECA et al., 1966 ; °AFCHAIN et CAPRON, 1969, 1971 ; °BERGENDI et al., 1970 ; OSTMANN et al., 1973)
- T. theileri (SPLITTER et al., 1967)
- L. tropica (°GARCIA, 1965)
- L. mexicana (°CROOK et al., 1969)
- L. donovani (°CLINTON et al., 1972 ; °DWYER, 1973 ; °LE RAY et al., 1976a et b)

b) Les relations entre souches :

- de T. b. brucei (°LE RAY et al., 1971)
- de T. cruzi (°NUSSENZWEIG et al., 1963 ; NUSSENZWEIG et GOBLE, 1966 ; °GONZALEZ-CAPPA et KAGAN, 1969 ; °AFCHAIN et al., 1974)

°Travaux ayant eu recours à l'immunoélectrophorèse.

c) Les affinités

- entre taxons du genre Trypanosoma (°BIGALKE, 1966 ; °OELERICH et MANNWEILER, 1970 ; °BICE et ZELEDON, 1971 ; °LE RAY et al., 1971 ; °LE RAY, 1972 ; °CAPRON et al., 1973 ; °AFCHAIN et al., 1974)
- entre taxons du genre Leishmania (BRAY et LAINSON, 1966 ; SCHNEIDER et HERTIG, 1966 ; °CHAVES, 1970 ; °LE RAY et al., 1976b)
- et entre genres de Trypanosomatidae (°RANQUE J. et al., 1969 ; DE SOUZA et BARBOSA, 1972 ; °AFCHAIN et al., 1973 ; OELERICH, 1973).

d) Les remaniements antigéniques survenant au cours du cycle évolutif de :

- T. b. brucei (°LE RAY et al., 1973a ; °LE RAY, 1975)
- T. b. gambiense (°AFCHAIN et al., 1975a)
- T. lewisi (ENTNER et GONZALES, 1966 ; ENTNER, 1968)
- et L. donovani (°SIMPSON, 1968 ; °DWYER, 1973).

e) Les caractères des antigènes spécifiques du sérotype des trypanosomes Salivaria (antigènes variables). A ce propos, il est peut-être bon de rappeler le mécanisme de survie des trypanosomes Salivaria face à la réponse immunitaire de l'hôte parasité. La variation antigénique se manifeste par le développement successif de populations sérologiquement différentes (FRANKE, 1905). Chaque population induit l'élaboration d'anticorps entraînant sa lyse. Cette réduction de la parasitémie de l'hôte est suivie de la multiplication d'une population nouvelle exprimant un sérotype différent (LEVADITI et MUTERMILCH, 1909 ; EHRLICH, 1909). Les faits les plus significatifs acquis à l'aide des techniques sérologiques d'agglutination et de cytolyse ou de neutralisation sont :

- le nombre apparemment illimité des types antigéniques susceptibles d'être exprimés par une souche donnée (GRAY, 1965a) ;
- la variabilité antigénique des populations résultant d'un clonage (GRAY, 1965a ; MAC NEILLAGE et al., 1969 ; VAN MEIRVENNE et al., 1975b) ;
- l'existence d'une relation entre le type antigénique et la virulence du trypanosome (MAC NEILLAGE et HERBERT, 1968) ;
- et l'éventualité d'une séquence des types antigéniques chez l'hôte vertébré avec un retour à un type antigénique de base dans les glandes salivaires de l'hôte invertébré (GRAY, 1965b, 1969).

°Travaux ayant eu recours à l'immunoélectrophorèse.

Le mécanisme moléculaire de la variation antigénique n'est pas connu. L'hypothèse d'une dérégulation, sous l'induction des anticorps de l'hôte, est actuellement la plus acceptée (INOKI et al., 1956 ; BROWN et WILLIAMSON, 1964 ; GRAY, 1965b ; VICKERMAN, 1969) ; néanmoins, l'éventualité d'une mutation génique est tout aussi vraisemblable (CANTRELL, 1958 ; WATKINS, 1964 ; SEED et GAM, 1966).

Ces antigènes variables, caractérisés par l'existence de deux groupes distincts d'antigènes avec un coefficient de sédimentation de 1S et 4S (BROWN et WILLIAMSON, 1962, 1964 ; WILLIAMSON et BROWN, 1964) seraient des glycoprotéines (ALLSOPP et al., 1971 ; NJOGU et HUMPHRYES, 1972) jouant un rôle important dans l'immunogénicité de l'organisme. Leur étude a été effectuée au niveau des antigènes somatiques, à l'aide des techniques de précipitation en gel, par GRAY, 1961 ; SEED, 1963, 1972 ; °WILLIAMSON et BROWN, 1964 ; MILLER, 1965 ; HUMPHRYES, 1970 ; °NJOGU et HUMPHRYES, 1972 ; °OELERICH et MANNWEILER, 1970, 1972 ; TAKAYANAGI et al., 1970, °1973a ; LANHAM et TAYLOR, 1972 ; °LE RAY et al., 1973a ; °AFCHAIN et al., 1975a.

Le nombre de travaux, effectués en immunoélectrophorèse, montre l'intérêt analytique offert par cette technique. Malheureusement, des lacunes fondamentales dues à un manque d'analyse globale de la structure antigénique, l'absence d'hyperimmunisation efficace et le non-recours, quasi général, aux épreuves d'absorption croisée, empêchent, dans de nombreux travaux, une appréciation définitive de la spécificité ou de l'isologie supportées par les composants révélés.

Ce manque de connaissances fondamentales nous a amené à envisager l'étude immunoélectrophorétique de la structure antigénique, des parentés et des spécificités chez les Trypanosomatidae hétéroxènes.

1.4. L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE

1.4.1. Définition, valeur

Les protéines sont les constituants les plus significatifs d'un organisme vivant car elles sont l'expression relativement directe du génôme.

° Travaux ayant eu recours à l'immunoélectrophorèse.

L'analyse immunoélectrophorétique, en permettant la caractérisation immunochimique des constituants cellulaires solubles, est le moyen par excellence d'appréhender objectivement les parentés et les spécificités de cet organisme.

Les principes et les modalités techniques de l'analyse immunoélectrophorétique ont été décrits par GRABAR et WILLIAMS (1953, 1955), d'après les travaux fondamentaux de OUDIN (1952). La méthode a ensuite été simplifiée et adaptée à des lames porte-objet par SCHEIDEGGER (1955).

L'application de l'analyse immunoélectrophorétique à des organismes entiers a été essentiellement réalisée par l'école lilloise de parasitologie de BIGUET et CAPRON. L'analyse immunoélectrophorétique des champignons et des helminthes a permis d'apporter une contribution fondamentale à la standardisation des extraits antigéniques (BIGUET et al., 1965b), à une meilleure connaissance de la taxonomie et de la phylogénie (BIGUET et al., 1965d ; CAPRON et al., 1968a, 1972). De plus, à l'aide de cette technique, a pu être abordée l'étude des relations hôte-parasite (CAPRON et al., 1968a, 1969) ainsi que l'application diagnostique (BIGUET et al., 1964 ; CAPRON et al., 1966 ; 1968b).

L'analyse immunoélectrophorétique permet la visualisation de substances solubles immunogènes dans un extrait cellulaire. Chaque arc de précipitation représente une famille de protéines dont certains sites antigéniques sont communs et d'autres distincts. Ces composants antigéniques sont définis selon leur vitesse de migration électrophorétique et leur coefficient de diffusion. Quant à la spécificité immunologique, elle est déterminée par les sites antigéniques.

Ainsi, l'immunoélectrophorèse se présente comme une méthode d'investigation moléculaire de valeur génétique, au même titre que l'analyse des acides nucléiques et des isoenzymes. Contrairement aux méthodes sérologiques, elle permet d'objectiver directement les composants antigéniques impliqués dans la réponse antigène-anticorps.

1.4.2. Ses limites

Les méthodes d'immunoprécipitation (double diffusion et immunoélectrophorèse) et d'électrophorèse, réalisées à partir d'extraits solubles dans des solutions salines ou tamponnées, limitent l'investigation aux composants solubles d'un organisme et préservent tout l'intérêt qui s'attache aux méthodes

d'agglutination, de lyse ou d'immunofluorescence. Néanmoins tout au long de cette étude, l'analyse des composants solubles apparait significative de l'espèce considérée. De plus, dans le présent travail, mené à l'aide d'hyperimmunsérum anti-composants solubles, seront effectuées des caractérisations d'antigènes de surface. La distinction entre antigènes somatiques solubles et antigènes insolubles de surface n'a pas encore été bien délimitée. Il est possible que l'analyse des constituants solubles d'un organisme, par immunoélectrophorèse, nous donne accès à certains antigènes de surface. En effet, avant d'être insolubilisés, ces antigènes doivent exister dans le soma soit à l'état soluble, soit sous forme de précurseur.

Toutefois, nous ne pouvons prétendre analyser l'ensemble des constituants antigéniques, même solubles, par la seule méthode de l'immunoélectrophorèse. Elle ne révèle en général qu'une trentaine de composants antigéniques alors que l'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle permet d'en déceler une soixantaine. Néanmoins, cette dernière méthode est d'une manipulation plus délicate et ses résultats lors de l'étude des spécificités et des parentés antigéniques sont exactement proportionnels à ceux de l'immunoélectrophorèse simplé. En effet, une étude récente sur divers champignons pathogènes (YARZABAL et al., 1976) a montré le même rapport entre les composants communs et les composants spécifiques d'une espèce, quelle que soit la méthode envisagée.

L'analyse immunoélectrophorétique, essentiellement qualitative, ne permet d'établir que des différences absolues de spécificité antigénique ; néanmoins, l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle permet de pallier cet inconvénient. L'immunoélectrophorèse n'est en fait qu'une méthode immunochimique, et dans le cas, par exemple, de l'analyse de rejet de greffe, elle n'apporte aucun renseignement immunologique. Par contre, dans de nombreuses parasitoses, l'existence d'anticorps précipitants lors des infections expérimentales et naturelles a fait de l'immunoélectrophorèse une méthode immunologique.

Dans une réponse humorale, les anticorps précipitants ne sont qu'une infime partie de la réaction de l'hôte à l'immunisation ou à l'infection. Notre connaissance de l'antigénicité reste ainsi limitée aux seuls composants solubles suscitant des anticorps précipitants lors de l'immunisation de lapins ou d'infections expérimentales.

Une seconde limite à notre analyse réside dans les conditions expérimentales d'immunisation. En effet lors d'immunisations de lapins, nous n'avons accès qu'aux seuls anticorps précipitants suscités par les antigènes reconnus comme "non self" par le lapin. Il est permis de penser que certains

antigènes non reconnus par le lapin, soit par un manque d'information de reconnaissance, soit en raison de dose d'antigène trop forte ou beaucoup trop faible, puissent être reconnus par d'autres systèmes révélateurs tels que la chèvre, le mouton ou le cheval. Nous n'avons aucun argument pour nier une telle hypothèse ; cependant, si de tels phénomènes existent, ils ne peuvent être que limités.

Enfin, la plupart des immunisations expérimentales s'effectuent en présence d'adjuvant de Freund complet. Cet adjuvant apparaît comme l'un des meilleurs pour la révélation des anticorps précipitants. Néanmoins, la notion complexe d'immunogénicité d'un antigène est fonction de sa nature thymodépendante ou non-dépendante. C'est ainsi que l'emploi de nouveaux adjuvants ("Water-soluble-adjuvant") pourrait peut-être démasquer certains antigènes non révélables dans notre système expérimental.

Compte-tenu de ces limites inhérentes aux imperfections de la technique mise en oeuvre, les résultats obtenus dans ce travail ne prendront en compte que les seuls antigènes solubles analysés et révélés par l'immunoélectrophorèse grâce aux anticorps précipitants préparés chez le lapin à l'aide d'adjuvant de Freund complet. Néanmoins, ces résultats nous apparaissent significatifs au vu des nombreuses corrélations observées entre les sérums d'immunisation expérimentale et les sérums d'infection naturelle.

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES

La connaissance du caractère antigénique des Trypanosomatidés hétéroxènes parasites de l'homme dépend de la conduite rigoureuse des techniques de précipitation en gel (double diffusion, immunoélectrophorèse, immunoélectrophorèse bidimensionnelle), techniques nécessitant au préalable :

- une connaissance précise et détaillée de l'historique des souches des parasites maintenus in vitro et in vivo ;
- l'obtention des parasites en masse ;
- la préparation standardisée des extraits antigéniques ;
- une immunisation correcte des lapins.

La purification des antigènes spécifiques de ces trypanosomes, nécessitait le recours aux techniques biochimiques et immunochimiques. Quant à la localisation en surface de ces antigènes spécifiques, nous avons dû faire appel aux méthodes d'immunofluorescence et de marquage enzymologique appliqué à la microscopie optique et électronique.

2.1. SOUCHES

Les souches utilisées proviennent en majeure partie des collections constituées à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (ITMA) par le département de Protozoologie du Professeur J.B. JADIN (ITMAP).

2.1.1. Genre Trypanosoma - Section Stercoraria

- * et ** 1. Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi Tehuantepec, souche isolée en 1938 par E. BRUMPT à partir de Triatoma sp. trouvés infectés naturellement dans la région de Tehuantepec, Mexique (DARMAN, 1941). Maintenu en culture in vitro depuis 1959 au Service de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris, cette souche nous a été communiquée par l'ITMAP en 1967.

* Souche maintenue in vitro

** Souche maintenue in vivo

- * 2. Trypanosoma (S.) cruzi ITMAP 943 ; Souche isolée au jardin Zoologique d'Anvers en 1973 à partir d'un singe Aotus provenant du Brésil.
- * 3. Trypanosoma (S.) cruzi E.C.H. ; Souche isolée in vitro, en 1973, par le Docteur E. SEGURA à partir d'un cas humain argentin.
- ** 4. Trypanosoma (S.) cruzi Tulahuen ; Souche isolée en 1945 à partir de Triatoma infestans à Tulahuen, Chili (Nord) (GALLIARD et al., 1962). Cette souche, très virulente pour la souris, nous a été adressée sur souris par le Professeur LAPIERRE en 1967.
- * 5. Trypanosoma (S.) dionisii P₃ ; Isolée en Angleterre à partir de chauve-souris Pipistrellus (BAKER, 1972).
- * 6. Trypanosoma (S.) dionisii ITMAP-JMJ ; Isolée en Belgique à partir de chauve-souris Pipistrellus, en 1958.
- * 7. Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli RGB ; Souche isolée in vitro en 1949, à partir d'un chien par PIFANO, (HERBIG-SANDREUTER, 1957).

2.1.2. Genre Trypanosoma - Section Salivaria

- * et ** 8. Trypanosoma (Trypanozoon) brucei brucei EATRO 1125 ; Isolée en Uganda en 1966 à partir d'une antilope Tragelaphus ; non pathogène pour l'homme (pas de parasitémie suivant l'injection à un volontaire humain -A.J. WILSON, in litt.-).

La souche entretenue in vivo est le point de départ de deux lignées antigéniquement distinctes, clônées, sérotypées par épreuve de trypanolyse, et maintenues par congélation ou par subinoculation tous les 2 à 3 jours (LE RAY, 1975). Les sérotypes, exprimés par ces lignées, représentent respectivement les types antigéniques désignés suivant la nomenclature proposée par LUMSDEN et al. (1967) :

- AnTat-1 (Antwerpen Trypanozoon antigenic type-1)
- et AnTat-2

- * 9. Trypanosoma (T.) brucei rhodesiense EATRO 906 ; Souche isolée d'un zébu (Bos indicus) et infectante pour l'homme (EATRO 1967).

* Souche maintenue in vitro

** Souche maintenue in vivo

* et ** 10. Trypanosoma (T.) brucei gambiense ELIANE ; Souche isolée en 1952 à Paris par M. VAUCEL à partir d'une patiente contaminée en Côte d'Ivoire ; maintenue in vivo et cultivée in vitro dès 1953 par COLAS-BELCOUR, elle nous a été communiquée par l'ITMAP, en 1971, in vitro et in vivo.

Le stabiliat de référence (formes sanguicoles) est le point de départ de deux lignées antigéniquement distinctes, isolées au cours de l'infection mécanique d'un lapin. Ces deux populations ont été clônées à partir de micro-gouttes ne contenant qu'un seul organisme à l'examen microscopique sous huile de paraffine, selon la technique de WALKER (1970). Les deux populations ont été sérotypées à l'aide des épreuves de trypanolyse et d'immunofluorescence indirecte spécifiques de variant (VAN MEIRVENNE et MAGNUS, communication personnelle) selon les techniques de VAN MEIRVENNE et al. (1975a). Ces deux populations, maintenues par congélation dans l'azote liquide ou par subinoculations tous les 2 jours sur rat, représentent respectivement les types antigéniques LiTat-1 et LiTat-2, désignés suivant la nomenclature conventionnelle de IUMSDEN et al. (1967) : (Lille Trypanozoon antigenic type).

Le tableau II résume, dès l'arrivée de la souche à Lille en 1971, l'historique de ces deux lignées : LiTat-1 (antigène T.g S P1) et LiTat-2 (antigène T.g S P2).

2.1.3. Genre Leishmania (toutes les souches de ce genre proviennent de l'ITMAP, Anvers)

■ Groupe des Leishmania humaines de l'Ancien Monde (complexe donovani-tropica)

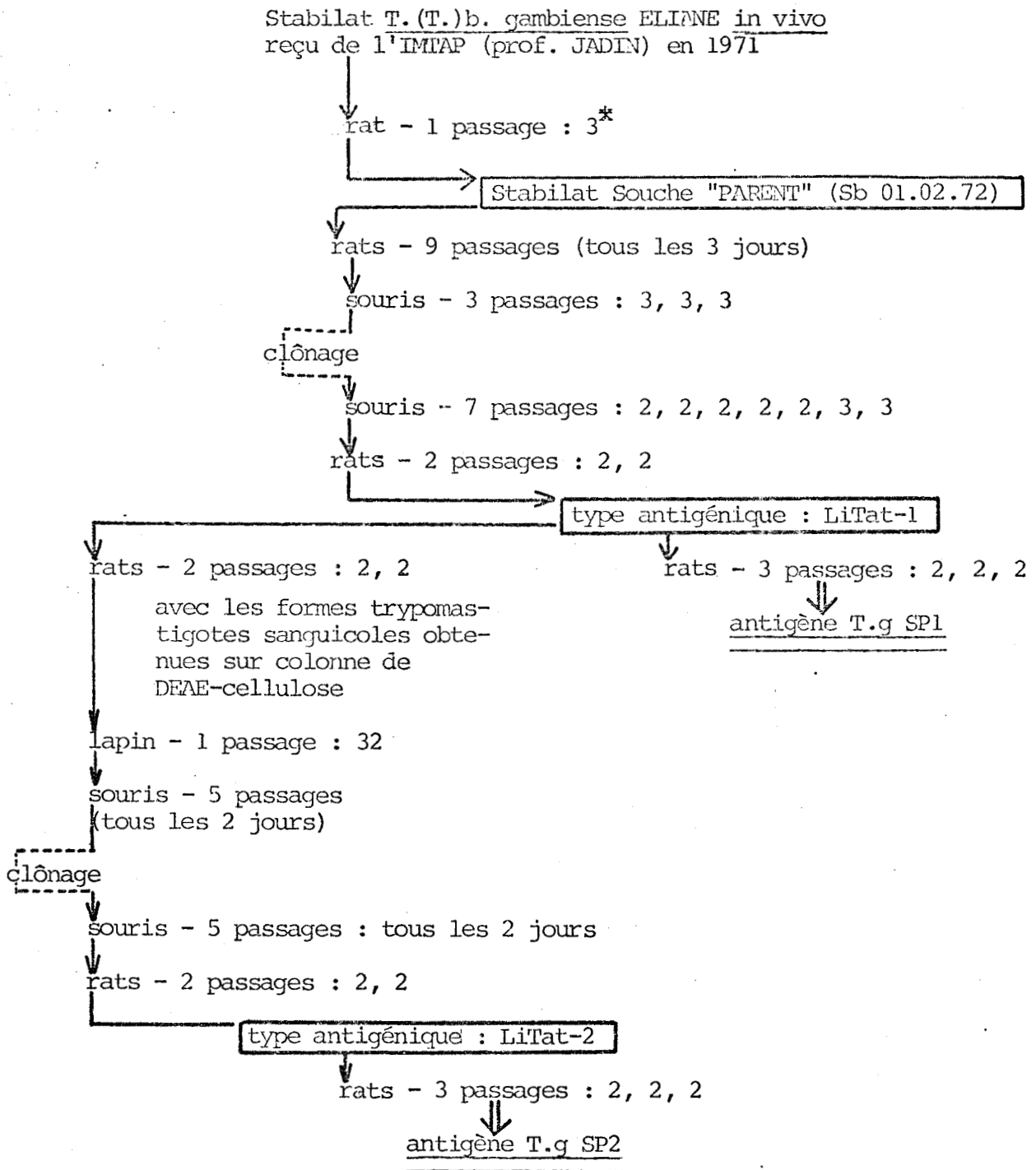
* et ** 11. Leishmania donovani ITMAP K 263 ; Souche isolée en Belgique en 1967, à partir d'un enfant marocain de 2 ans. L'inoculation du liquide de ponction sternale à des hamsters s'est révélée positive.

* Souche maintenue in vitro

** Souche maintenue in vivo

Tableau II : Historique, dès son arrivée à Lille en 1971, de la souche *T. gambiense* ELIANE *in vivo*, ayant abouti après clonage à l'isolement des types antigéniques LiTat-1 et LiTat-2.

Signes conventionnels suivant LUMSDEN *et al.* (1973).



* subinoculation effectuée au 3ème jour.

- * 12. Leishmania donovani TUNIS ; Souche isolée en Tunisie d'un cas humain et entretenue par COLAS-BELCOUR, reçue à l'ITMAP en 1965.
- * 13. Leishmania tropica forme minor D ; Souche isolée, en 1957, par le Professeur VANBREUSEGHEM d'un patient revenant d'Iran.

■ Groupe des Leishmania humaines d'Amérique Latine

- * 14. Leishmania mexicana mexicana LONDON-L 11 ; Souche isolée aux Honduras à partir d'un cas humain.

■ Leishmaniose animale

- * 15. Leishmania enrietti ; Souche isolée au Brésil à partir d'un Cavia (Cobaye) ; entretenue à l'Institut Pasteur de Paris, elle a été reçue à l'ITMAP sur cobaye en 1953.

■ Groupe des Leishmania de Reptiles africains

- * 16. Leishmania adleri LRC-L 123 ; Souche isolée au Kenya à partir d'un lézard Latastia longicauda revoili par HEISCH en 1954. Injectée à des hamsters par ADLER, cette souche a été réisolée de la rate d'un hamster en 1956. Elle a été communiquée à l'ITMAP par la cryobanque de la London School of Tropical Medicine and Hygiene.
- * 17. Leishmania tarentolae senegalensis G 10 ; Souche isolée par RANQUE au Sénégal à partir d'un Tarentola annularis en 1967 (RANQUE, 1973).

2.2. OBTENTION DES PARASITES

Le choix d'un milieu de culture in vitro ou d'une méthode d'obtention des flagellés in vivo est d'une importance capitale pour des études immunologiques ayant recours à l'immunoélectrophorèse. En effet, les techniques de précipitation en gel ont l'inconvénient de consommer des quantités importantes d'extrait antigénique soluble. C'est pourquoi la récolte des organismes a dû se réaliser d'une façon massive.

* Souche maintenue in vitro

L'obtention des formes sanguicoles des trypanosomes *Salivaria*, longtemps difficile car nécessitant le recours à la centrifugation différentielle puis à des agents lysant ou agglutinant les globules rouges de l'hôte, a fait récemment l'objet d'une solution d'une efficacité remarquable par l'emploi de la chromatographie d'adsorption sur résine échangeuse d'anions : DEAE-cellulose (LANHAM, 1968 ; LANHAM et GODFREY, 1970)

Si l'efficacité de cette méthode est actuellement incontestable, le choix d'un milieu de culture in vitro, favorable à l'ensemble des Trypanosomatidae hétéroxènes, est plus délicat. Nous ne passerons pas en revue l'ensemble de ces milieux, qui sont de trois sortes : diphasiques, monophasiques et cultures sur cellules ; TAYLOR et BAKER (1968) en ont fait une excellente analyse.

Notre choix s'est porté sur le milieu G.L.S.H. initialement décrit par JADIN et PIERREUX (1960), légèrement modifié par JADIN et LE RAY (1969) pour la culture de l'ensemble des Trypanosomatidés. Ce milieu présente :

- l'avantage d'une récolte simple des organismes par centrifugation (milieu monophasique liquide sans éléments cellulaires tel que des globules rouges) ;
- l'inconvénient d'être rendu très immunogène par la présence de sérum de veau ; cependant, les réactions immunologiques intéressant les contaminants sériques sont aisément supprimées à l'aide des épreuves d'absorption. Par ailleurs, ces inconvénients sont nettement compensés par une remarquable multiplication en masse de l'ensemble des Trypanosomatidés dans ce type de milieu.

2.2.1. Culture in vitro

● La culture des trypanosomes nécessite, comme pour les cultures de tissus, l'emploi d'une verrerie parfaitement lavée, rincée à l'eau distillée puis stérilisée.

Le milieu de culture G.L.S.H. (glucose, lactalbumine hydrolysée, sérum, hémoglobine) demande la préparation préalable de l'hémoglobine provenant d'un extrait globulaire de boeuf (Bacto Beef Blood, Difco). Cette solution à 3 pour cent en eau bidistillée, portée à l'ébullition 1/4 d'heure, est centrifugée à basse vitesse (1500 rpm pendant 10 minutes), filtrée sur papier filtre ordinaire, autoclavée puis stockée à 4°C.

Le milieu de culture se compose :

a) de la solution de Hanks :

Eau bidistillée	750 ml		
NaCl	8,00 g		$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,15 g
KCl	0,40 g		KH_2PO_4 0,06 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 g		NaHCO_3 0,98 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g		glucose 1,00 g

b) additionnée de

lactalbumine (hydrolysate)	3,00 g
sérum de veau	100 ml
hémoglobine (solution stock)	150 ml
Pénicilline G	200.000unités
Streptomycine (Sulfate)	100.000 µg

Le pH est ajusté à 7,4 avec NaOH ou HCl 0,1 N. La filtration stérilisante s'effectue sous pression, sur membranes d'acétate de cellulose (Sartorius ou Millipore) à l'aide d'une série de filtres de porosité décroissante 3,0 - 1,2 - 0,45 - 0,22 microns avec préfiltres intercalaires en fibres de verre.

Le milieu stérile peut se conserver pendant 6 mois à 4°C.

● L'entretien des souches en routine est réalisé en veinotubes (B.D.) contenant 3 ml de milieu de culture. Les subcultures ont lieu régulièrement 1 ou 2 fois par semaine selon les souches. En vue d'une culture massive, il est souhaitable d'exalter la souche en veinotube en la repiquant tous les deux jours.

● Les cultures massives, en flacons de 1000 ml contenant 200 ml de milieu de culture, demandent d'abord l'entretien régulier de la souche, exaltée préalablement en veinotubes, dans des flacons de 250 ml contenant 40 ml de milieu. L'ensemencement des flacons contenant 40 ml de milieu s'effectue à partir de quelques veinotubes ; celui des flacons contenant 200 ml de milieu se faisant avec les 40 ml de cette culture très riche et exaltée.

Quand la culture massive atteint son développement maximal, il est alors possible d'ensemencer directement 4 flacons de 200 ml à l'aide d'un seul.

Après une période variable de culture à 28°C (4 à 8 jours selon les espèces), la récolte permet l'obtention d'une quantité importante de flagellés. Le rendement varie selon les espèces, mais il est en moyenne de l'ordre de 1 gramme de corps cellulaires entiers (poids humide) par litre de milieu. L'emploi de sérum de veau foetal permet une meilleure constance de multiplication d'où des rendements accrus mais n'est pas indispensable à la culture massive des Trypanosomatidae.

Du point de vue morphologique et biologique, les formes de culture sont l'équivalent de celles de l'hôte intermédiaire, à savoir :

- trypanosomes Stercoraria : les formes épimastigotes et les formes micromastigotes ;
- trypanosomes Salivaria : les formes trypomastigotes non salivaires de l'hôte intermédiaire Glossina ;
- Leishmania : les formes promastigotes.

2.2.2. Formes sanguicoles

L'obtention des formes sanguicoles procède par élution sur colonne de DEAE-cellulose (LANHAM, 1968 ; LANHAM et GODFREY, 1970 ; modifications techniques apportées par VAN MEIRVENNE et al., 1973a).

● Principe. La charge superficielle des cellules parasitaires présente une électronégativité inférieure à celle des éléments sanguins de l'hôte aux pH 6 à 9. En présence d'une solution tampon de pH et de force ionique adéquats, un gel de DEAE-cellulose chargé positivement retient tous les éléments sanguins figurés de l'hôte alors que la solution d'exclusion entraîne les trypanosomes.

● Méthode. L'étude des formes sanguicoles de T. gambiense et T. brucei a été effectuée à partir de populations clônées, de type antigénique déterminé, par subinoculation tous les 2 jours de rats Wistar d'environ 180 g.

Le sang parasité a été prélevé par ponction cardiaque sur anticoagulant (héparine) puis injecté par voie intrapéritonéale à de nouveaux rats. Une dizaine de rats massivement parasités sont anesthésiés, par injection de 1 ml d'un mélange de Nembutal et d'héparine (2 volumes de Nembutal pour 3 volumes d'héparine), puis sont exsanguinés par ponction cardiaque. Les sangs de ces dix rats sont rassemblés et leur volume est mélangé à cinq volumes d'une suspension équilibrée de gel de DEAE-cellulose (type DE-52, Whatman Chromedia) (modification apportée par VAN MEIRVENNE et al., 1973a). Le mélange est placé dans une colonne en verre (\emptyset 10 cm, hauteur 15 cm, munie d'un filtre en verre frité de porosité n°1, c'est-à-dire 90 à 150 microns) préalablement rempli par 200 ml de gel neuf.

Le mélange est élué à température ambiante par une solution tamponnée glucosée de pH 8,0 et de f.i. 0,22 (solution PSG, LANHAM, 1968).

Le rendement varie selon la parasitémie des rats, mais il est en moyenne de l'ordre de 70 mg de corps cellulaires entiers (poids-humide) par rat.

2.3. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES

La préparation des extraits antigéniques hydrosolubles sous forme lyophilisée demande, au préalable, la récolte des organismes et leur lavage afin d'éliminer les contaminants sériques provenant du milieu de culture ou de l'hôte.

2.3.1. Récolte des organismes multipliés *in vitro* et *in vivo*

Que ce soit lors de la récolte des formes de culture ou celle des formes sanguicoles, le milieu de culture ou la solution d'exclusion de la colonne de DEAE-cellulose est homogénéisé puis centrifugé dans des pots de 1000 ml à 2.800trmn (2000g) pendant 15 minutes. Nous éliminons alors le surnageant par aspiration sous vide ; les culots, réunis dans un seul pot de centrifugation, sont lavés dans 200 ml de la solution saline glucosée de Hanks (HANKS et WALLACE, 1949) pour les formes de culture ou dans la solution tampon PSG pour les formes sanguicoles. Il est ainsi effectué 2 lavages pour les formes sanguicoles et 4 pour les formes de culture, par centrifugation à 2000 g pendant 15 minutes. Pour réduire la lyse spontanée des flagellés, les solutions de lavage sont réfrigérées à 4°C.

Les formes sanguicoles ou de culture, débarrassées ainsi des protéines sériques du milieu ou de l'hôte, sont additionnées d'une solution de NaCl à 1‰ (1g/litre d'H₂O distillée), à raison de 10 ml de cette solution pour 1 gramme (poids humide) de flagellés. Cette suspension est ensuite congelée à -70°C puis stockée à -20°C.

2.3.2. Préparation d'extraits antigéniques hydrosolubles

L'extraction antigénique concerne au minimum 6 grammes (en poids humide) de flagellés. Les suspensions d'organismes en NaCl 1‰ sont décongelées puis placées dans un mortier en porcelaine de contenance d'environ 2 litres. Le mélange, congelé à -20°C dans le mortier, est ensuite broyé manuellement au pilon jusqu'à liquéfaction presque totale. Il est ainsi procédé à 4 broyages au mortier glace. Après le dernier broyage, la solution est centrifugée à 26 000 g, pendant une heure à 4°C. Le surnageant est dialysé 20 heures environ contre de l'eau distillée (100 volumes d'eau distillée pour un volume de la solution à dialyser). L'extrait antigénique hydrosoluble est lyophilisé dans des flacons type plasma de 500 ml à large ouverture. Le lyophilisat est ensuite réparti à raison de 20 à 30 mg dans des petits flacons type pénicilline. Ces derniers sont placés dans un petit lyophilisateur (Usifroid, microsublimateur type MSD). Le vide le plus poussé possible est obtenu puis cassé par de l'azote U, puis les flacons sont bouchés automatiquement dans l'enceinte même du lyophilisateur.

La conservation à -20°C d'extraits antigéniques sous atmosphère d'azote ne nous a pas permis d'observer d'altération de leur qualité antigénique après deux années de conservation ; par contre ces mêmes extraits conservés sous air en flacons bouchés à la température du laboratoire s'altèrent rapidement en 3 à 4 mois.

2.4. PREPARATIONS DES IMMUNSERUMS

A partir d'extraits antigéniques hydrosolubles ou d'extraits totaux, nous avons préparé trois sortes d'immunsérums à l'aide de deux techniques d'immunisation :

- la technique classique par voie sous-scapulaire pour l'obtention d'hyperimmunsérums (HIS) les plus riches possibles en anticorps précipitants et des immunsérums de "cinétique" afin d'observer l'apparition des anticorps précipitants déterminés par les composants antigéniques les plus immunogènes ;

- la technique d'injections intradermiques décrite par VAITUKAITIS et al. (1971) permettant d'utiliser des doses minimales d'antigène.

Toutes les immunisations expérimentales s'effectuent chez des lapins adultes ordinaires pesant un minimum de 3 Kg. Le prélèvement de sang se réalise à la veine marginale de l'oreille du lapin par un dispositif de saignée sous vide.

2.4.1. Méthode classique par voie sous-scapulaire

- Pour une hyperimmunisation, cette méthode consiste à injecter chaque semaine 2 mg d'antigène dissous dans 0,5 ml d'eau physiologique et incorporé dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet (Difco). Le mélange, bien émulsionné, est injecté par voie trans-musculaire dans l'espace sous-scapulaire. Les injections antigéniques restent hebdomadaires, les lapins sont régulièrement saignés tous les 15 jours dès la 5ème semaine d'immunisation. L'obtention des hyperimmunsérums est réalisée en moyenne entre le 3ème et le 4ème mois d'immunisation.

- Dans le cas d'une immunisation "cinétique", 0,5 ml d'une suspension d'organismes broyés ou de jus cellulaire après le 4ème broyage au mortier glace, est injecté, chaque semaine, sans adjuvant de Freund dans l'espace sous-scapulaire. Les prélèvements sanguins s'effectuent tous les 8 jours dès la première semaine d'immunisation.

2.4.2. Méthode de VAITUKAITIS et al.

L'intérêt de cette méthode est de permettre d'obtenir rapidement, dans un délai d'un mois et demi, des immunsérums à l'aide d'une seule dose immunisante en quantité minimale (1 à 2 mg d'extrait antigénique). Cette méthode est de choix pour le contrôle de pureté des antigènes purifiés par immunoadsorption et pour l'obtention de sérums monospécifiques à partir d'un arc découpé dans la gélose. Par contre, elle n'est pas à conseiller pour l'obtention d'hyperimmunsérums dans un but de comparaisons immunostructurales car la carte antigénique, révélée par ces immunsérums, ne concerne "au plus" qu'environ la moitié des composants révélés par les hyperimmunsérums.

Les lapins sont rasés sur le dos et les flancs la veille de l'injection immunisante. Le mélange d'immunisation est préparé extemporanément de la manière suivante :

- 2 mg d'antigène lyophilisé ou leur équivalent en pourcentage d'azote
- + 1 ml d'eau physiologique
- + 2 ml d'adjuvant de Freund incomplet (Difco)
- + 5 mg de Mycobacterium butyricum (Difco)

L'ensemble du mélange, après émulsion, est administré en 40 injections intradermiques de 0,05 ml dans la zone rasée du dos du lapin.

Simultanément, 1 ml de vaccin coquelucheux adsorbé (Perthydral, Institut Pasteur) est injecté par voie intramusculaire dans la cuisse du lapin.

Les lapins sont saignés tous les 8 jours. Dès l'obtention du sérum désiré, ils sont exsanguinés afin d'obtenir le maximum d'antisérum pour les techniques immunochimiques d'immunoabsorption et les contrôles de spécificité en immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

Cette même méthode d'immunisation a été utilisée pour injecter des arcs de précipitation antigène-anticorps obtenus en macro-immunoélectrophorèse ou en immunoélectrophorèse bidimensionnelle ; l'arc découpé dans la gélose, additionné de 1 ml d'eau physiologique, est broyé au mortier, puis est mélangé à 2 ml d'adjuvant de Freund incomplet et de 5 mg de Mycobacterium butyricum.

Le délai d'obtention des immunosérums est de 3 à 6 semaines. Si la réponse anticorpale est négative ou trop faible, un rappel par voie sous-scapulaire est effectué après un délai de 6 semaines.

2.5. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

La technique immunologique de base de notre travail est l'analyse immunoélectrophorétique. Les immunoélectrophorèses (I.E.P.) ont été pratiquées :

- en microméthode pour toutes les épreuves d'orientation, par souci d'économie des extraits antigéniques et des immunosérums ;
- en macrométhode pour les épreuves définitives de démonstration, en raison de la commodité de lecture et surtout du plus grand pouvoir résolutif.

La majeure partie des résultats obtenus en immunoélectrophorèse n'ont pu être interprétés qu'avec l'apport de la double diffusion en gel (D.D.G.) en raison de sa plus grande sensibilité, ainsi qu'avec l'apport des épreuves d'absorption croisée réalisées en milieu liquide.

La caractérisation, l'obtention et la localisation des antigènes spécifiques ont été réalisées à l'aide des techniques de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle, l'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) et les techniques de marquage enzymologique à la peroxydase.

2.5.1. Précipitation en gel

Les techniques de précipitation en gel (double diffusion d'Ouchterlony : D.D.G., immunoélectrophorèse : I.E.P., immunoélectrophorèse bidimensionnelle) sont des méthodes fines et élégantes d'analyse des composants antigéniques d'une solution.

L'immunoélectrophorèse, mise au point pour l'étude des protéines sériques par GRABAR et WILLIAMS (1953), modifiée en microméthode pour des lames porte-objet par SCHEIDEGGER (1955), fut adaptée, par le laboratoire de Parasitologie de Lille, à l'étude des antigènes parasitaires dans un but analytique et diagnostique.

Les analyses immunoélectrophorétiques des antigènes parasitaires, d'abord réalisées en gélose, ont bénéficié d'une plus grande sensibilité qualitative grâce à l'emploi des gels d'agarose.

Le gel d'agarose se prépare extemporanément en dissolvant 1 gr d'agarose (Indubiose-A37 . Industrie Biologique Française, Gennevilliers) dans 100 ml d'une solution tamponnée de véronal sodé à pH 8,2 : (160 g de véronal sodé (barbital sodique) dissous dans 4 litres d'H₂O désionisée + 220 ml d'HCl 1N + Eau désionisée qsp 10 litres).

Le mélange est porté à 85°C - 90°C dans un bain-marie pendant 20 mn, en homogénéisant de temps en temps. Ensuite, le gel d'agarose est coulé sur des lames de verre dégraissées, de dimension bien définie pour chaque type de précipitation.

2.5.1.1. Double diffusion en gel (D.D.G.)

● Principe. Nous utilisons la technique d'OUCHTERLONY (1958) suivant les modifications préconisées par ABELEV (1960). Elle a comme principe, la diffusion de l'antigène et de l'antisérum, l'un vers l'autre, dans le gel d'agarose. Au point d'équivalence (d'équilibre) antigène-anticorps, chaque composant antigénique, se complexant avec l'anticorps précipitant correspondant, va provoquer la formation d'un précipité blanchâtre présentant l'aspect d'une ligne plus ou moins incurvée (figure 5).

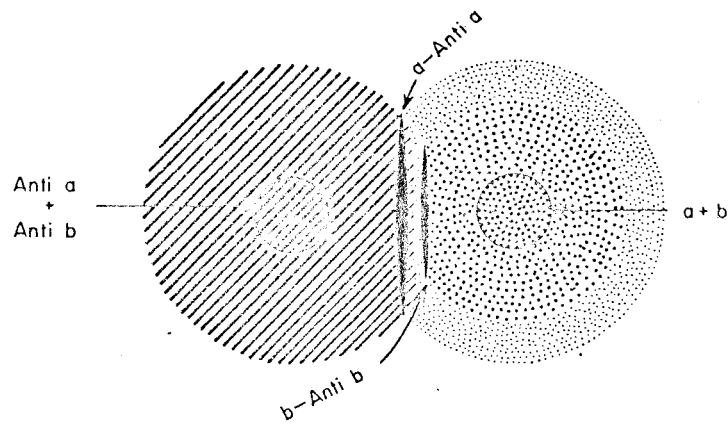
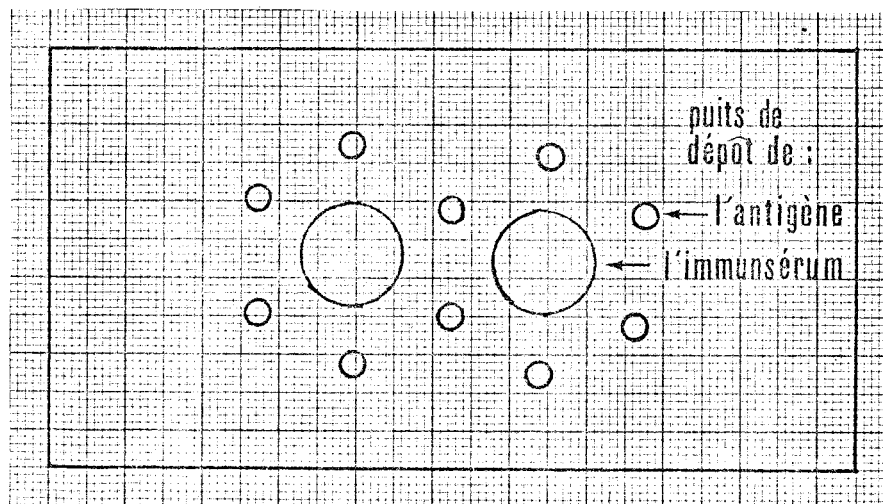


Figure 5 : Diagramme d'après WILLIAMS et CHASE (1971) illustrant la formation de deux arcs de précipitation en double diffusion en gel, méthode d'OUCHTERLONY. La diffusion des antigènes est représentée par des points, celle des anticorps par des lignes.

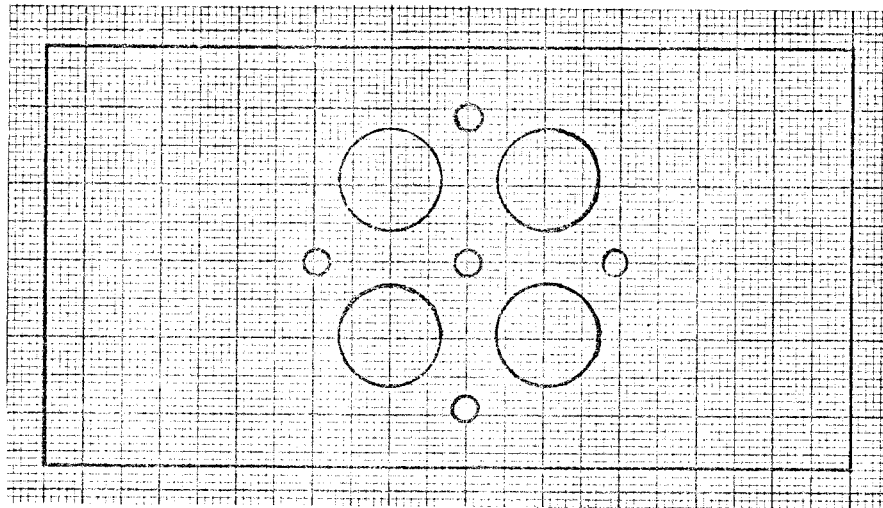
● Méthode. Nous indiquons ci-dessous les diagrammes à l'échelle millimétrique des différentes sortes de lames utilisées pour la double diffusion en gel.

+ Macrométhode

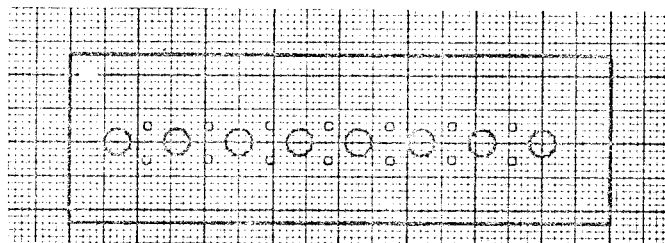
- Analyse de plusieurs extraits antigéniques à l'aide d'un même immun-sérum.



- Analyse d'un extrait antigénique à l'aide de plusieurs immunsérums.



+ Microméthode (pour déterminer la dose d'épuisement à utiliser lors d'une absorption croisée).



* Tableau récapitulatif des données méthodologiques de la double diffusion en gel.

Méthode	Dimensions des lames utilisées	Volume d'agarose (1%) coulée sur les lames	Volume d'immunsérum non concentré par puits	Poids d'antigène et volume du puits de dépôt
macro-D.D.G.	10,5cmx5,5cm	11,5 ml	0,25 ml	2 mg dans 30 μ l
micro-D.D.G.	8cm x 2,5cm	4 ml	30 μ l	12 μ g dans 3 μ l

2.5.1.2. Immunoélectrophorèse (I.E.P.)

● Principe. Un composant antigénique se caractérise par sa mobilité électrophorétique (propriété électrochimique) d'une part et par sa spécificité immunochimique (propriété structurale) d'autre part.

L'immunoélectrophorèse fait appel par définition à ces deux propriétés nettement distinctes à savoir dans un premier temps, une électrophorèse de l'extrait antigénique à analyser et dans un deuxième temps, une double diffusion antigène-anticorps (figure 6). Dans leur traité, en 1964, GRABAR et BURTIN détaillent avec précision le principe et les différentes applications de l'analyse immunoélectrophorétique.

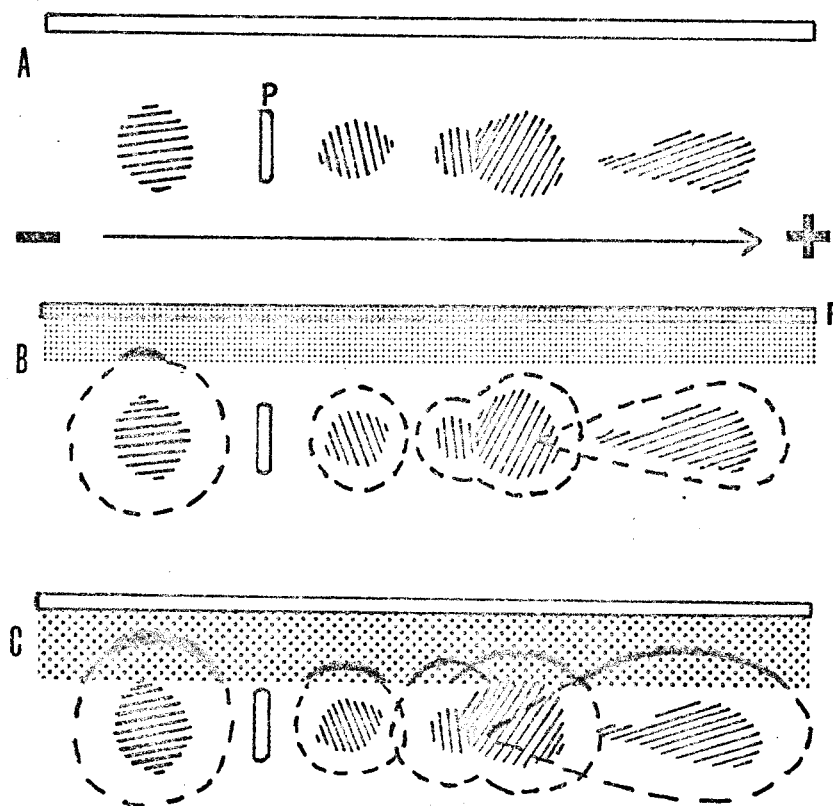


Figure 6 : Diagramme schématique du principe de l'immunoélectrophorèse.

A - L'extrait antigénique à analyser, déposé dans le puits de dépôt (P), est soumis à un champ électrique ; ceci a pour résultat de séparer les composants, suivant leurs charges, le long de l'axe de migration.

B - L'immunosérum est déposé dans une fente parallèle à l'axe de migration (F). En diffusant dans le gel, les anticorps et les antigènes réagissent en formant des arcs de précipitation spécifiques (C).

Il est important de souligner dès maintenant qu'un arc de précipitation représente, dans l'extrait antigénique, non pas un antigène mais bien une famille de protéines ayant des sites immunologiques identiques ou partiellement identiques.

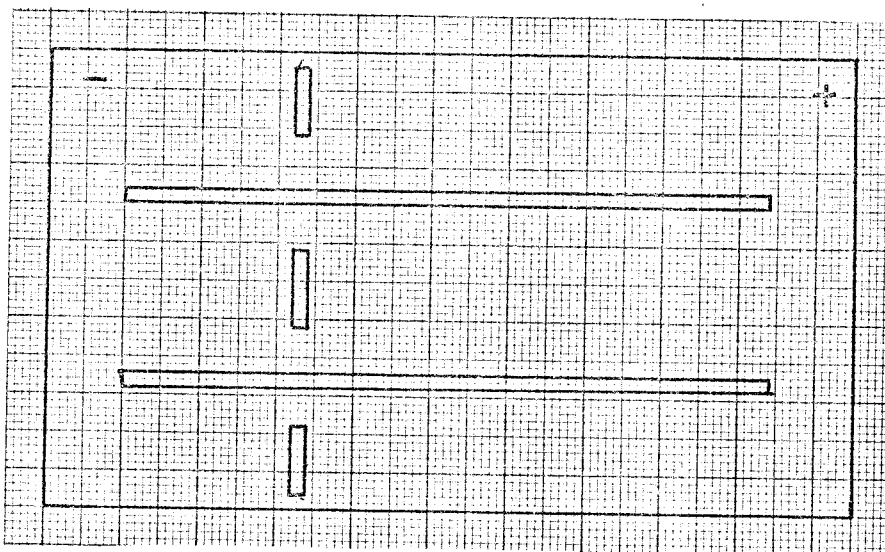
● Méthode.

L'analyse d'un extrait antigénique peut se réaliser :

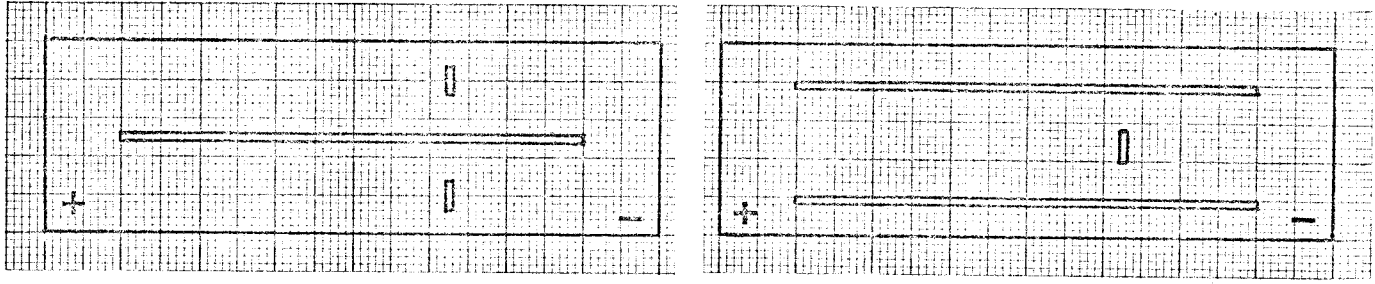
- soit en macrométhode en raison de sa plus grande résolution et de la commodité lors de la lecture ;
- soit en microméthode pour des raisons d'économie aussi bien d'antigène que d'immunsérum.

* Nous indiquons ci-dessous les diagrammes à échelle millimétrique des différentes sortes de lames utilisées pour l'analyse immunoélectrophorétique.

+ Macrométhode



+ Microméthode



* Tableau récapitulatif des données méthodologiques de l'I.F.P. en agarose.

Méthode	Dimensions des lames utilisées	Volume d'antigène	Poids	Voltagage	d'immun- serum (concentré)	de la lame durant	de dépôt	de puits	les lames	coulée sur	d'agarose (1%)	et volume	aux bornes	de la lame	durant	au tiers
micro-IRP	2,5 cm x 8 cm	4 ml	1 mg	20 volts	pendant 2 h 30	0,3 ml	15 µl	1 mg	20 volts	pendant 2 h 30	0,3 ml	15 µl	1 mg	20 volts	pendant 2 h 30	0,3 ml
macro-IRP	10,5 cm x 6 cm	11,45 ml	5 mg	20 volts	pendant 5 heures	0,9 ml	50 µl	5 mg	20 volts	pendant 5 heures	0,9 ml	50 µl	5 mg	20 volts	pendant 5 heures	0,9 ml

* Lavages, déminéralisation et coloration des lames

- Après la diffusion (le 1er jour à la température ambiante puis à 4°C deux jours pour la macrométhode et un jour pour la microméthode), les lames sont plongées pendant 3 à 15 heures dans une solution de citrate trisodique à 5 pour cent dans de l'eau distillée, afin de redissoudre les éventuels flocculats non immunologiques dus aux complexes substance C-protéine C-réac-tive. En effet, il est fréquent de rencontrer des substances de type C dans les extraits parasitaires (BIGUET et al., 1965a) qui entraînent des fausses réactions de précipitation, en présence de la protéine C-réactive, globuline sérique présente au cours des états inflammatoires.

- Ensuite, les lames sont lavées pendant trois jours, à 4°C, dans de l'eau physiologique tamponnée (90 g NaCl + 500 ml tampon veronal sodé pH 8,2 + eau désionisée qsp 10 l).

- La déminéralisation s'effectue, à la température du laboratoire, en déposant sur le gel un morceau de papier "Whatman N°1" de même format.
- Après complète déshydratation, ces lames déminéralisées sont colorées dans un bain de Noir Amido 10B (425 ml d'une solution molaire d'acide acétique ; 425 ml d'une solution d'acétate de sodium à 0,1 M, 2 gr de Noir Amido 10 B, Merck ; eau distillée qsp 1000 ml). La décoloration du gel s'effectue dans une solution à 2 pour cent d'acide acétique pur.

2.5.1.3. Immunoélectrophorèse bidimensionnelle

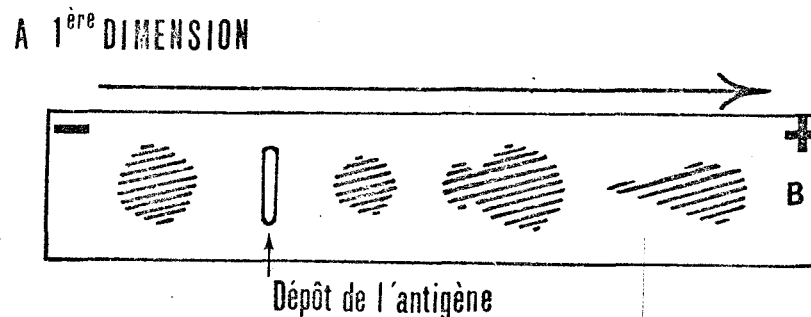
● Principe. Le principe de l'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle fut établi par RESSLER (1960). La technique fut modifiée en 1965 par LAURELL et développée en tant que méthode quantitative par CLARKE et FREEMAN (1968).

Cette technique peut être considérée comme la combinaison de l'électrophorèse simple en gel d'agarose et de l'électroimmunodiffusion selon LAURELL, 1966 (immunoélectrophorèse quantitative en gel d'agarose contenant de l'anti-sérum).

Figure 7 : Principe de l'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle.

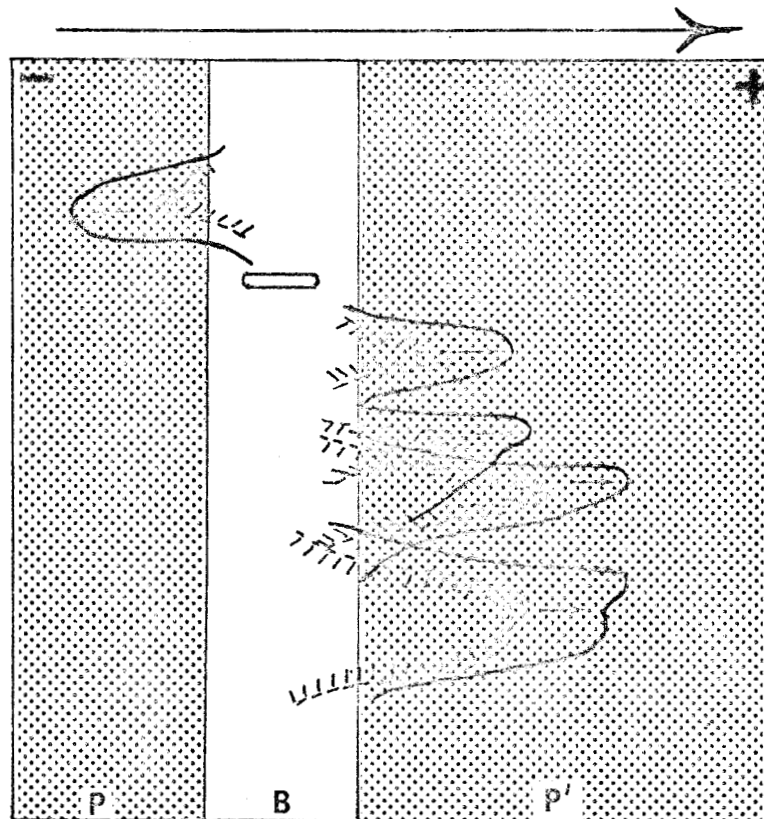
Elle s'effectue en deux temps :

- a) une première électrophorèse du mélange protéique à analyser a lieu dans un gel d'agarose en forme de bande allongée (B).



- b) la bande B est serrée entre deux plaques d'agarose P et P' dans lesquelles a été incorporé au préalable un antisérum convenable en milieu tamponné. L'ensemble des trois bandes jointives est placé dans un champ électrique, dans un sens perpendiculaire au premier.

B 2^{ème} DIMENSION



■ Solution d'agarose (1,3%) contenant un anti-sérum en tampon pH 8,2 et $I 0,03$ suivant REBEYROITE et al. (1970).

Au cours de la deuxième électrophorèse (figure 7,b), il se forme une précipitation quantitative dans le gel d'agarose contenant l'antisérum. En effet, l'antigène en cours de migration rencontre les immunoglobulines à fonction anticorps qui restent en place dans l'agarose car elles se trouvent à leur point isoélectrique en raison du tampon et du pH. L'union des fractions de l'antigène et des anticorps, union provisoirement non précipitante car redissoute par l'excès d'antigène, se déplace jusqu'à une zone d'équilibre où se forme alors un pic de précipitation.

Nous avons utilisé cette technique en raison de sa supériorité analytique par rapport à l'immunoélectrophorèse simple. L'aspect quantitatif de cette technique n'a pas été envisagé dans ce travail, mais il est important de signaler qu'AXELSEN et BOCK (1972) ont défini les principes d'identification des immunoprécipités, dont on ignore la composition, en utilisant des antigènes purs (technique "Tandem" de KROLL, 1969) ou des antisérums spécifiques (technique en gel intermédiaire de SVENDSEN et AXELSEN, 1972).

● Méthode. Beaucoup d'auteurs utilisent le tampon classique de l'immunoélectrophorèse simple (tampon véronal sodé pH 8,2). Avec ce tampon, les constituants très cathodiques sont médiocrement séparés. Aussi, nous avons adopté les modifications apportées par REBEYROTTE et al. (1970) : à savoir un tampon différent qui met en évidence la totalité des composants cathodiques.

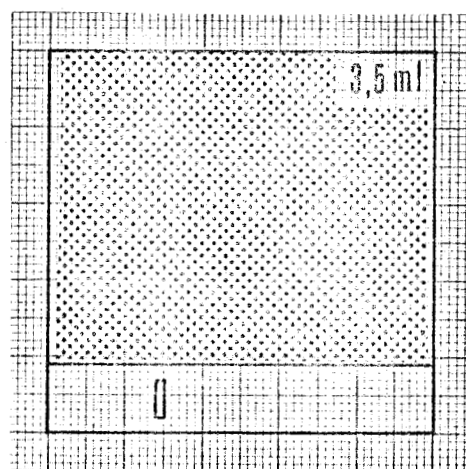
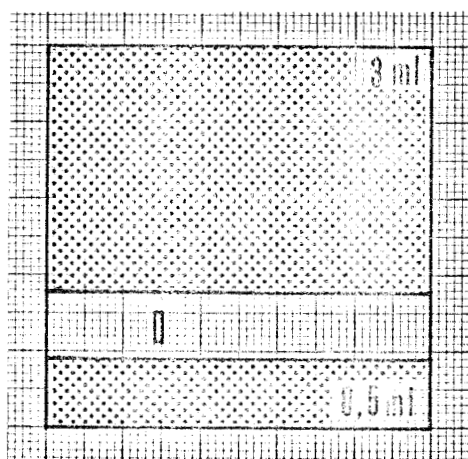
Tampon de REBEYROTTE et al., pH 8,2, I 0,03 :

- 5,5 diéthylmalonylurée acide 1,3 g/l
- 5,5 diéthylmalonylurée sodée 7,7 g/l
- eau désionisée qsp 1000 ml

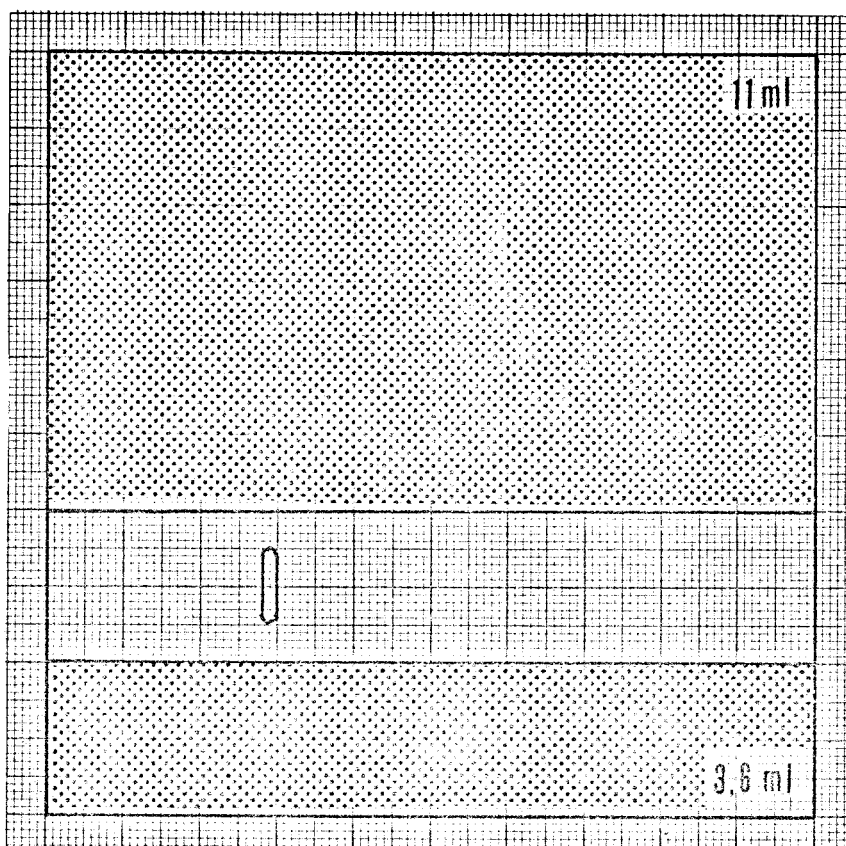
La solution d'agarose est à la concentration de 1 pour cent en tampon REBEYROTTE pour la première dimension. L'antisérum est incorporé à une solution d'agarose (1,3 g pour 100 ml) en tampon REBEYROTTE maintenue à 49°C au bain-marie.

* Nous indiquons ci-dessous les diagrammes à l'échelle millimétrique des différents types de lames utilisées pour l'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle. (Le volume d'agarose à 1,3 %, additionné d'antisérum est porté sur les diagrammes millimétriques).

+ Microméthode



+ Macrométhode



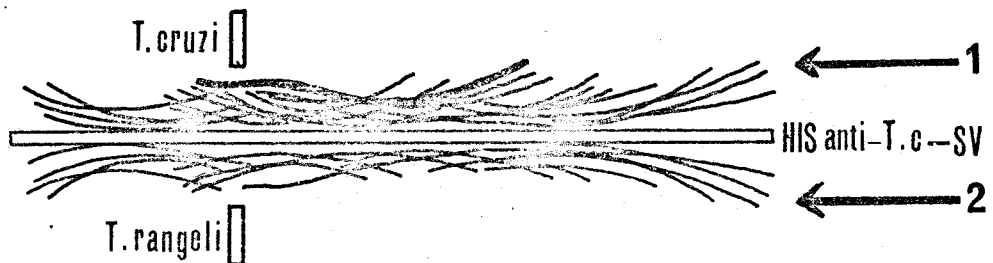
Comme pour la microméthode, la macrométhode peut être réalisée en plaçant la bande de la 1ère dimension au bord inférieur de la lame ; le volume de la solution d'agarose (1,3 %) additionnée d'antisérum est alors de 15 ml.

* Tableau récapitulatif des données méthodologiques de l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle.

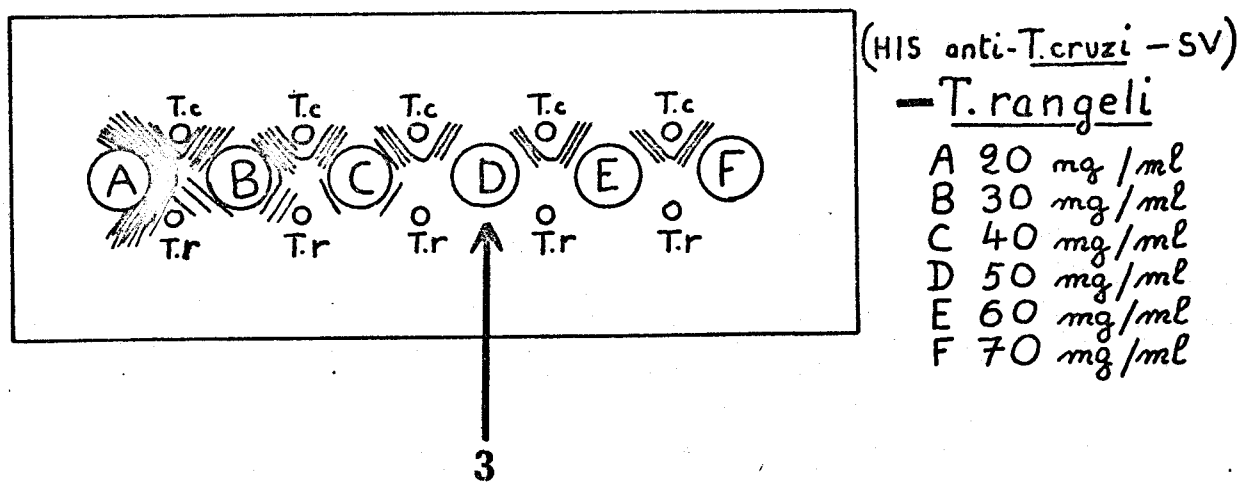
Méthode	Dimension des lames utilisées	Poids d'antigène et vol. de puits de dépôt	Volume d'antisérum dans x ml d'agarose (1,3 %)	migration (voltage/durée)	
				1 ère dimension	2 ème dimension
micro	5 cm x 5 cm	1,5 mg dans 15 µl	1,15 ml dans 2,35 ml de sol. d'agarose	2 heures sous 12,5 V	15 heures sous 3 V
macro	10 cm x 10 cm	5 mg dans 50 µl	5 ml dans 10 ml de sol. d'agarose	5 heures sous 25 V	15 heures sous 12,5 V

Isologie immunochimique de *T. cruzi* et de *T. rangeli*, analysée à l'aide d'un HIS anti-*T. cruzi* préalablement absorbé par le milieu de culture.

A) Figure 8 : Analyse immunoélectrophorétique directe



B) Figure 9 : Absorption croisée progressive en micro-double diffusion.



* Les lavages et la déminéralisation s'effectuent selon les mêmes principes et dans les mêmes conditions que l'immunoélectrophorèse simple.

La coloration au noir Amido entraînant souvent un fond très foncé, nous avons préféré colorer les lames au bleu de Coomassie R :

2 g de bleu de Coomassie R dans le solvant suivant :

- 180 ml d'éthanol 96 %
- 40 ml d'acide acétique pur
- 180 ml d'eau désionisée

La décoloration du fond s'effectue dans le solvant.

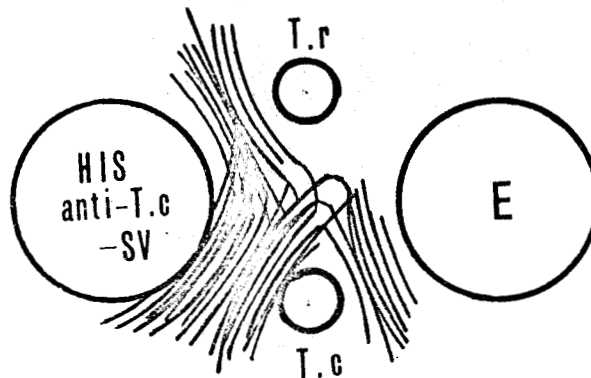
2.5.2. Epreuve d'absorption croisée

L'analyse immunoélectrophorétique comparative de deux organismes hétérologues à l'aide de l'hyperimmunsérum (HIS) homologue d'une des deux espèces, met en évidence les parentés antigéniques de ces deux organismes. Mais il est nécessaire, pour apprécier définitivement l'indice d'isologie des composants solubles de ces deux espèces et les spécificités antigéniques de l'espèce vis-à-vis de l'organisme hétérologue, de procéder à l'absorption de l'HIS de l'espèce considérée par l'extrait antigénique de l'organisme hétérologue.

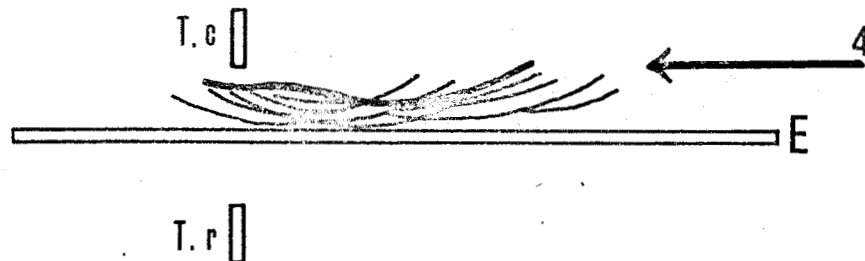
Le recours à l'épreuve d'absorption croisée assure de ne pas prendre en considération des différences antigéniques quantitatives entre les espèces étudiées, mais de révéler uniquement leurs spécificités qualitatives. Néanmoins, l'absorption croisée doit être conduite avec rigueur, c'est-à-dire de manière progressive et contrôlée. Comme exemple, nous prendrons les parentés antigéniques entre T. (S.) cruzi et T. (H.) rangeli, observées à l'aide d'un HIS anti-T. cruzi.

A) L'immunoélectrophorèse directe, menée à l'aide d'un HIS anti-T. cruzi (absorbé par du sérum de veau : SV, les contaminants sériques du milieu de culture entraînant des anticorps précipitants anti-sérum de veau) révèle chez l'organisme hétérologue (T. rangeli) un certain nombre de composants (18) partagés avec T. cruzi (figure 8 : 2 →). La réaction homologue (T. cruzi/HIS anti-T. cruzi) met en évidence 30 composants antigéniques (figure 8 : 1 →).

C) Figure 10 : Contrôle de l'absorption croisée en macro-double diffusion (schéma grossissement x 2).



D) Figure 11 : Mise en évidence, en immunoélectrophorèse, des spécificités de la souche homologue par rapport à la souche hétérologue.



Conclusion

Indice d'isologie immunochimique des composants solubles

Complémentarité entre les spécificités (11 arcs) et les parentés (18 arcs) par rapport au nombre total de composants en réaction homologue (30 arcs) donc :

$$i = \frac{\text{Parentés}}{\text{nbre total}} = \frac{18}{30} \approx 0,6 \text{ des composants totaux objectivés.}$$

B) L'HIS (anti-T. cruzi-SV) est soumis à une absorption progressive par des doses croissantes d'extrait soluble lyophilisé de l'organisme hétérologue T. rangeli. L'épuisement des réactions croisées est contrôlé en micro-double diffusion (figure 9). Le point d'épuisement est atteint en D [3 → : (HIS-anti-T. cruzi-SV)-50 mg de T. rangeli]. Mais il est capital de poursuivre l'absorption au delà du point de l'épuisement apparent dans le but de vérifier la persistance des réactions homologues. Il est en effet fréquent que l'organisme hétérologue renferme des antigènes communs en quantité beaucoup plus faible que l'organisme homologue. Il y a alors épuisement apparent des réactions croisées pour une dose donnée de l'extrait hétérologue. Si les organismes comparés ont des structures antigéniques similaires, la poursuite de l'absorption par des doses supérieures entraîne l'épuisement de la réaction homologue et démontre l'identité qualitative des organismes comparés. Par contre, lorsqu'il existe des spécificités qualitatives (exemple entre T. cruzi et T. rangeli), la réaction homologue se maintient. Systématiquement pour les caractérisations des spécificités, nous avons utilisé, comme dose d'absorption, une quantité d'extrait soluble lyophilisé de 10 mg/ml supérieure à celle nécessaire à l'obtention du point d'équivalence de l'épuisement en micro-double diffusion (exemple : D + 10 mg de T. rangeli/ml).

C) L'absorption de l'HIS (D + 10 mg) est contrôlée ensuite en macro-double diffusion, méthode plus sensible que l'immunoélectrophorèse et que la micro-double diffusion (figure 10).

D) Finalement, les spécificités objectivées par l'HIS absorbé sont identifiées en immunoélectrophorèse (figure 11 : 4 → , montrant 11 arcs de précipitation).

Si le résultat des spécificités (4 → : 11) est complémentaire de celui de l'immunoélectrophorèse directe (2 → : 18, figure 8) par rapport au nombre total des composants objectivés en réaction homologue (1 → : 30, figure 8), il est alors possible de fournir un indice d'isologie immunochimique des composants solubles analysés entre les deux organismes étudiés.

Indice d'isologie des composants solubles entre T. cruzi et T. rangeli par rapport à un HIS anti-T. cruzi

La complémentarité entre les parentés et les spécificités permettent d'établir le rapport suivant :

$$i = \frac{\text{Nbre de composants antigéniques communs}}{\text{Nbre de composants antigéniques totaux}} = \frac{18}{30} = 0,6$$

2.5.3. Immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

Nous avons pratiqué la technique d'immunofluorescence indirecte à des fins diagnostiques avec le sérum des malades, grâce à des étalements de parasite sur lame. La même technique, mais effectuée en tube après fixation des parasites à la glutaraldéhyde, est utilisée pour localiser les antigènes les plus spécifiques de la surface membranaire des trypanosomes.

● Principe général de l'IF

Le principe de la méthode est de visualiser la liaison spécifique antigène-anticorps en marquant les anticorps à l'aide d'un fluorochrome, substance fluorescente en lumière ultra-violette.

C'est COONS et al. (1942) qui imaginèrent les applications pratiques de l'immunofluorescence par utilisation de l'isothiocyanate de fluorescéine fixé aux anticorps par diazotation. La réaction directe de COONS consiste à coupler l'antigène avec les immunoglobulines à fonction anticorps, marquées au préalable à l'isothiocyanate de fluorescéine. Elle est d'une très grande spécificité mais a le double inconvénient d'être peu sensible (voir figure 12) et de nécessiter un marquage de chaque sérum utilisé.

Par contre, la méthode indirecte dite "à deux couches" est plus sensible en raison de la disposition en éventail des complexes antigène-anticorps (figure 12) selon NAIRN (1969). Elle utilise des immunoglobulines "marquées" anti-immunoglobulines de l'espèce animale ayant servi à l'immunisation ou à l'infection. Ces immunoglobulines "marquées", vendues dans le commerce, sont en général de bonne qualité.

● Principe de la méthode indirecte (figure 13)

Mise au point par WELLER et COONS (1954), cette méthode indirecte consiste :

- 1°) à mettre en contact l'antigène (figuré) et l'antisérum contenant ou non des anticorps spécifiques. Si des anticorps spécifiques sont présents, ils vont se fixer sur les sites antigéniques. Le lavage élimine les immunoglobulines sériques non fixées et respecte les complexes formés.;
- 2°) à mettre en évidence le complexe antigène-anticorps grâce à un conjugué fluorescent anti-immunoglobulines de l'antisérum utilisé dans le 1er temps.

● Méthode

	<u>Technique diagnostique</u>	<u>Localisation de surface d'Antigène</u>
<u>Antigènes utilisés :</u>	Ag figuré : - formes de culture de <u>T. cruzi</u> et <u>L. donovani</u> déposées sur lame porte-objet (méthode des gouttes) -- frottis sur lame porte-objet de sang de souris parasitées avec <u>T.b.brucei</u> pour la maladie du sommeil	Ag figuré : - formes de culture de <u>T.cruzi</u> - formes sanguicoles obtenues sur colonne de DEAE-cellulose pour <u>T. brucei</u>
	Séchage 2 heures à 37°C	
<u>Type de la réaction</u>	sur lame	en tube
<u>Fixation :</u>	Méthode des gouttes Pas de fixation Réhydratation au Bleu d'Evans 1/10000 dans PBS	Glutaraldéhyde à 2,5 % dans tampon cacodylate 0,1 M (10 mn à 4°C) 2 lavages en PBS pH 7,2 par centrifugation à 2000 g
<u>ANTISERUM :</u>	Dilution sériée 20 mn à la température ambiante 2 lavages en PBS	Dilution 1/10ème 30 mn à la température ambiante 2 lavages en PBS par centrifugation à 2000 g
<u>Conjugué "marqué"</u>	Conjugué fluorescent anti-globulines humaines (Institut Pasteur) Dilution 1/100ème dans Bleu d'Evans au 1/10000 20 mn à 37°C 2 lavages en PBS	Sérum de mouton anti-Ig de lapin * (Institut Pasteur) au 1/50ème + Bleu d'Evans 1/10000 45 mn à 37°C 2 lavages en PBS par centrifugation à 2000 g

Lecture : microscope Leitz avec filtre BG 12.

FIGURE 12 - Gain de sensibilité en réaction indirecte
(d'après DUPOUEY).

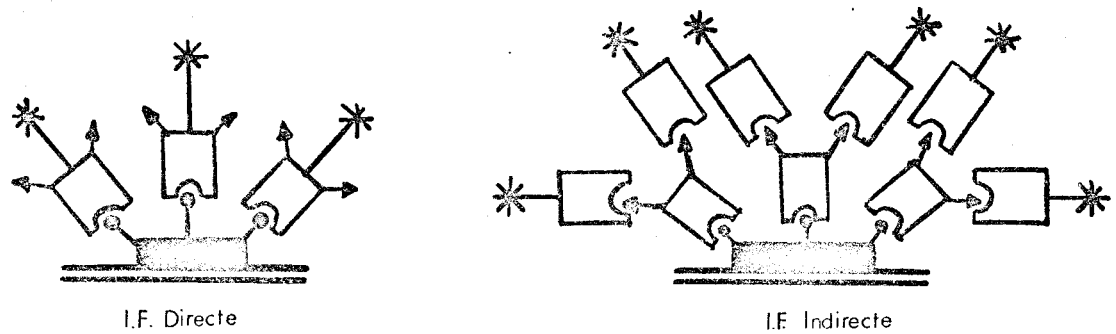
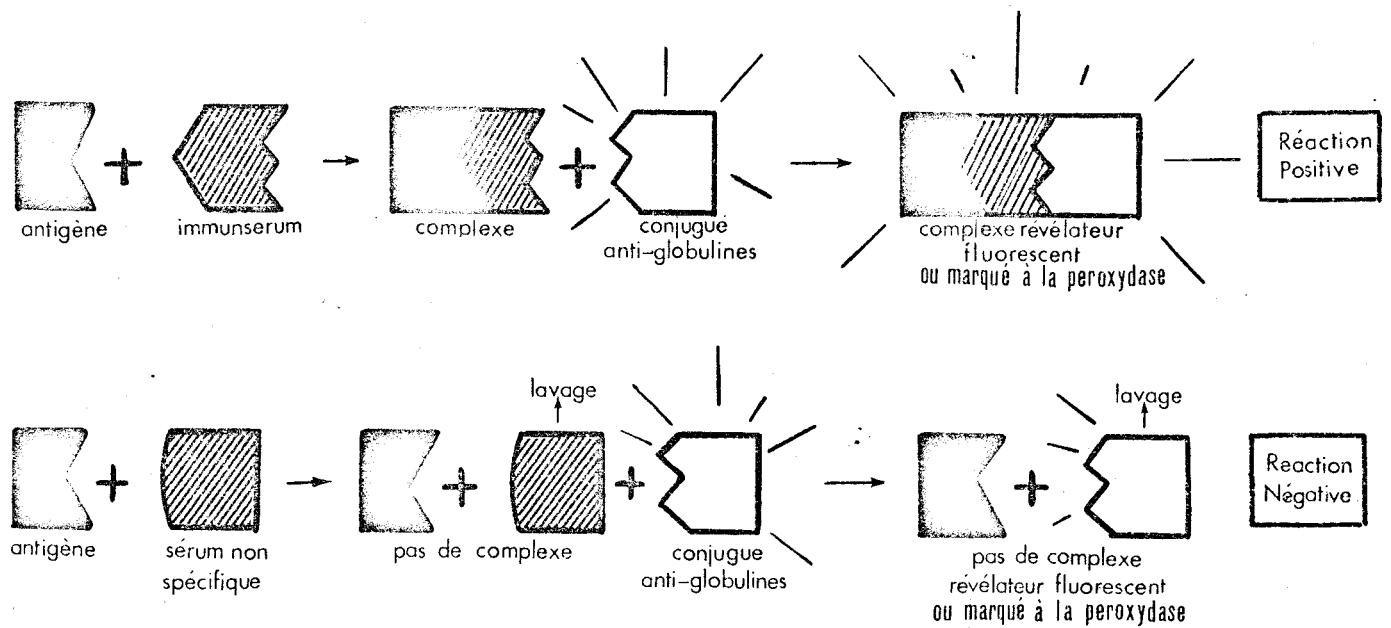


FIGURE 13 - Principe de l'immunofluorescence indirecte
(d'après AMBROISE-THOMAS, 1969) et du mar-
quage enzymologique indirect à la peroxydase.



2.5.4. Technique indirecte de marquage enzymologique à la peroxydase et ses applications en microscopie optique et électronique

En raison du manque de spécificité et de sensibilité, en microscopie électronique, des techniques utilisant des anticorps marqués à la ferritine (BRETTON et al., 1972), nous avons opté pour des techniques de marquage enzymologique à la peroxydase.

● Principe. La méthode indirecte est identique dans son principe et dans sa réalisation à celle de l'immunofluorescence indirecte (figure 13) ; en effet, il suffit d'utiliser au lieu et place d'immunsérums marqués au fluorochrome, des immunsérums marqués à la peroxydase et d'opérer dans des conditions méthodologiques sensiblement similaires à celle de l'immunofluorescence.

C'est en 1966 que NAKANE et PIERCE ainsi qu'AVRAMEAS et URIEL introduisent le marquage enzymatique.

La technique est basée sur le principe que l'activité catalytique de l'enzyme associée à l'anticorps peut être révélée par une réaction cytochimique spécifique de l'enzyme employée.

La réaction cytochimique aboutit à un produit insoluble coloré et dense aux électrons dans les milieux physiologiques. Ce type de marqueur trouve son utilisation aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique.

Pour la microscopie électronique, on doit utiliser une enzyme capable de provoquer, après action sur son substrat, la formation d'une substance dense aux électrons. C'est le cas de la peroxydase du raifort qui a déjà trouvé de larges applications aussi bien en microscopie photonique qu'électronique.

Un grand nombre d'agents de couplage d'enzymes à des anticorps ont été décrits et essayés ; actuellement la glutaraldéhyde semble donner les résultats les plus satisfaisants. Nous ne décrirons pas la méthode de couplage de la peroxydase, ayant utilisé un produit commercial marqué (sérum de mouton anti-immunoglobulines de lapin marqué à la peroxydase selon les modalités décrites par AVRAMEAS, 1969, Institut Pasteur, Paris).

● Méthode.

- Antigènes utilisés : . formes de culture de T. cruzi après lavage en solution de Hanks
; formes sanguicoles de T. brucei obtenues sur colonne de DEAE-cellulose après lavage en PSG
- Type de la réaction : en tube ; lavages (2) par centrifugation (5 mn à 2000 g)
- Préfixation : glutaraldéhyde 2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M (10 mn à 4°C)
2 lavages en PBS pH 7,2
- Antisérum : sérum de lapin dilué au 1/10ème
30 mn à la température ambiante
2 lavages en PBS
- conjugué "marqué" : sérum de mouton antiglobuline de lapin "marqué" à la peroxydase (Institut Pasteur)
dilution au 1/10ème, 45 mn à 37°C
2 lavages en PBS

- Révélation

- . 5 mg de diaminobenzidine dans
10 ml de tampon Tris 0,1 M
pH 7,4 + 1 goutte (0,05 ml)
d'H₂O₂
10 mn à la température
ambiante
- . 2 lavages en PBS

Microscopie optique

- . Préfixation : glutaraldéhyde 2,5 % en
tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2, 16 h à 4°C
- . Lavage en tampon cacodylate 0,1 M,
30 mn à 4°C
- . Révélation peroxydase par diaminobenzidine
(5mg/10ml de Tampon Tris 0,05 M, pH 7,4 +
0,003 % H₂O₂), 30 mn à la température
ambiante
- . Lavage en tampon tris, 0,05 M, 30 mn
- . Fixation : OsO₄ 2 % en tampon cacodylate,
2 h à 4°C
- . Déshydratation (dans gradient d'acétone)
- . Inclusion dans l'Araldite (coupes sur
Porter Blum MFl couteau diamant, montage
sur grilles nues ; Coloration au
Reynolds (30 secondes); ME : Hitachi HU 12

Microscopie électronique

2.6. PURIFICATIONS BIOCHIMIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE

L'obtention d'antigènes spécifiques des Trypanosomatidae étudiés dans ce travail a nécessité la mise en oeuvre de techniques de purifications. Après de multiples tentatives à l'aide des techniques biochimiques classiques de chromatographie sur gel de Séphadex, nous nous sommes orienté, en raison de leurs longues manipulations et surtout de l'imperfection des résultats obtenus, vers des méthodes immunochimiques d'immunoabsorption.

2.6.1. Chromatographie sur gel de Séphadex

● Principe. La séparation des constituants solubles d'un mélange peut être réalisée en utilisant leurs différences de poids moléculaire et en procédant par filtration sur gel. Ce gel est généralement préparé à l'aide de Séphadex, dextran modifié, obtenu par réticulation et formant un réseau tridimensionnel de chaînes de polysaccharides.

Le Séphadex se présente sous forme de très petits grains sphériques (perles), de taille calibrée, très hydrophiles. Les grains, placés en suspension dans une solution tamponnée, gonflent considérablement, formant ainsi un gel dont la matrice est plus ou moins poreuse. Les dimensions des pores sont inversement proportionnelles au degré de réticulation et correspondent à un poids moléculaire déterminé. Le gel est disposé dans une colonne, le mélange à fractionner est versé sur ce gel et est élué à l'aide d'une solution tamponnée.

Les molécules d'un mélange à analyser, qui ont une dimension supérieure au diamètre des pores, c'est-à-dire qui se trouvent au-dessus de la limite d'exclusion, ne peuvent pas diffuser à travers les pores et parcourent donc la colonne avec le liquide circulant autour des grains ; elles sont éluées les premières. Par contre, les molécules dont la taille et la configuration permettent la diffusion à travers les pores du gel sont ralenties pendant leur passage sur la colonne et sont éluées après les molécules de poids moléculaire plus élevé. Les substances quittent donc la colonne dans un ordre décroissant de poids moléculaire.

● Méthode. Pour le fractionnement de l'extrait hydrosoluble total de T. cruzi, nous avons utilisé du Séphadex G75 superfin et G200 superfin donnant successivement des domaines de fractionnement de peptides et de protéines globulaires d'un poids moléculaire compris entre 3.000 et 70.000 pour le G75 et 5.000 à 800.000 pour le G200.

La filtration moléculaire a été réalisée en tampon Tris-HCl 0,1 M - NaCl M, pH 8, sur colonne réfrigérée de 60 cm de hauteur et de 3 cm de diamètre (volume : 465 ml). Le filtrat a été recueilli sur tubes à raison de 5 ml par tube avec un débit de 60 ml à l'heure. L'appareil utilisé est un collecteur de fraction L.K.B. 7000 ULTRORAC avec un enregistreur L.K.B. 6520 et une cellule Uvicord II.

2.6.2. Immunoabsorption

Cette méthodologie, préconisée par CAMPBELL et WELIKY (1967), repose sur la propriété des anticorps, préalablement insolubilisés par fixation sur un support figuré, de réagir avec leur antigène homologue pour ainsi isoler sélectivement celui-ci (figure 14).

L'immunoabsorption demande la préparation préalable de l'immunoabsorbant (IADS) à savoir le couplage des anticorps à un gel (protocole d'AVRAMEAS et TERNYNCK, 1969) ou au Sépharose 4B (protocole d'AXEN et al., 1967). On utilise les IADS soit en colonne (protocole d'AXEN et al.), soit par centrifugation (protocole d'AVRAMEAS et TERNYNCK). Les IADS présentent tous une structure très poreuse, qui exige des lavages abondants et de longue durée.

2.6.2.1. Protocole proposé par AXEN et al. (1967)

● L'immunoabsorbant (IADS)

L'IADS est réalisé en couplant un immunosérum monospécifique ou ses immunoglobulines (*) à du gel de Sépharose 4B (Pharmacia) activé préalablement au bromure de cyanogène, en tampon bicarbonate de Na 0,1 M-NaCl 0,5 M.

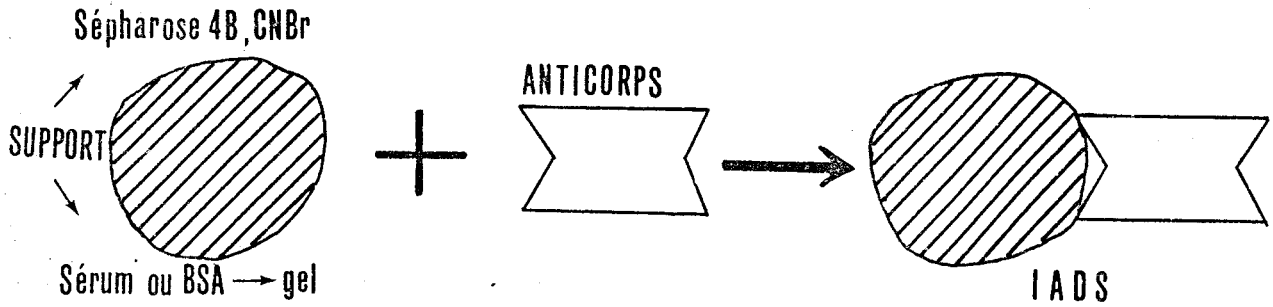
A 3,5 ml de gel est couplé l'équivalent de 15 mg d'immunoglobulines. Le couplage s'opère par agitation pendant deux heures à température du laboratoire. Son efficacité est contrôlée par observation de la diminution de la densité optique du surnageant à 280 nm. Le sérum ou les globulines non fixés sont éliminés par plusieurs lavages successifs avec le tampon bicarbonate.

Les groupes actifs restant sont bloqués par de l'éthanolamine 1 M, pH 8,2, pendant deux heures. Le produit final est ensuite lavé en trois cycles de deux temps par du tampon acétate 0,1 M - NaCl M, pH 4, et du tampon borate 0,1 M-NaCl M, pH 8. Un dernier lavage est réalisé en solution de NaCl 0,5 M.

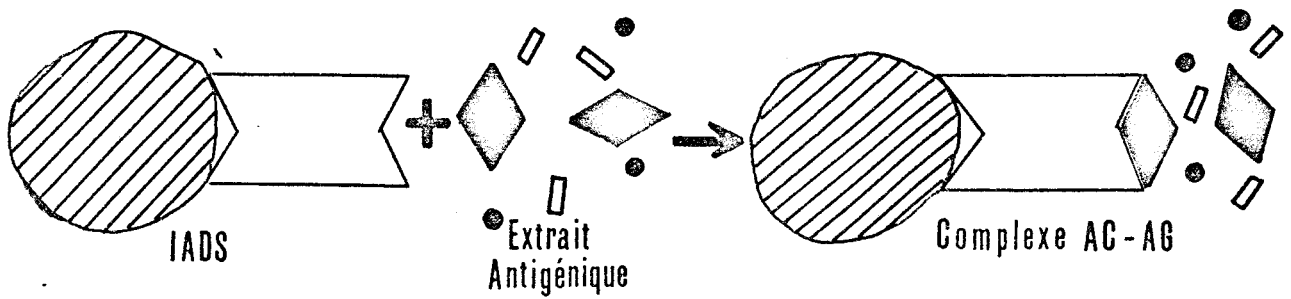
(*) Les immunoglobulines totales d'un sérum sont obtenues par relargage en sulfate d'ammonium à 33 % selon le protocole proposé par NOWOTNY (1969).

Figure 14. PRINCIPE DE L'IMMUNOADSORPTION

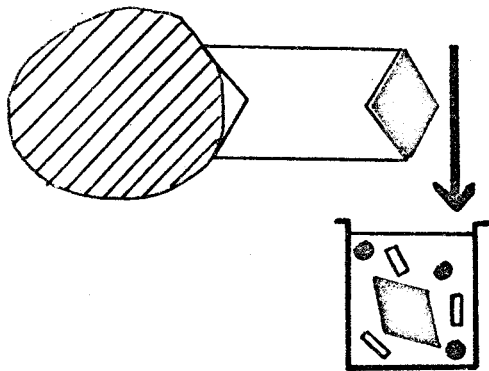
1) PREPARATION de L'IMMUNOADSORBANT (IADS)



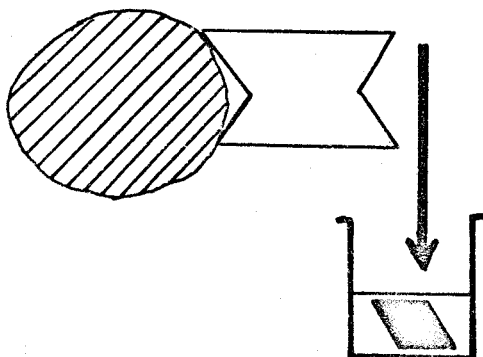
2) IMMUNOADSORPTION



3) LAVAGES



4) ELUTION



● L'immunoabsorption

L'extrait soluble total des organismes étudiés est déposé sur la colonne de verre (volume 15 ml) contenant l'IADS, reliée à un collecteur de fractions.

Après passage de l'extrait soluble à un faible débit (20 ml/heure), l'IADS est lavé avec une solution de NaCl 0,5 M jusqu'à ce que la densité optique du liquide de lavage soit nulle. L'antigène à purifier, fixé aux anticorps monospécifiques est alors élué par dissociation à pH acide en faisant percoler sur la colonne l'IADS par une solution tamponnée glycine - HCl 0,2 M - NaCl 0,5 M, pH 2,8. L'éluat est ensuite neutralisé avec une solution de K_2HPO_4 , 1 M, dialysé contre du tampon PBS, une nuit à 4°C, puis concentré par passage sur cellule ultrafiltrante Amicon munie d'une membrane Diaflo UM-10.

2.6.2.2. Protocole proposé par AVRAMEAS et TERNYNCK (1969)

Le principe est identique à celui de la technique d'AXEN et al. L'immunoabsorption est réalisée dans un bécher et les lavages sont effectués par centrifugation.

● L'immunoabsorbant (IADS)

Dix ml d'antisérum monospécifique total, dialysé au préalable contre de l'eau physiologique pH 7,4, sont additionnés de 1 ml de tampon acétate 2 M pH 5 et de 3 ml de glutaraldéhyde 2,5 % en tampon acétate 0,2 M pH 5. Il se forme alors un gel dans un délai de 10 à 30 mn. Après un contact de 3 h, le gel est homogénéisé au potter puis lavé plusieurs fois en tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 jusqu'à ce que la densité optique du surnageant de centrifugation soit inférieure à 0,100.

Le polymère est additionné de tampon HCl-glycine 0,2 M pH 2,8 pendant 15 mn à la température de la pièce, centrifugé, puis neutralisé avec du tampon K_2HPO_4 1M. Après centrifugation, l'IADS est lavé en tampon PBS jusqu'à l'obtention d'une D.O. inférieure à 0,050.

● L'immunoabsorption

L'IADS, centrifugé avant l'utilisation, est mélangé à l'extrait soluble total à purifier. Le mélange est incubé pendant 60 mn à la température de la pièce.

Après centrifugation, le polymère est lavé plusieurs fois en tampon PBS, jusqu'à ce que la D.O. du surnageant soit inférieure à 0,050.

L'antigène est élué de l'anticorps en deux étapes : d'abord avec du tampon refroidi HCl-glycine pH 2,8 pendant 15 mn à 4°C sous agitation magnétique. L'éluat est recueilli par centrifugation. L'opération est répétée avec du tampon refroidi HCl-glycine pH 2,2. Les surnageants obtenus sont immédiatement neutralisés avec une solution de K_2HPO_4 , 1 M, puis ils sont dialysés contre du PBS, une nuit à 4°C. L'éluat dialysé est concentré par passage sur cellule ultrafiltrante Amicon munie d'une membrane Diaflo UM-10.

Après usage l'IADS est lavé en tampon glycine HCl pH 2,8, neutralisé avec K_2HPO_4 , 1 M, puis en tampon PBS et peut être réutilisé.

CHAPITRE 3 : STRUCTURES ANTIGENIQUES DES EXTRAITS HYDROSOLUBLES DES

TRYPANOSOMATIDAE HETEROXENES PARASITES DE L'HOMME :

T. CRUZI, T. RANGELI, T. B. GAMBIENSE, L. DONOVANI.

La détermination des parentés et des spécificités antigéniques entre différentes espèces demande, au préalable, une connaissance précise des structures antigéniques. Seule l'analyse immunoélectrophorétique, méthode analytique de choix, permet la caractérisation des composants antigéniques à l'aide de sérums hyperimmuns préparés chez le lapin. Une étude détaillée de la structure antigénique d'un organisme, nous a permis de distinguer les antigènes hétérospécifiques, communs à de nombreuses espèces zoologiquement éloignées, des antigènes appartenant strictement à l'espèce.

3.1. LES ANTIGENES HETEROSPECIFIQUES

Les antigènes hétérospécifiques, appelés aussi ubiquistes, n'ont guère été étudiés chez les Protozoaires. Par les réactions croisées non spécifiques qu'ils déterminent, ces antigènes peuvent fausser les résultats des comparaisons immunotaxonomiques et des résultats diagnostiques.

Sans préjuger de leur origine, les antigènes hétérospécifiques, communs à de nombreuses espèces, peuvent être classés en trois catégories :

- (a) des polysaccharides analogues à la substance C ;
- (b) des antigènes ubiquistes pouvant entraîner des parentés de hasard avec d'autres organismes très éloignés zoologiquement ;
- (c) enfin, des antigènes partagés avec le milieu de culture des trypanosomes ou l'hôte vertébré du parasite.

Aussi, nous avons tenté d'en apprécier la fréquence et l'importance dans les extraits antigéniques de T. cruzi, L. donovani, T. brucei et T. gambiense à l'aide des méthodes de précipitation en gel.

3.1.1. Les polysaccharides du type de la substance C

Les extraits antigéniques de champignons et d'helminthes contiennent fréquemment des antigènes analogues aux polysaccharides du type de la substance C (LONGBOTTOM et PEPYS, 1964 ; BIGUET et al., 1965a). Décrite initialement au niveau de la capsule de pneumocoques (TILLET et FRANCIS, 1930), la substance C a la propriété de précipiter la protéine C-réactive, composant sérique qui n'est pas une immunoglobuline et dont la production est particulièrement marquée chez les vertébrés au cours des états inflammatoires.

Des polysaccharides du type de la substance C ont été quelquefois rencontrés dans les extraits de Trypanosomatidae étudiés mais de manière irrégulière et en quantité réduite, principalement chez les formes de culture âgées (figure 15, A). La formation des précipités aspécifiques dûs à ces substances requiert la présence d'ions Ca^{++} ; ils sont éliminés des réactions de précipitation en gel par incubation pendant 3 heures dans une solution de citrate trisodique à 5 grammes p. 100 à la température du laboratoire (figure 15, B), le citrate de Ca qui se forme n'étant pas ionisé en solution.

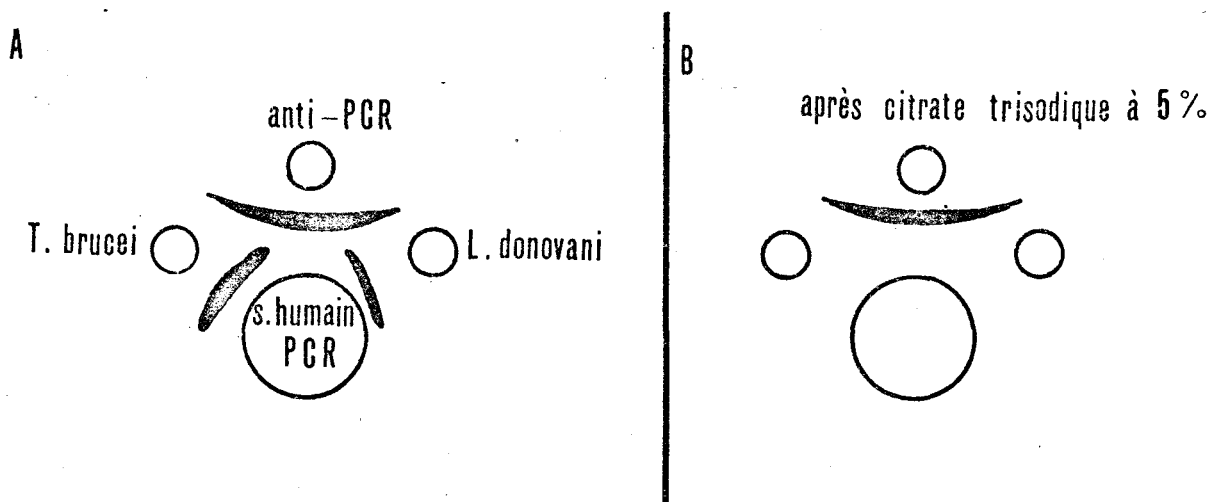


Figure 15 : Présence de polysaccharides du type de la substance C dans des extraits antigéniques de Trypanosomatidae (T. brucei et L. donovani)

- A : La protéine C-réactive d'un sérum humain (PCR), révélée par un immunsérum anti-PCR (Difco), précipite la substance C présente dans les extraits de T. brucei et L. donovani
- B : L'incubation du gel dans une solution de citrate trisodique à 5 % dissout le flocculat, sans altérer le précipité immunologique PCR-anti-PCR.

Ainsi, la présence de polysaccharides du type de la substance C dans les extraits de Trypanosomatidés nécessite, lors des études comparatives et diagnostiques, une incubation préalable des immunoélectrophorégrammes dans un bain de citrate trisodique ; ceci permet d'éliminer de fausses réactions positives.

3.1.2. Parentés de hasard (antigènes ubiquistes)

Des antigènes de type FORSSMAN, signalés chez T. brucei (HOUBA et ALLISON, 1966 ; HOUBA et al., 1969) et chez T. cruzi (ENOS et ELTON, 1950) ainsi que les déterminants des groupes sanguins ne sont pas révélés classiquement par les techniques de précipitation en gel ; par contre, celles-ci visualisent certaines parentés de hasard lors de la confrontation de T. brucei, T. cruzi et L. donovani à une série d'organismes étrangers au phylum (champignons, helminthes, Mycobacteriaceae).

3.1.2.1. Helminthes - Champignons

La confrontation immunoélectrophorétique des HIS anti-T. cruzi, -T. brucei, -L. donovani et de 24 espèces de champignons et d'helminthes (tableau III) ne met en évidence de réactions croisées qu'à de rares occasions. Ces réactions ne s'expriment généralement que par un seul arc de précipitation, d'ailleurs atténué par le citrate trisodique.

Ces résultats montrent le caractère exceptionnel des réactions croisées entre Trypanosomatidés et les champignons et helminthes. Ces réactions n'expriment pas nécessairement des parentés antigéniques vraies. En effet, une incubation prolongée (16h) des lames dans une solution de citrate trisodique resolubilise partiellement la plupart des précipités, localisés d'ailleurs dans la région du puits de dépôt de l'extrait antigénique.

D'autre part, ces réactions peuvent être dues à un contact immunogène naturel, indépendant de l'immunisation expérimentale et préexistant à celle-ci. Des observations de LE RAY (1975) montrent que certains lapins présentent un nombre réduit de précipitines anti-bactériennes et anti-protistes. Ceci souligne la nécessité, non seulement d'une saignée de contrôle avant toute immunisation, mais de plus, d'avoir recours à l'absorption des anticorps correspondants à l'aide des extraits antigéniques intéressés pour obtenir une démonstration catégorique des parentés antigéniques.

TABLEAU III

Réactions immunoélectrophorétiques croisées entre Trypanosomatidae et quarante-deux organismes non apparentés, révélées à l'aide d'hyperimmunsérums anti-formes de culture.

	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>
<u>CHAMPIGNONS</u>			
<i>Microsporium canis</i>	o	o	o
<i>Trichophyton schoenleini</i>		o	o
<i>T. violaceum</i>	o	o	o
<i>T. rubrum</i>	o	o	o
<i>Epidermophyton floccosum</i>	o	o	o
<i>Candida albicans</i>	o	o	o
<i>C. robusta</i>	o	o	o
<i>Rhodotorula sp.</i>		o	o
<i>Histoplasma capsulatum</i>	o	o	o
<i>H. duboisii</i>	o	o	o
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	o	o	o
<i>B. brasiliensis</i>	o	o	o
<i>Mucor mucedo</i>	o	o	o
<i>Aspergillus fumigatus</i>	o	o	o
<i>A. nidulans</i>	o	o	o
<i>A. niger</i>	o	o	o
<i>A. terreus</i>	o	o	
<i>A. flavus</i>	o	o	o
<i>Penicillium notatum</i>	o	o	o
<i>Streptomyces sanguineus</i>	o	o	o
<i>S. griseus</i>	o	o	o
<i>Thermoactinomyces sp.</i>	o		o
<i>Actinomyces israeli</i>		o	o
<i>Nocardia brasiliensis</i>		o	o
<i>Alternaria tenuis</i>	o	o	o
<i>Micropolyspora foeni</i>	o	o	o
<u>HELMINTHES</u>			
<i>Fasciola gigantica</i>	o	o	o
<i>F. hepatica</i>	o	o	o
<i>Schistosoma mansoni</i>	o	o	o
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	o	o	o
<i>Clonorchis sinensis</i>	o	o	o
<i>Taenia solium</i>	o	o	o
<i>T. saginata</i>	o	o	o
<i>Hymenolepis nana</i>	o	o	o
<i>Echinococcus granulosus</i>	o	o	o
<i>Cysticercus fasciolaris</i>	o		o
<i>Ascaris suum</i>	o	o	o
<i>Toxocara canis</i>	o	o	o
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	o	o	o
<i>Onchocerca volvulus</i>	o	o	o
<i>Dipetalonema vitae</i>	o	o	o
<i>Panagrellus silusiae</i>	o		o

Légende :

o = puits de dépôt de l'extrait antigénique, réaction négative

= réaction positive

= arc de précipitation s'atténuant en solution citratée.

3.1.2.2. L. donovani - Mycobacteriaceae

En contraste avec les relations antigéniques pratiquement négligeables entre Trypanosomatidés et champignons-helminthes, des parentés exceptionnellement importantes, vraisemblablement de hasard, sont rencontrées entre les genres Leishmania et Mycobacterium. Ces parentés (décrites par RANQUE et al., 1972 ; OELERICH, 1973), sont illustrées par un minimum de 3 composants (figure 16) de L. donovani qui se retrouvent entre autre chez les mycobactéries atypiques M. phlei, M. smegmatis et M. chelonei.

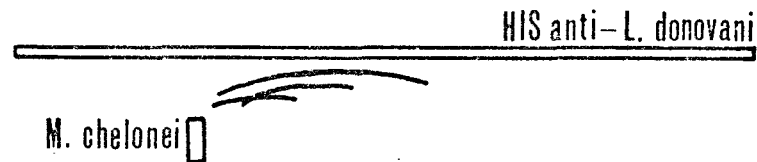


Figure 16 : Parentés de hasard entre les genres Leishmania et Mycobacterium : un extrait antigénique de M. chelonei permet de révéler, en immunoelectrophorèse vis-à-vis d'un HIS anti-L. donovani, 3 composants antigéniques communs.

Ces réactions croisées entre L. donovani et le genre Mycobacterium sont telles que des auteurs ont préconisé l'emploi de bacilles acido-résistants comme antigène dans le diagnostic du kala-azar par fixation du complément (GREVAL et al., 1939 ; NUSSENZWEIG, 1957 ; SEN GUPTA, 1969).

Par contre, de telles parentés exceptionnelles n'ont pas été rencontrées avec le genre Trypanosoma. Les hyperimmunsérums anti-T. brucei et anti-T. cruzi opposés aux extraits antigéniques des mycobactéries atypiques n'ont jamais donné de réaction de précipitation dans nos conditions expérimentales.

3.1.3. Relations avec le milieu de culture ou l'hôte vertébré

Une troisième classe d'antigènes hétérospecifics, plus importante à considérer, est celle des antigènes partagés avec le milieu de culture ou l'hôte vertébré.

Tout extrait antigénique d'un Protozoaire, cultivé in vitro dans un milieu immunogène ou récolté in vivo chez un hôte vertébré, contient,

malgré les lavages, des protéines du milieu de culture ou des animaux infectés. Avant d'aborder l'étude de la structure antigénique parasitaire, il était donc nécessaire :

- (a) de définir les conditions optimales de lavage des organismes lors de la récolte ;
- (b) de caractériser les éventuels contaminants dans les extraits antigéniques et de localiser, dans les HIS, les anticorps anti-milieu de culture ou hôte vertébré ;
- (c) d'analyser les structures antigéniques parasitaires et les parentés immunostructurales à l'aide d'HIS débarrassés des anticorps anti-milieu ou hôte par absorption croisée.

3.1.3.1. Contrôle immunologique des conditions de lavage lors de la récolte

Le lavage des organismes est soumis à deux impératifs qui à première vue sont contradictoires :

- un nombre de lavages suffisamment important pour éliminer les contaminants antigéniques originaires des milieux de culture ou des animaux infectés ;
- un nombre réduit de lavages pour éviter qu'une souffrance cellulaire au cours des manipulations entraîne la libération d'un petit nombre de composants d'origine parasitaire.

Afin de préciser les conditions optimales de lavage respectant les deux critères précédents, nous avons pratiqué un contrôle immunologique, par immunoélectrophorèse, des eaux de lavage successives.

- Récolte des organismes *in vitro* en milieu GLSH

L'étude de la structure antigénique comparée, en immunoélectrophorèse, des différents composants du milieu de culture (GLSH), à l'aide d'HIS anti-milieu de culture et anti-sérum de veau a démontré que le sérum de veau est le seul matériel antigénique du milieu de culture (figure 17).

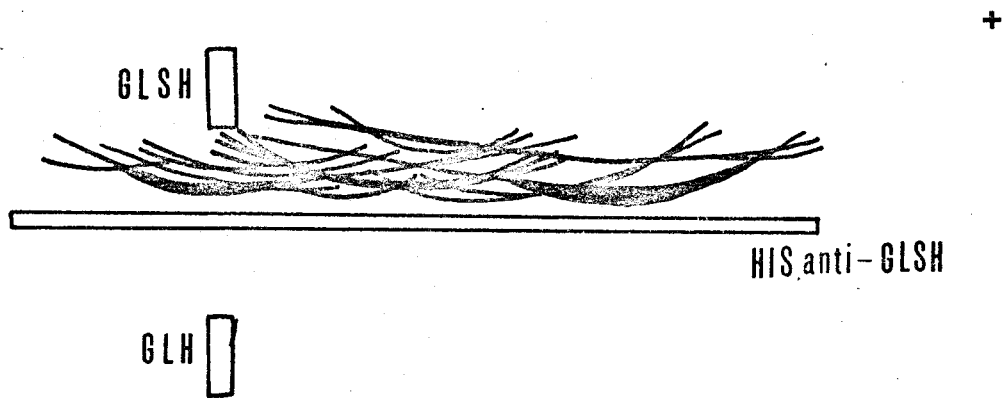


Figure 17 : Analyse immunoelectrophorétique du milieu de culture GLSH, menée à l'aide d'un HIS anti-GLSH, révélant l'existence d'au moins 22 composants antigéniques et montrant que seul le sérum de veau (S) est antigénique. Le milieu sans sérum de veau (GLH) ne révèle aucun arc de précipitation vis-à-vis de l'HIS anti-milieu de culture GLSH.

Le contrôle de pureté, lors de la récolte des flagellés est réalisé par l'analyse immunoelectrophorétique des eaux de lavage successives, concentrées par lyophilisation et révélées par un HIS anti-milieu de culture (figure 18). La disparition des protéines sériques de veau est pratiquement totale après le 3ème lavage en milieu glucosé salin. Néanmoins, une trace reste visible sur les diagrammes immunoelectrophorétiques, dans la zone de l'albumine sérique, indépendamment du nombre ultérieur de lavages.

Le premier lavage seul libère, en faible quantité, un petit nombre de composants d'origine parasitaire.

Les résultats sont identiques pour toutes les espèces de Trypanosomatidés cultivées in vitro. Sur ces bases, nous avons définitivement adopté le nombre de 4 lavages lors de la récolte des formes de culture de ces flagellés.

- Récolte des organismes *in vivo* sur rats Wistar

Une étude similaire à la précédente a été menée pour la récolte des formes sanguicoles de T. gambiense et de T. brucei.

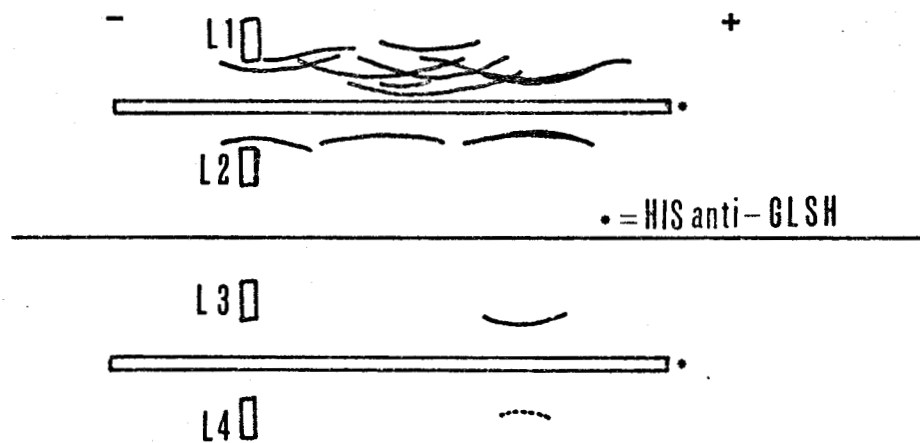


Figure 18 : Contrôle immunologique des conditions de lavage des formes de culture : constituants antigéniques du milieu de culture GLSH présents après récolte des organismes au cours des quatre premiers lavages (eaux de lavage successives L1 à L4).

LE RAY (1975) a montré que des composants parasitaires, communs aux formes de culture et aux formes sanguicoles, ne sont observés qu'à partir du deuxième lavage. Des composants cathodiques majeurs spécifiques des formes sanguicoles apparaissent dès le premier lavage et se retrouvent dans les eaux de lavage successives.

Personnellement, nous avons montré qu'au cours du lavage des formes sanguicoles de T. gambiense, il ne subsiste plus, après le premier lavage, de composants sériques de rat décelables par l'analyse immunoélectrophorétique (figure 19).

En raison de la libération faible mais nette de composants parasitaires dès le premier lavage et de l'absence de protéines sériques de rat dès le deuxième, nous avons adopté le nombre de 2 lavages lors de la récolte des formes sanguicoles des *Salivaria*.

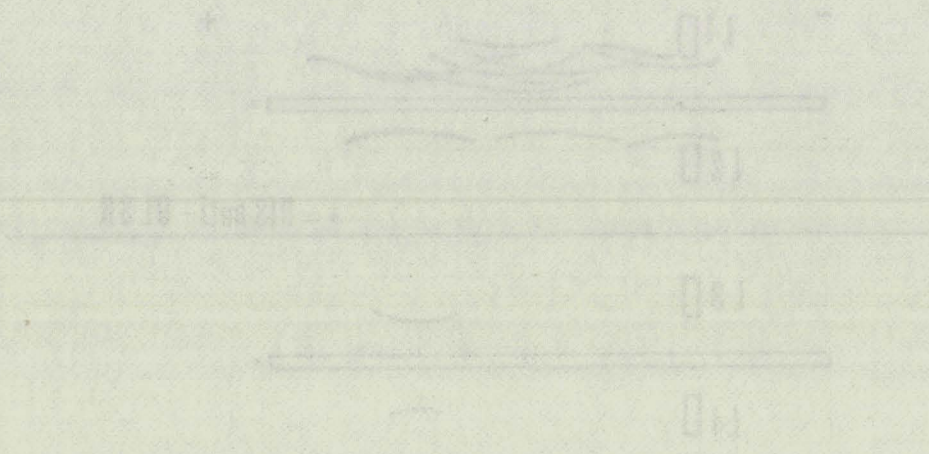


Figure 10 - Section of the mechanical part with dimensions 100-100-100.

The drawing shows a cross-section of a mechanical part with a central shaft of diameter 100 units. The part is supported by a base with a height of 100 units. The top profile is curved with a maximum height of 100 units. The drawing is labeled with '100' at several points and '100-100-100' in the center.

The drawing shows a cross-section of a mechanical part with a central shaft of diameter 100 units. The part is supported by a base with a height of 100 units. The top profile is curved with a maximum height of 100 units. The drawing is labeled with '100' at several points and '100-100-100' in the center.

The drawing shows a cross-section of a mechanical part with a central shaft of diameter 100 units. The part is supported by a base with a height of 100 units. The top profile is curved with a maximum height of 100 units. The drawing is labeled with '100' at several points and '100-100-100' in the center.

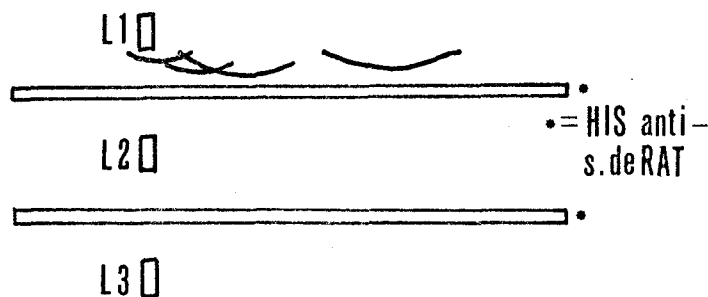


Figure 19 : Contrôle immunologique des conditions de lavage des formes sanguicoles de *T. gambiense* : constituants antigéniques sériques de rat présents après récolte des organismes au cours des trois premiers lavages (eaux de lavage successives L1 à L3 opposés à un HIS anti-sérum de rat).

Ainsi l'immunoélectrophorèse, en permettant de suivre la disparition des protéines du milieu de culture ou de l'hôte vertébré au cours du lavage des protozoaires récoltés, est une méthode de choix pour le contrôle de la purification et de la standardisation des antigènes parasitaires cultivés in vitro ou récoltés in vivo dans des milieux immunogènes.

3.1.3.2. Composants sériques dans les extraits antigéniques parasitaires

Malgré la disparition des contaminants sériques du milieu ou de l'hôte dans les eaux de lavage lors de la récolte des parasites, nous avons constaté, à l'aide de l'immunoélectrophorèse, leur persistance dans les extraits parasitaires.

En effet, l'analyse immunoélectrophorétique du sérum de veau ou du sérum de rat par les HIS anti-Trypanosomatidae révèle 6 à 8 arcs de précipitation (figure 20, A et B). A l'inverse, l'immunoélectrophorégramme d'un extrait soluble parasitaire, par un HIS anti-milieu de culture ou anti-sérum de rat, ne révèle que 3 à 4 arcs de précipitation (figure 20, C et D).

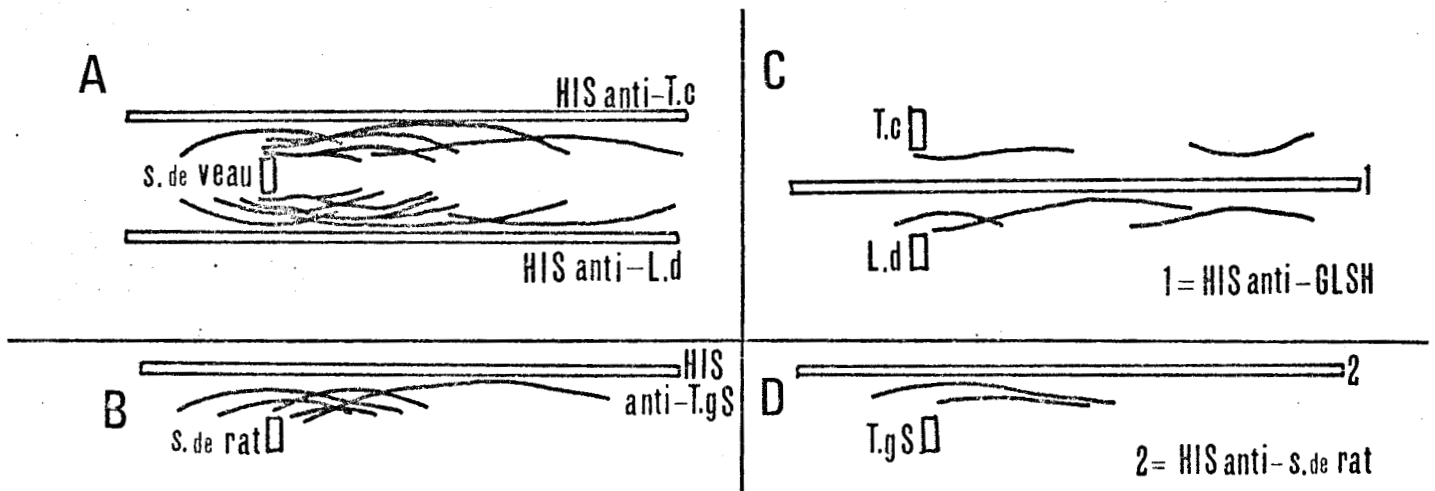


Figure 20 : Présence de protéines sériques de veau dans les extraits des formes de culture et de protéines sériques de rat dans les extraits de formes sanguicoles.

- A : 6 à 8 composants sériques de veau sont révélés par les HIS-anti-Trypanosomatidae opposés au sérum de veau
- B : protéines sériques du rat révélées par un HIS anti-formes sanguicoles de T. gambiense
- C et D : réciproquement, l'analyse des extraits parasitaires de culture et sanguicoles par, respectivement, un HIS anti-milieu de culture GLSH (C) et un HIS anti-sérum de rat (D), détermine 3 à 4 arcs de précipitation.

Cela signifie que les formes de culture et les formes sanguicoles contiennent des traces de protéines sériques, soit par adsorption en surface, soit dans des vacuoles endoplasmiques après pinocytose ; ces traces sont très immunogènes pour le lapin lors de la préparation des H.I.S. Il est donc nécessaire, avant d'analyser la structure antigénique spécifiquement parasitaire, de réaliser l'absorption des H.I.S. anti-Trypanosomatidae par les protéines sériques du milieu de culture ou de l'hôte vertébré.

3.1.3.3. Absorption des anticorps anti-milieu ou anti-hôte vertébré

Des résultats similaires ont été obtenus avec des extraits antigéniques d'organismes se multipliant in vitro ou in vivo. Nous n'envisagerons pas la caractérisation de ces composants sériques à propos de chaque structure antigénique parasitaire. Nous donnerons ici un exemple d'absorption croisée (H.I.S. anti-T. cruzi - sérum de veau - figure 21), la même situation se retrouvant chez les différents organismes étudiés. Avant chaque étude immunostructurale et immunotaxonomique, les H.I.S. ont été systématiquement absorbés par les protéines sériques du milieu de culture (sérum de veau, SV en abréviation) ou de l'hôte vertébré (sérum de rat, SR en abréviation).

L'absorption d'un H.I.S. anti-Trypanosomatidae par les protéines sériques s'effectue dans les conditions normalisées décrites au chapitre précédent (2.5.2.) :

- (i) cinétique de l'absorption, réalisée en micro-double diffusion, avec recherche du point d'équivalence à la dose d'épuisement ;
- (ii) systématiquement la dose d'épuisement est supérieure de 10mg/ml à la dose correspondant au point d'équivalence ;
- (iii) contrôle de l'absorption en macro-double diffusion (figure 21) : montrant la disparition totale des anticorps anti-sérum de veau dans l'H.I.S. anti-T. cruzi absorbé.

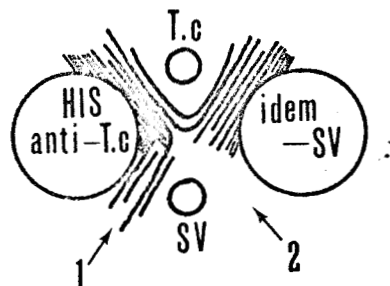


Figure 21 : Contrôle d'épuisement

- 1 —> mise en évidence des anticorps anti-sérum de veau dans un H.I.S. anti-T. cruzi non absorbé
- 2 —> disparition de ces anticorps dans l'H.I.S. absorbé.

En règle générale, tous nos H.I.S., qu'ils soient destinés à être utilisés pour des études immunostructurales, immunotaxonomiques ou de spécificités antigéniques, ont été systématiquement absorbés par les protéines sériques préalablement lyophilisées, dans les proportions suivantes :

- H.I.S. anti-T. cruzi - 15 mg/ml de sérum de veau (SV)
- H.I.S. anti-T. rangeli - 15 mg/ml de SV
- H.I.S. anti-L. donovani - 25 mg/ml de SV
- H.I.S. anti-T. gambiense C (formes de culture) - 15 mg/ml de SV
- H.I.S. anti-T. gambiense S (formes sanguicoles) - 10 mg/ml de sérum de rat (SR)

3.2. LES ANTIGENES STRICTEMENT D'ESPECE

Les structures antigéniques parasitaires des formes de culture de T. cruzi et de T. rangeli, des formes de culture et sanguicoles de T. b. gambiense et des formes de culture de L. donovani ont été analysées à l'aide de la technique de l'immunoélectrophorèse.

Une étude complète a été envisagée pour T. cruzi et pour L. donovani afin de mettre en évidence les composants les plus immunogènes.

3.2.1. Etude complète d'une structure antigénique par immunoélectrophorèse : T. cruzi Tehuantepec, en culture in vitro

Cette étude (AFCHAIN et CAPRON, 1969, 1971) a permis, après avoir envisagé la cinétique de l'apparition des anticorps expérimentaux chez le lapin, d'établir la structure antigénique des composants solubles de T. cruzi et de mettre en évidence un composant n°5 "remarquable" par son immunogénicité.

L'étude immunostructurale de cette même souche de T. cruzi, au cours de son maintien in vitro, a montré sa stabilité antigénique quelque soit les conditions de culture.

3.2.1.1. Cinétique de l'apparition des anticorps expérimentaux chez le lapin

Nous avons suivi l'apparition des anticorps expérimentaux chez les lapins par saignée bimensuelle. Sur la figure 22, correspondant à un lapin

type répondant aux critères moyens de l'immunisation, on constate une augmentation croissante du nombre de systèmes précipitants jusqu'à la 19ème semaine d'immunisation, période à laquelle est atteint l'état hyperimmun.

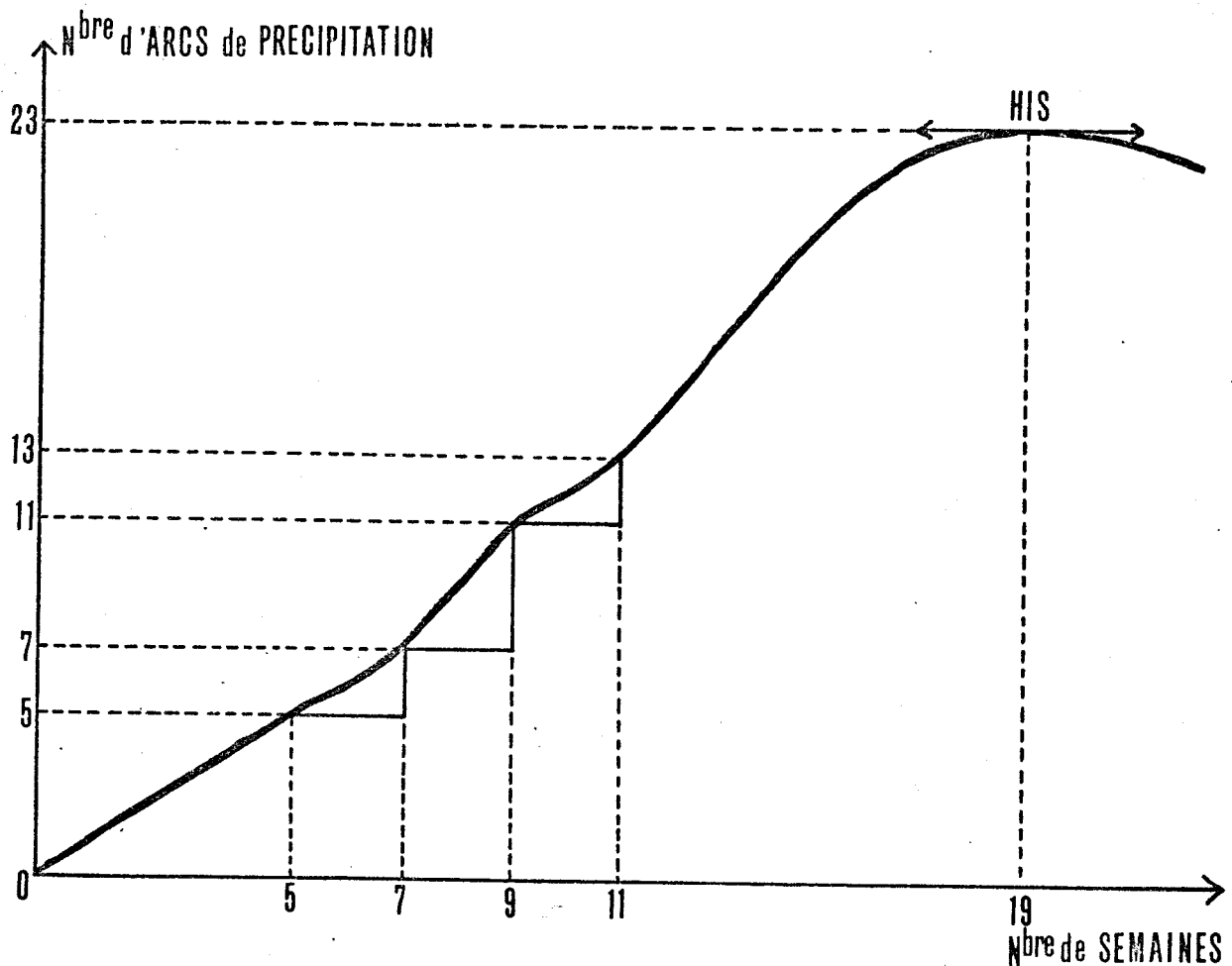


Figure 22 : Cinétique de l'apparition des anticorps expérimentaux chez un lapin immunisé par voie sous-scapulaire à l'aide d'un extrait soluble de T. cruzi.

Une telle cinétique souligne la nécessité de procéder à une immunisation prolongée pour obtenir les H.I.S. utilisables dans les études immunostructurales.

3.2.1.2. Structure antigénique parasitaire

L'analyse immunoélectrophorétique a été conduite à l'aide d'un extrait antigénique soluble de T. cruzi, souche Tehuantepec, opposé à un H.I.S. homologue particulièrement riche, absorbé par de l'antigène sérum de veau (H.I.S. anti-T. cruzi - SV). Elle révèle au moins 30 composants antigéniques parasitaires (figure 23).

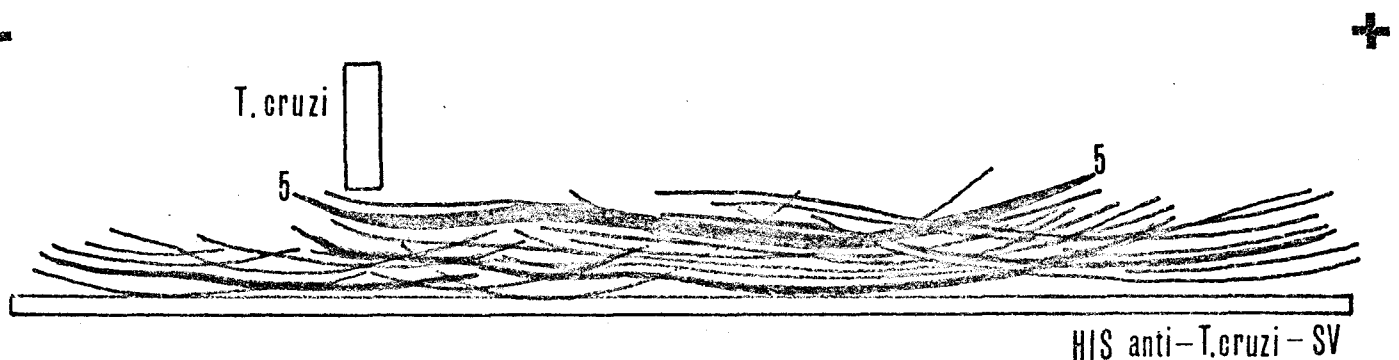


Figure 23 : Structure antigénique parasitaire des formes de culture de T. (S.) cruzi Tehuantepec.

On notera en particulier, sur le diagramme immunoélectrophorétique, l'existence d'un arc "remarquable" par son intensité. Ce composant antigénique est dénommé composant n°5 sur la base d'un précédent diagramme préliminaire (AFCHAIN et CAPRON, 1971) numéroté de la cathode à l'extrémité anodique.

3.2.1.3. Mise en évidence du composant antigénique "remarquable" n°5

L'étude de la structure antigénique des helminthes (CAPRON et al., 1968a) et des champignons parasites (BIGUET et al., 1965c) révèle l'existence, chez de nombreux parasites, d'au moins un composant "remarquable" par l'intensité de l'arc de précipitation qu'il détermine sur les diagrammes immunoélectrophorétiques et par son immunogénicité privilégiée lors de l'immunisation expérimentale du lapin.

Les résultats mentionnés sur le tableau IV (AFCHAIN, 1970), montrent, pour différents lapins et avec deux modes d'immunisation possibles, l'apparition précoce du composant n°5 de T. cruzi dans les immunsérums expérimentaux. D'ailleurs, l'immunogénicité privilégiée et la spécificité du composant remarquable n°5 de T. cruzi seront envisagées ultérieurement lors des infections expérimentales et naturelles (chapitres 5.1. et 6.1.1.).

3.2.1.4. Stabilité antigénique en culture

Connaissant la structure antigénique des composants solubles de T. cruzi Tehuantepec en culture sur milieu GLSH, deux questions capitales étaient à résoudre :

- 1°) Au cours de ses passages in vitro sur ce milieu, la souche conserve-t-elle la même structure antigénique ?
- 2°) En présence d'une source alimentaire autre que le sérum de veau, la souche exprime-t-elle la même structure antigénique ; autrement dit, les composants immunochimiques du parasite sont-ils indépendants des conditions d'entretien de la souche ?

● Stabilité antigénique de T. cruzi Tehuantepec au cours de son maintien in vitro

Au cours de 3 ans de culture continue, plusieurs H.I.S. ont été récoltés chez des lapins immunisés à l'aide de lots distincts d'extraits antigéniques. La comparaison immunoélectrophorétique et surtout les épreuves d'absorption, contrôlées en macro-double diffusion (figure 24, A) confirment que la structure antigénique initiale du parasite est restée qualitativement inchangée tout au long de cette culture prolongée. Seules quelques différences quantitatives peuvent être observées entre différents lots, sans doute inhérentes à la préparation des extraits antigéniques.

Ainsi, les formes de culture apparaissent antigéniquement stables au cours de leur maintien in vitro.

● T. cruzi Tehuantepec soumise à des conditions de culture différentes

La souche T. cruzi Tehuantepec, cultivée depuis 15 ans en milieu GLSH au sérum de veau, a été transférée en milieu GLSH au sérum de lapin décomplémenté (Lapin D').

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 Antigène T.cruzi "frais" Immunisation par voie "sous-claviculaire".	2e semaine	+	+	+		+								
	4e semaine	+	+	+	+	+	+	+			+			
	5e semaine	+	+	+	+	+	+	+	+		+			
Lapin n° 508 Antigène T.cruzi "frais" Immunisation par voie "sous-cutanée".	1e semaine	+	+											
	2e semaine	+	+	+	+	+								
	3e semaine	+	+	+	+	+	+				+			
Lapin n° 521 Antigène T.cruzi "frais" Immunisation par voie "sous-cutanée".	1e semaine	+	+	+										
	2e semaine	+	+	+		+							+	
	3e semaine	+	+	+	+	+							+	
	4e semaine	+	+	+	+	+	+		+		+		+	
	5e semaine	+	+	+	+	+	+	+	+		+		+	
Lapin n° 489 Ant. T.cruzi Wallace Immunisation par voie "sous-claviculaire".	5e semaine	+	+		+		+							
	7e semaine	+	+	+	+	+	+						+	
Lapin n° 447 Antigène T.cruzi 1 % Immunisation par voie "sous-claviculaire".	5e semaine	+	+	+	+					+				
	7e semaine	+	+	+	+		+	+	+					
	9e semaine	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
	11e semaine	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	

Conclusion : "Fraction parasitaire remarquable" = n° 5

Tableau IV

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

Mise en évidence de la "fraction remarquable".

Figure 24

A. Stabilité antigénique de T. cruzi Tehuantepec au cours de son maintien in vitro.

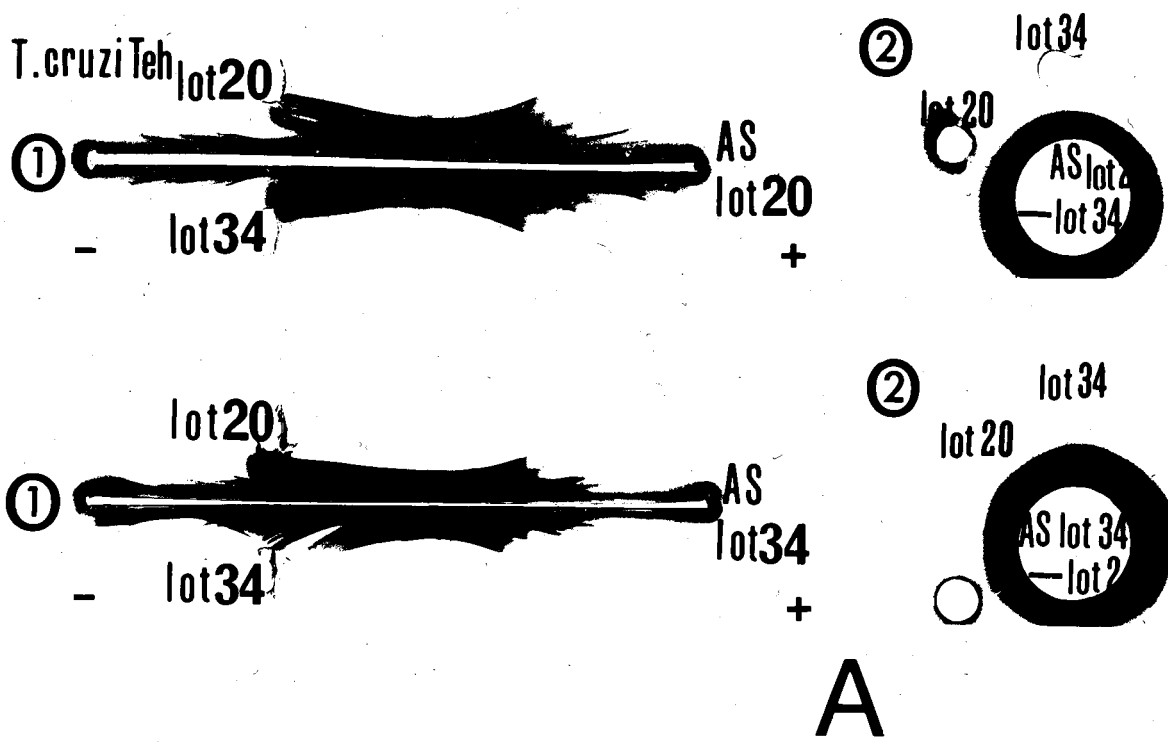
1. La similitude antigénique de deux lots d'extrait de T. cruzi, récoltés dans un intervalle de culture continue de trois ans, semble être indiquée par l'analyse immunoélectrophorétique effectuée à l'aide des hyper-immunsérums respectifs.
2. Les épreuves d'absorption croisée démontrent que l'extrait soluble du lot 34 est resté antigéniquement identique à celui du lot 20.

B. Stabilité antigénique de T. cruzi Tehuantepec soumise à des conditions de culture différentes.

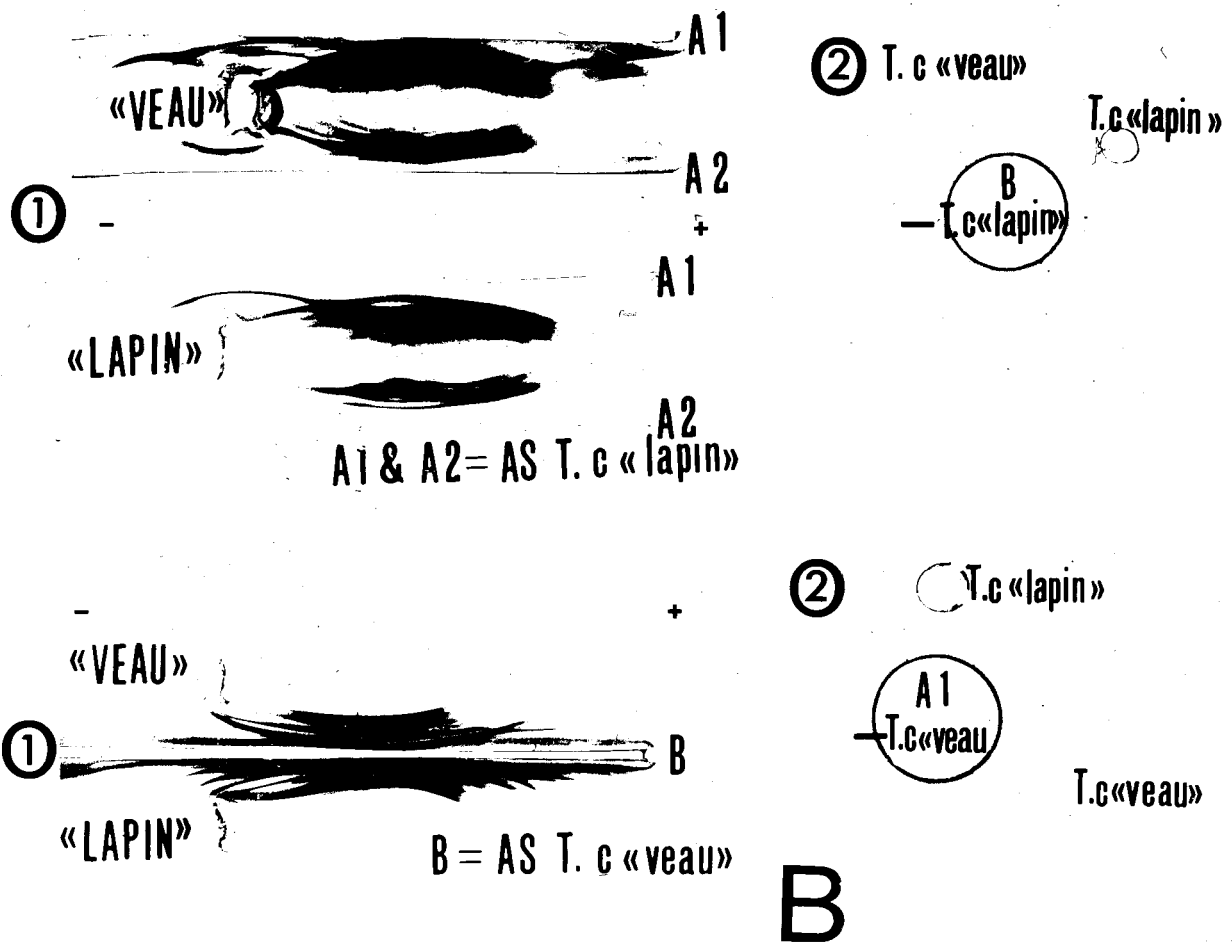
1. L'analyse immunoélectrophorétique des parasites, cultivés en milieu GLSH au sérum de lapin décomplémenté, semble présenter des différences qualitatives ou quantitatives par rapport aux parasites cultivés en milieu GLSH au sérum de veau.

Néanmoins, ces éventuelles différences dans le profil immunoélectrophorétique résultent 1°) d'une migration électrophorétique trop importante des extraits antigéniques lors de la réalisation des immunoélectrophorèses et 2°) d'une méthodologie différente lors des immunisations expérimentales ; l'H.I.S. anti-T. cruzi, récolté sur GLSH au sérum de veau, a été obtenu par immunisation classique sous-scapulaire tandis que l'H.I.S. anti-T. cruzi, récolté sur GLSH au sérum de lapin, a été réalisé selon l'immunisation préconisée par VAITUKAITIS et al..

2. En effet, les épreuves d'absorption croisée démontrent l'isologie immunochimique entre ces deux extraits des formes de culture de T. cruzi.



T. cruzi Teh. in vitro sur sérum de :



L'adaptation de cette souche à une autre source sérique fut très longue et progressive. Après deux ans d'exaltation par passages successifs, des cultures massives ont été finalement réalisées et fournissent l'antigène "T. cruzi Tehuantepec sérum de lapin d'" (Tc Teh. "Lapin") et les H.I.S. correspondants.

La comparaison immunochimique des deux extraits antigéniques solubles par les épreuves d'absorption croisée à l'aide des deux H.I.S. correspondants a permis d'observer une parfaite isologie immunochimique malgré des conditions différentes de culture (figure 24, B).

Ces résultats montrent la parfaite stabilité antigénique de T. cruzi en dépit de la diversification des conditions de culture, sous réserve des limitations techniques qu'apporte l'immunoélectrophorèse, qui n'analyse que les seuls extraits aqueux solubles.

3.2.2. Structure antigénique parasitaire de T. rangeli en culture in vitro

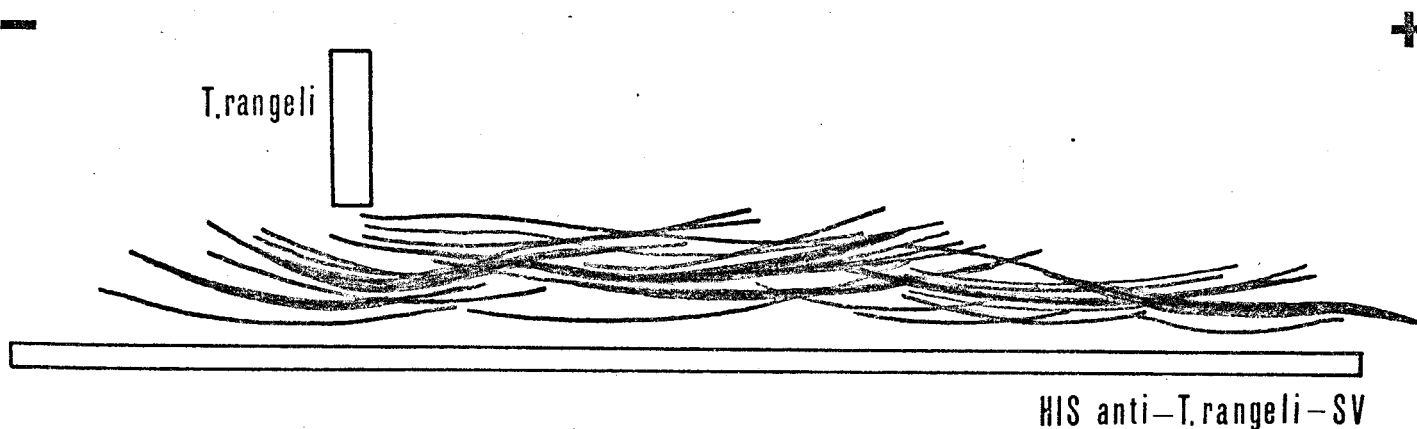


Figure 25 : Structure antigénique parasitaire des formes de culture de T. rangeli.

La structure antigénique, en immunoélectrophorèse, des formes de culture de T. rangeli est aussi complexe que celle de T. cruzi. Des H.I.S. anti-T. rangeli, absorbés par les protéines du milieu de culture et opposés aux extraits homologues, révèlent un minimum de 27 composants antigéniques parasitaires (figure 25).

3.2.3. Salivaria : T. b. gambiense (ELIANE). Structure antigénique des formes de culture et des formes sanguicoles

L'analyse immunoélectrophorétique, pratiquée sur les meilleurs H.I.S., permet de révéler avec précision la structure antigénique de chacun des stades évolutifs (AFCHAIN et al., 1975a).

- Les immunoélectrophorégrammes, en réaction homologue trypanostigotes de culture - H.I.S. anti-trypanostigotes de culture, permettent de déceler un minimum de 29 composants antigéniques de nature parasitaire (figure 26, A).

- Les trypanostigotes sanguicoles révèlent, de la même manière en réaction homologue, une structure antigénique complexe, constituée par un minimum de 25 composants antigéniques de nature parasitaire (figure 26, B).

Le diagramme immunoélectrophorétique B, obtenu à l'aide d'un extrait antigénique de la population clônée de sérotype LiTat-1 opposé à un H.I.S. homologue, s'avère à première vue différent de la structure antigénique des formes de culture (figure 26, A). Un extrait des formes sanguicoles de la population clônée de sérotype LiTat-2, opposé à l'H.I.S. anti-LiTat-1, ne permet pas de révéler les arcs majeurs cathodiques observés en réaction homologue (figure 26, C).

Ainsi, la comparaison de ces trois diagrammes met en évidence des différences soit qualitatives, soit quantitatives, localisées principalement au niveau de la zone cathodique ; elles nous conduiront à la caractérisation d'antigènes spécifiques de stade et de type antigénique.

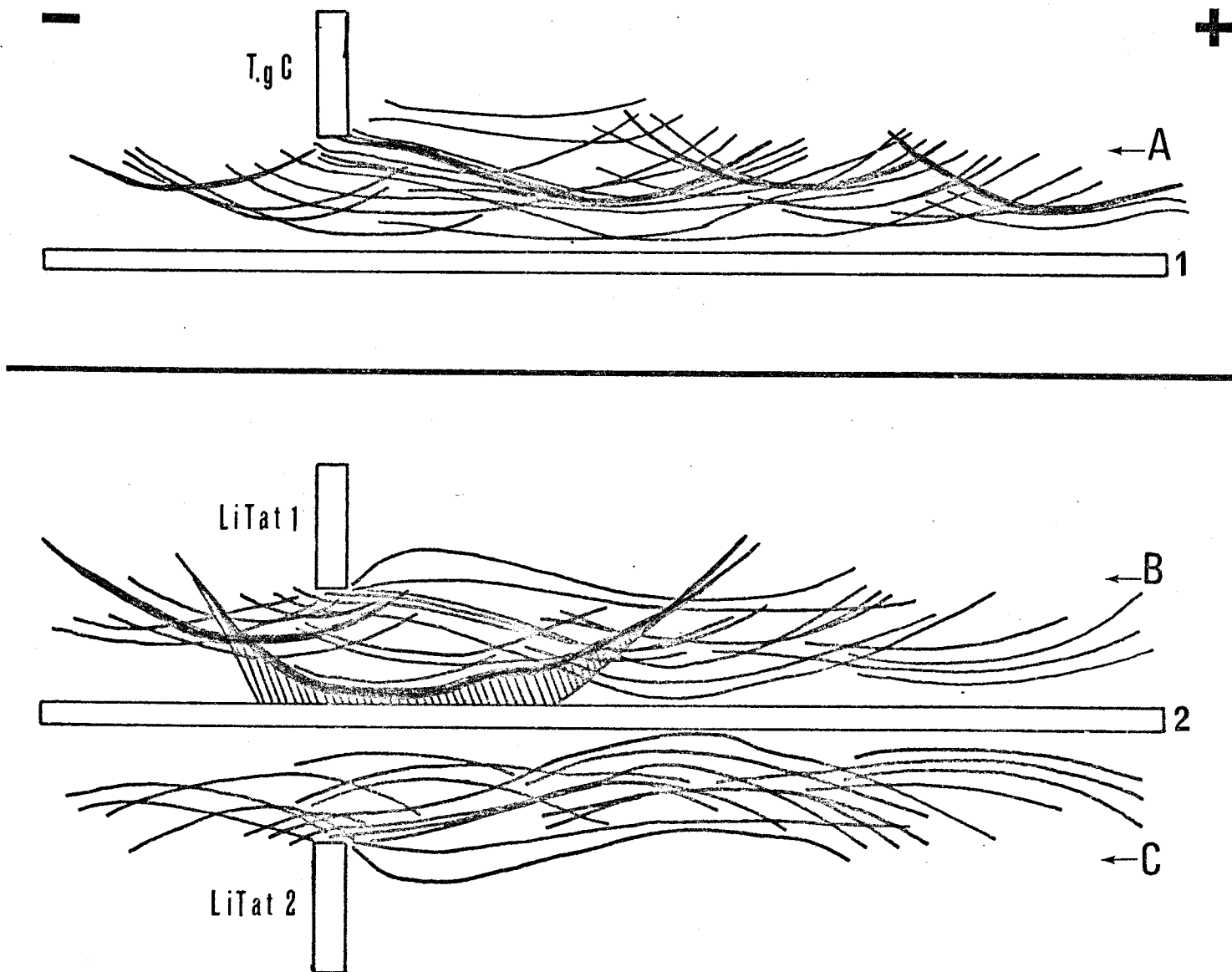


Figure 26 : Structure antigénique parasitaire des formes de culture et des formes sanguicoles de T. b. gambiense ELIANE.

Tg.C = extrait de T. gambiense, formes de culture ;

LiTat-1 et LiTat-2 = extraits de T. gambiense, formes sanguicoles ;

1 = H.I.S. anti-T. gambiense, formes de culture (- sérum de veau)

2 = H.I.S. anti-T. gambiense LiTat-1, formes sanguicoles (- sérum de rat)

3.2.4. Leishmania donovani en culture in vitro

L'étude antigénique de l'espèce L. donovani, souche ITMAP 263, est constituée, comme pour T. cruzi, par l'analyse de la structure antigénique parasitaire, par la mise en évidence de composants "remarquables" par leur immunogénicité et par la démonstration de la stabilité antigénique en culture (LE RAY et al., 1976a, 1976b).

3.2.4.1. Structure antigénique parasitaire

Les difficultés d'obtention des formes parasites du vertébré (micromastigotes toujours intracellulaire), ont limité les études analytiques aux formes promastigotes de culture. Les résultats obtenus concordent avec les informations acquises à propos des trypanosomes étudiés précédemment. L'analyse immunoelectrophorétique de notre souche de L. donovani objective la présence d'un minimum de 28 composants antigéniques d'origine parasitaire (figure 27). Cette mosaïque antigénique témoigne de la très grande complexité immunostructurale des Leishmania.

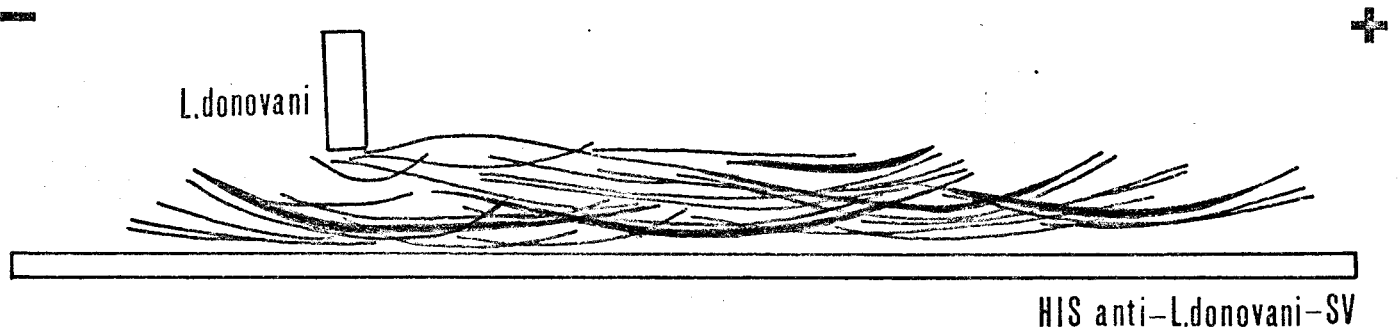


Figure 27 : Structure antigénique parasitaire des formes de culture de L. donovani ITMAP 263.

3.2.4.2. Mise en évidence des composants "remarquables" n°4 et 24

Les composants n°4 et 24, correspondant aux arcs dénommés a et b dans une publication antérieure (LE RAY et al., 1973b), sont remarquables par leur immunogénicité. En effet, ils déterminent l'apparition précoce d'anti-

corps précipitants au cours de l'immunisation expérimentale du lapin à l'aide d'un broyat de formes promastigotes en absence de toute substance adjuvante (figure 28). Nous montrerons ultérieurement (6.1.2.) que cette immunogénicité privilégiée se manifeste également au cours de l'infection naturelle.

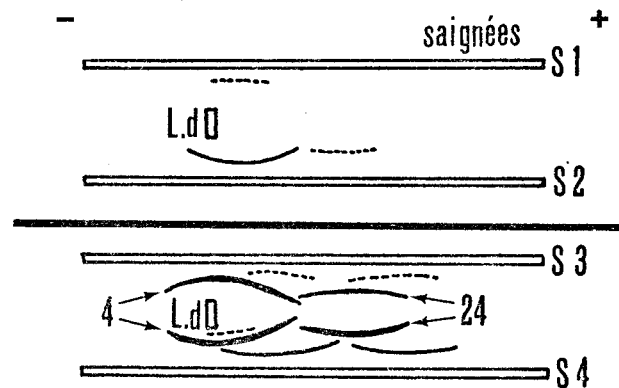


Figure 28 : Apparition précoce des anticorps précipitants, correspondant aux composants n°4 et 24 de *L. donovani*, au cours de l'immunisation cinétique expérimentale du lapin.

3.2.4.3. Stabilité antigénique au cours du maintien *in vitro*

Différents H.I.S. ont été produits par immunisation des lapins à l'aide de lots distincts d'extraits antigéniques, obtenus au cours de deux ans de culture continue de la souche *in vitro*.

La comparaison immunoélectrophorétique menée par épreuves d'absorption croisée confirme que la structure antigénique de *L. donovani* est restée qualitativement inchangée durant toute cette période (figure 29, A). Cependant, il faut souligner de très importantes variations quantitatives entre les différents lots de *L. donovani* que nous attribuons aux conditions de culture des protozoaires.

En conclusion, ces résultats établissent la stabilité antigénique des composants solubles des formes promastigotes de *L. donovani* au cours de leur maintien *in vitro*.

- 3.3. CONCLUSIONS : - Notion de mosaïque antigénique complexe, stable au cours du maintien in vitro
- Immunogénicité privilégiée de certains composants antigéniques

L'analyse antigénique des Trypanosomatidae hétéroxènes (Stercoraria en culture in vitro : T. cruzi ; T. rangeli - Salivaria : T. b. gambiense aux deux stades évolutifs du parasite ; Leishmania : L. donovani en culture in vitro), réalisée par l'exploration des précipitines en gel, révèle la grande complexité antigénique de ces flagellés, et (dans les limites de notre expérimentation) leur stabilité dans le temps en dépit même des modifications éventuelles des milieux de culture.

Leur structure se présente comme une mosaïque d'antigènes d'origine parasitaire et d'antigènes hétérospecifics. Ces derniers sont en grande majorité des antigènes partagés avec le milieu de culture ou l'hôte vertébré et des polysaccharides du type de la substance C. Dans nos conditions expérimentales, les Leishmania présentent des antigènes exprimant des parentés de hasard avec le genre Mycobacterium.

Les diagrammes antigéniques des parasites n'ont été interprétés qu'après un contrôle rigoureux au moyen de tests d'absorption excluant les protéines étrangères venues du milieu de culture ou des sérums d'animaux, et susceptibles de contaminer les antigènes.

Pour chaque espèce de Trypanosomatidae étudiée, existe ainsi un minimum de 25 à 30 composants antigéniques parmi lesquels certains composants particulièrement immunogènes confèrent à chacun des parasites étudiés un "profil" immunoélectrophorétique caractéristique.

Afin de mieux connaître l'immunogénicité et surtout la spécificité des composants remarquables, il était nécessaire d'aborder l'étude précise des parentés interspecifics chez les Trypanosomatidae hétéroxènes.

Figure 29

A. Stabilité antigénique de L. donovani au cours du maintien in vitro.

1. L'analyse immunoélectrophorétique indique leur similitude antigénique.
2. L'épreuve d'absorption croisée démontre que les organismes B, récoltés 24 mois après l'obtention des organismes A, sont restés antigéniquement identiques aux organismes A.

B. Constance antigénique de trois souches de T. cruzi cultivées in vitro.

1. L'analyse immunoélectrophorétique comparative, menée à l'aide d'H.I.S. anti-T. cruzi Tehuantepec et anti-T. cruzi ITMA P 943, suggère la similitude qualitative de ces trois souches d'origines géographique et parasitaire diverses. Cependant, la complexité des immunoélectrophorégrammes ne permet pas d'affirmer l'identité antigénique des souches.

Le composant remarquable n°5 (arc fléché sur la figure 1) est présent chez les trois souches de T. cruzi étudiées.

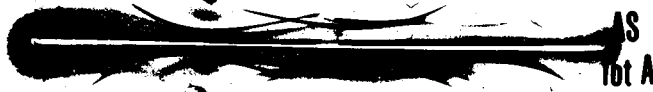
2. Les H.I.S. anti-T. cruzi Tehuantepec, absorbés par des extraits de souches hétérologues, ne révèlent aucune spécificité antigénique chez la souche homologue Tehuantepec.

Une telle démonstration a été aussi effectuée à l'aide de l'H.I.S. anti-T. cruzi ITMA P 943 absorbé par des extraits de souches hétérologues.

①

-L. donovani ITMAP263

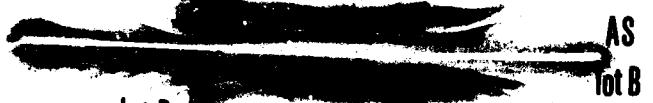
lot A



lot B

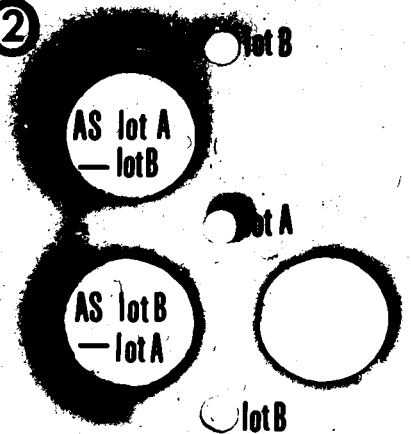
+

lot A



lot B

②



A

①

HIS anti-T. cruzi Teh

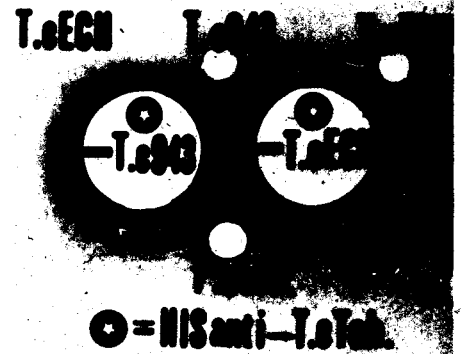
ITMA P 943

T. cruzi
Tehuantepec

ECH

+

②



①

T. cruzi

ITMA P943

IS anti-T. cruzi ITMA P943

Tehuantepec

ECH

+

B

Chapitre 4 : RELATIONS IMMUNOTAXONOMIQUES ENTRE LES TRYPANOSOMATIDAE HETEROXENES

Avant d'étudier les parentés interspécifiques aux différents niveaux taxonomiques du groupe des Trypanosomatidae hétéroxènes, il était nécessaire de connaître, au sein d'une même espèce, la constance ou la variation antigénique entre souches d'origines géographique et parasitaire diverses.

4.1. RELATIONS INTRASPECIFIQUES : SOUCHES D'ORIGINES GEOGRAPHIQUE ET PARASITAIRE DIVERSES

Au cours de cette étude, nous avons observé le protocole expérimental suivant :

- (a) Des extraits antigéniques (deux lots au moins) ont été préparés à partir de souches d'origine géographique distincte, isolées à partir d'hôtes différents si possible.
- (b) Des H.I.S. ont été obtenus contre chacun de ces extraits.
- (c) Les épreuves directes en immunoélectrophorèse ont permis de définir l'importance d'éventuelles différences quantitatives dans les extraits et d'apprécier les différences qualitatives. Seules les épreuves d'absorption croisée et leur contrôle en macro-double diffusion ont permis d'établir avec certitude l'isologie ou la spécificité des composants solubles révélés par précipitation en gel. Ces épreuves ont été menées dans les deux sens (exemple : H.I.S. souche A - Antigène souche B et vis et versa H.I.S. souche B - Antigène souche A).

4.1.1. T. cruzi

Des extraits antigéniques et leurs H.I.S. correspondants ont été préparés à partir de 3 souches de T. cruzi cultivées in vitro dans le même milieu GLSH sérum de veau :

T. cruzi Tehuantepec, isolée de Triatoma au Mexique ;

T. cruzi ITMAP 943, isolée d'un singe Aotus provenant du Brésil ;

T. cruzi ECH, provenant d'un cas humain de l'Argentine.

Cette étude, menée dans les conditions expérimentales décrites précédemment, démontre l'identité complète des structures antigéniques hydro-solubles des formes de culture de ces trois souches, malgré leurs origines géographique et parasitaire différentes (figure 29, B).

Il est à noter que le composant 5, décrit à propos de la structure antigénique de la souche Tehuantepec, est présent chez les deux autres souches de T. cruzi étudiées.

4.1.2. T. b. gambiense

Cette comparaison intraspécifique a concerné aussi bien les formes de culture que les formes sanguicoles.

● Formes de culture. Au moyen d'un protocole expérimental identique au nôtre, LE RAY (1975) a parfaitement démontré la constance antigénique de T. gambiense en culture in vitro à l'aide de deux souches d'origine géographique différente :

- T. gambiense Eliane originaire de Côte d'Ivoire, souche entretenue pendant 22 ans en culture ;
- T. gambiense "Mongo-Bemba", récemment isolée au Zaïre et maintenue in vitro pendant 7 mois.

Nous n'avons pas cru nécessaire de contrôler les résultats démonstratifs de l'auteur.

● Formes sanguicoles. La comparaison des structures antigéniques des formes sanguicoles de deux souches de T. gambiense : T. gambiense Eliane (Côte d'Ivoire), souche clônée, et T. gambiense Feo (Zaïre), souche non clônée, a été effectuée à l'aide des H.I.S. correspondants.

En ne tenant pas compte des antigènes spécifiques du type antigénique (antigènes variables) (chapitre 5.3.2.), les résultats de la comparaison immunoélectrophorétique et des épreuves d'absorption croisée, montrent la constance antigénique des antigènes stables des trypanosomes sanguicoles de ces deux souches géographiquement différentes (figure 30, B). Il est à noter que les antigènes spécifiques du type antigénique (5.3.2.) ne rentrent pas dans la catégorie des antigènes stables considérés ici.

4.1.3. L. donovani

Les formes de culture de deux souches de L. donovani d'origine humaine et provenant d'une même zone géographique (région méditerranéenne) : L. donovani ITMAP 263 (Maroc) et L. donovani TUNIS (Tunisie) ont été comparées et ont présenté (LE RAY et al., 1976b) (figure 30, A) des différences marquées d'ordre quantitatif. Néanmoins, les épreuves d'absorption croisée entre les deux souches ont déterminé un épuisement complet des réactions croisées dans tous les cas.

Ainsi, l'absence de spécificité antigénique d'une souche par rapport à l'autre démontre la constance antigénique des formes de culture de ces deux souches de L. donovani, provenant d'une même zone géographique.

Les faits précédents établissent que le profil immunoelectrophorétique n'est pas affecté qualitativement par l'origine géographique et parasitaire des souches, ni par les modalités de leur entretien au laboratoire. Ceci n'exclut pas l'éventualité de différences antigéniques entre souches, mais indique tout au moins qu'elles ne sont pas accessibles à l'analyse immunoelectrophorétique.

L'ensemble de ces observations nous paraît démontrer la constance antigénique qualitative au sein de l'espèce. Ainsi, la notion d'espèce, basée sur des critères immunochimiques, renforce celle d'espèce zoologique reposant sur des critères taxonomiques classiques. Réciproquement, toute différence immunostructurale devrait pouvoir être considérée comme hautement significative et de valeur taxonomique.

Ayant établi la notion capitale de la constance antigénique des souches d'origine géographique différente, il était dès lors possible d'étudier de manière compréhensive l'étude taxonomique des parentés et des spécificités antigéniques. Mais, avant d'envisager ce problème entre genre Leishmania et Trypanosoma, il était nécessaire de préciser au préalable les relations immunotaxonomiques au niveau du complexe brucei (T. b. brucei, T. b. rhodesiense, T. b. gambiense).

4.2. RELATIONS ANTIGENIQUES AU SEIN DU GROUPE-ESPECE : le complexe brucei

Les structures antigéniques des formes de culture de cinq souches représentatives de T. b. brucei, T. b. rhodesiense et T. b. gambiense

Figure 30

A. Constance antigénique de deux souches de L. donovani cultivées in vitro (souche ITMAP 263 et souche Tunis)

1. L'analyse immunoélectrophorétique ne révèle apparemment pas de différences significatives, compte tenu des variations quantitatives inhérentes aux conditions de culture.
2. La disparition complète des anticorps précipitants, après épreuve d'absorption croisée contrôlée en double diffusion, confirme l'absence de spécificité antigénique d'une souche par rapport à l'autre.

B. Relations entre deux souches sanguicoles de T. b. gambiense.

La comparaison immunoélectrophorétique de deux souches de T. b. gambiense (ELIANE et FEO), maintenues in vivo, montre, à l'aide d'un H.I.S. anti-T. gambiense ELIANE non absorbé (figure 1) ou absorbé par l'extrait hétérologue T. gambiense FEO (figure 2), qu'au stade sanguicole les souches ne diffèrent que par les composants variables spécifiques du sérotype (figure 2). Au niveau des antigènes non soumis au phénomène de variation antigénique (antigènes stables), les souches étudiées ne présentent pas de spécificité.

C. Relations antigéniques de T. (H.) rangeli, de T. (S.) cruzi et de T. b. brucei.

Des 25 composants de T. rangeli, objectivés sur l'immunoélectrophorégramme (1), 16 sont partagés par T. cruzi (3) et 11 par T. brucei (2).

①

* = HIS anti-*L. donovani* ITMAP 263

L. donovani ITMAP 263

L. donovani TUNIS

L. tropica

②

L. d ITMAP 263

L. d TUNIS

L. d TUNIS

A

SOUCHES SANGUICOLES DE T. B. GAMBIENSE =

①

ELIANE

②

ELIANE

FEO

+ - FEO

- T.g. FEO

* = HIS anti- T.g. ELIANE

B

T. rangeli

①

+

T. brucei

②

T. cruzi

③

S. veau

& = A. S. *T. rangeli*-sv

C

ont été analysées, par immunoélectrophorèse et double diffusion, au moyen d'H.I.S. anti-T. b. brucei objectivant un minimum de 34 composants antigéniques.

Les résultats obtenus par absorption des H.I.S. par les antigènes hétérologues (LE RAY et al., 1971), sont repris dans le tableau V et montrent que dans nos conditions expérimentales :

- Les formes de culture de T. b. brucei et T. b. rhodesiense possèdent la même structure antigénique ;
- Cette structure diffère très légèrement mais significativement de la structure de T. b. gambiense (au minimum par deux arcs de précipitation).

Antigènes H.I.S.	Formes de culture de :		
	<u>T.b.brucei</u>	<u>T.b.rhodesiense</u>	<u>T.b.gambiense</u>
H.I.S. <u>anti-T.brucei</u>	34	34	32

Tableau V : Relations immunotaxonomiques au niveau du complexe brucei (comparaisons des formes de culture, nombre minimum d'arcs de précipitation observés en immunoélectrophorèse).

Il faut donc souligner la très faible différence (2 arcs) entre les formes de culture de T. b. brucei et T. b. gambiense. Ces deux sous-espèces possèdent en commun les 9/10ème de leur structure antigénique. Cette très grande isologie de structure des composants solubles, au niveau des formes de culture, nous a conduit à prendre T. b. brucei comme sous-espèce de référence du complexe brucei (sous-genre Trypanozoon).

Disposant de divers H.I.S. très riches en anticorps précipitants (anti-T. cruzi, -T. rangeli, -T. brucei, -L. donovani) et d'extrait soluble de parasites :

- 1°) du genre Trypanosoma :
- Stercoraria { sous-genre Schizotrypanum : T. cruzi, T. dionisii
 - { sous-genre Herpetosoma : T. rangeli
 - Salivaria { sous-genre Trypanozoon : T. b. brucei

2°) du genre Leishmania :

- . espèces parasites de l'homme : L. donovani, tropica,
mexicana
- . espèce parasite de Mammifères sud américains : L. enrietti
- . espèces parasites de Reptiles africains : L. adleri,
tarentolae,

nous avons pu comparer les parentés immunostructurales 1°) au sein des Stercoraria, 2°) au sein des Leishmania, puis 3°) entre Salivaria, Stercoraria et Leishmania.

L'étude des parentés antigéniques et l'établissement de l'indice d'isologie antigénique des parasites ont été effectués dans les conditions décrites précédemment (chapitre 2.5.2.), à savoir par épreuve comparative directe en immunoélectrophorèse, par absorption croisée (contrôlée en micro-double diffusion, et confirmée en macro-double diffusion), et par caractérisation des spécificités antigéniques en immunoélectrophorèse.

Dans tous les cas, existe une complémentarité parfaite, par rapport au nombre de composants totaux d'un H.I.S., entre le nombre des composants communs et celui des composants spécifiques, observés après absorption croisée pratiquée à l'aide de l'espèce hétérologue ; ceci, bien entendu, compte tenu des difficultés de lecture des immunoélectrophorégrammes, avec une marge de plus ou moins 1 à 2 arcs de précipitation.

En dépit des H.I.S. de réactivité inégale (par exemple en réaction homologue : 34 composants pour T. brucei, 30 pour T. cruzi), le nombre d'arcs de précipitation, en réaction directe et après absorption, peut différer très légèrement (exemple : T. brucei/anti-T. cruzi: 10 arcs ; T. cruzi/anti-T. brucei : 13 arcs). Mais dans ce cas, l'indice d'isologie des composants solubles, calculé par le rapport $\frac{\text{Nbre de composants communs}}{\text{Nbre de composants totaux}}$ reste le même.

Dans ces conditions rigoureuses, l'analyse des réponses de plusieurs H.I.S. opposés à plusieurs lots d'antigène, démontre que l'indice d'isologie calculé représente une approche vraiment qualitative des parentés immunostructurales des composants solubles.

L'énoncé successif du nombre de composants communs entre deux espèces, puis des composants spécifiques par rapport à l'espèce hétérologue, joint au calcul de l'indice d'isologie des composants solubles, répété pour les 4 H.I.S. et les 10 antigènes d'espèces différentes, risque d'alourdir inutilement l'exposé de nos résultats. Aussi, nous contenterons-nous de fournir ces derniers sous forme de tableaux synthétiques et de les commenter sans passer par toutes les étapes intermédiaires du protocole expérimental. Ce travail a

1.4. du point de vue technique :

les points essentiels de l'ouvrage : le document principal

est le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

et les annexes de l'ouvrage ont été publiés : le rapport

d'ailleurs été décrit en détail dans des publications antérieures (AFCHAIN et al., 1973 ; LE RAY et al., 1976b et dans la thèse de Doctorat d'Etat de LE RAY, 1975) ; il a été en effet effectué en parallèle avec le laboratoire de Protozoologie d'Anvers, et l'un contrôlant l'autre, tous les résultats ont été concordants.

La figure 30 (C) illustre une épreuve directe de comparaison, en immunoélectrophorèse, entre les espèces T. rangeli, T. cruzi et T. brucei.

4.3. RELATIONS AU SEIN DE LA SECTION : les trypanosomes Stercoraria

● Nombre de composants communs (n) et indices d'isologie (i) observés entre Stercoraria, à l'aide d'H.I.S. anti-T. (S.) cruzi.

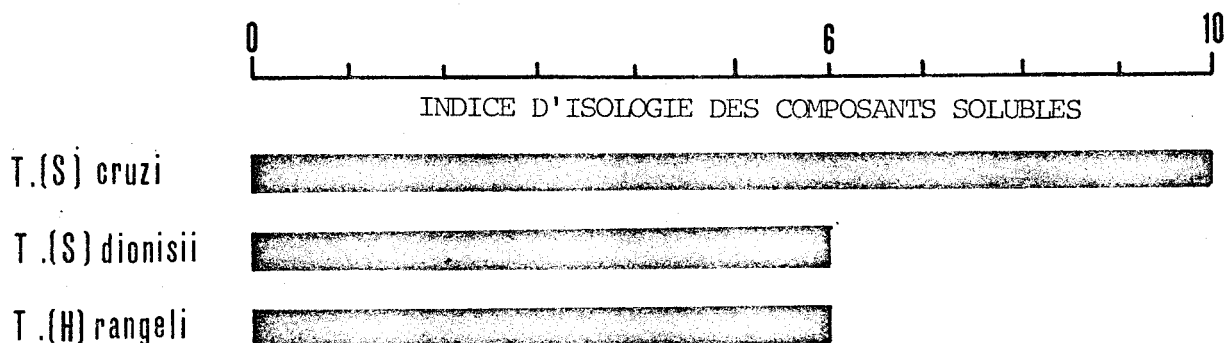
	(<u>T. (S.) cruzi</u>	:	sous-genre	:	espèce)		
	(:	<u>T. (H.) rangeli</u>	:	<u>T. (S.) dionisii</u>)		
	(H.I.S.	:	30	:	n = 18	:	n = 16)
	(anti- <u>T. cruzi</u>	:	i = 1,0	:	i = 0,6	:	i = 0,6)
	(:		:		:)

● Nombre de composants communs (n) et indices d'isologie (i) observés entre Stercoraria, à l'aide d' H.I.S. anti-T. (H.) rangeli.

	(:	sous-genre	:)		
	(<u>T. (H.) rangeli</u>	:	<u>T. (S.) cruzi</u>	:	<u>T. (S.) dionisii</u>)		
	(H.I.S.	:	25	:	n = 16	:	n = 14)
	(anti- <u>T. (H.) rangeli</u>	:	i = 1,0	:	i = 0,6	:	i = 0,6)
	(:		:		:)

Ces deux tableaux montrent des résultats sensiblement analogues avec deux H.I.S. d'espèce différente. Etant donné l'importance de T. cruzi en parasitologie humaine, nous prendrons la structure antigénique de cette espèce comme structure de référence. Les parentés antigéniques des extraits solubles des trois espèces T. (S.) cruzi, T. (S.) dionisii, T. (H.) rangeli peuvent être représentées graphiquement par l'histogramme suivant :

Figure 31 : Parentés antigéniques de T.(S.)cruzi avec d'autres trypanosomes Stercoraria.



Ces résultats permettent de préciser que, au sein des Stercoraria, les parentés entre ces trois espèces concernent environ les six dixièmes des composants identifiés. Ceci met en évidence tout à la fois l'homogénéité immunostructurale de la section des Stercoraria, et la personnalité importante de ces structures à un niveau taxonomique peu élevé, puisqu'environ quatre dixièmes des composants objectivés paraissent spécifiques d'espèce.

Ces parentés sont-elles réparties au hasard et intéressent-elles l'ensemble des composants, ou sont-elles phylétiquement communes à ces trois espèces ? Pour le définir, nous avons absorbé les H.I.S. anti-T.cruzi et -T.rangeli par les antigènes hétérologues ; le tableau VI résume les résultats obtenus après absorption.

Ainsi des parentés antigéniques communes, concernant environ la moitié de la structure antigénique, sont partagés par ces trois espèces. Elles constituent sans doute un patrimoine antigénique commun conservé lors de la différenciation phylogénique de ces espèces.

		Nombre de composants restant partagés avec :		
H.I.S.	Absorption par	<u>T. (S.) cruzi</u>	<u>T. (H.) rangeli</u>	<u>T. (S.) dionisii</u>
	<u>T. (H.) rangeli</u>	15	-	2
anti- <u>T. (S.) cruzi</u>	<u>T. (S.) dionisii</u>	13	1	-
	<u>T. (S.) cruzi</u>	-	13	0
anti- <u>T. (H.) rangeli</u>	<u>T. (S.) dionisii</u>	2	12	-

Tableau VI : Parentés immunotaxonomiques spécifiques entre *Stercoraria*, déterminées après absorption des H.I.S. par les organismes hétérologues.

4.4. RELATIONS AU SEIN DU GENRE : le genre *Leishmania*

Les organismes de référence sont les promastigotes de culture de *L. donovani* souche ITMAP 263. A l'aide d'H.I.S. homologue objectivant 29 composants antigéniques, ont été analysées les parentés de *L. donovani* vis-à-vis de six autres espèces de *Leishmania*. Ces différentes espèces maintenues *in vitro* peuvent être réparties en quatre groupes :

- (a) le groupe des *Leishmania* humaines de l'Ancien Monde, c'est-à-dire le complexe *donovani-tropica*, soit *L. donovani* : deux souches méditerranéennes (ITMAP K263 et TUNIS), et *L. tropica* : souche humaine d'Iran, forme *minor* (D)
- (b) le groupe des *Leishmania* humaines d'Amérique Latine représenté par : *L. mexicana* (LONDON - L11)
- (c) le groupe des *Leishmania* de mammifères n'infectant pas l'homme, représenté par *L. enrietti*
- (d) le groupe des *Leishmania* de Reptiles africains, représenté par *L. adleri* (LRC-L123) et *L. tarentolae senegalensis* (G10).

Les indices d'isologie (i) des composants solubles rassemblés dans le tableau VII et synthétisés à l'aide de l'histogramme (figure 32) permettent les commentaires suivants :

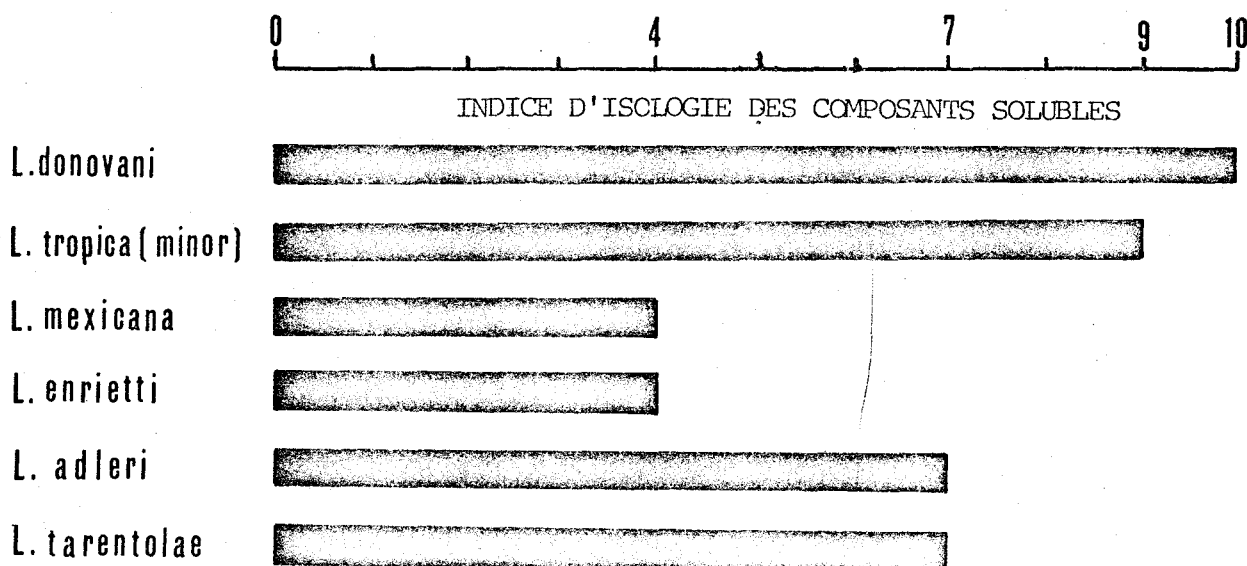
(a) le groupe des Leishmania humaines de l'Ancien Monde (complexe donovani-tropica).

Une grande similarité antigénique s'observe entre L. donovani et L. tropica forme minor. Néanmoins, des différences quantitatives marquées apparaissent entre ces souches.

Qualitativement, l'épreuve d'absorption croisée d'un premier H.I.S. a entraîné un épuisement complet des réactions croisées ; par contre, l'absorption d'un second H.I.S. a permis de mettre en évidence l'existence de spécificités antigéniques chez L. donovani vis-à-vis de L. tropica. Ces spécificités intéressent un nombre réduit d'antigènes, de l'ordre de deux composants immunoélectrophorétiques.

Tableau VII et figure 32 : Parentés antigéniques de L. donovani au sein des Leishmania (Nombre de composants communs -n- et indices d'isologie -i-).

	: <u>L. donovani</u>	: <u>L. tropica</u> minor (Iran)	: <u>L. mexicana</u>	: <u>L. enrietti</u>	: <u>L. adleri</u>	: <u>L. tarentolae</u>
H.I.S. anti-	: 29	: n = 27	: n = 12	: n = 12	: n = 22	: n = 21
<u>L. donovani</u>	: i = 1,0	: i = 0,9	: i = 0,4	: i = 0,4	: i = 0,7	: i = 0,7



Le complexe L. donovani-tropica apparait donc constitué par des organismes antigéniquement très voisins, chez lesquels il peut néanmoins exister des spécificités de l'ordre de 1 à 2 composants, irrégulièrement reconnus par nos H.I.S.

(b) Le groupe des Leishmania humaines d'Amérique Latine.

L. mexicana présente des différences immunostructurales très marquées vis-à-vis de L. donovani. Il s'avère que l'indice d'isologie des composants solubles ($i = 0,4$) traduit une divergence antigénique notable entre L. mexicana et le groupe donovani-tropica.

(c) En ce qui concerne L. enrietti, cette leishmanie présente des différences antigéniques de même importance que celles présentées par L. mexicana vis-à-vis du même organisme de référence que précédemment (indice de quatre dixièmes).

(d) Les résultats obtenus à propos des Leishmania de Reptiles africains sont quelque peu surprenants. Etant donné les différences rencontrées entre L. donovani et les autres Leishmania parasites de Mammifères, on pouvait s'attendre dans ce cas particulier à observer des différences encore plus marquées.

En fait, L. donovani et une souche de L. adleri partagent les sept dixièmes de leurs composants antigéniques. Ces deux espèces se montrent ainsi remarquablement voisines, au point que nous avons cru initialement à une erreur de laboratoire. La souche de L. adleri considérée est celle isolée par HEISCH en 1954 au Kenya à partir d'un lézard Iacerta, injectée à des hamsters par ADLER et réisolée de la rate d'un hamster en 1956 ; trois lignées de cette souche ont été étudiées : deux provenant de la cryobanque de la London School of Tropical Medicine and Hygiene et une lignée communiquée par le Leishmania Reference Center of Jérusalem. Néanmoins, les spécificités de L. donovani, par rapport à L. adleri, sont réduites mais nettes ; elles sont supportées par un minimum de 5 composants. Ces résultats se voient confirmés par l'examen d'une souche sénégalaise de L. tarentolae qui partage également les sept dixièmes des composants totaux de L. donovani.

De ces données se dégagent donc trois niveaux distincts de parentés parmi les Leishmania envisagées :

(a) le complexe donovani-tropica du bassin méditerranéen, partageant des structures antigéniques pratiquement similaires ;

- (b) le complexe des Leishmania parasites de Reptiles africains, présentant des parentés très importantes, supportées par sept dixièmes des structures, avec les Leishmania humaines du bassin méditerranéen ;
- (c) les Leishmania d'Amérique Latine dont les parentés avec L. donovani sont relativement réduites et concernent les quatre dixièmes des structures. Les Leishmanies de l'Ancien Monde formeraient par conséquent un groupe bien homogène, tandis que celles du Nouveau Monde se sépareraient assez nettement du premier.

4.5. PARENTES ENTRE LES TRYPANOSOMES SALIVARIA, LES TRYPANOSOMES STERCORARIA ET LES LEISHMANIA

Dans un travail précédent (AFCHAIN et al., 1973) à l'aide d'H.I.S. anti-T. brucei et anti-T. cruzi, nous avons relevé des indices d'isologie de l'ordre de : 0,4 entre Stercoraria (T. cruzi) et Salivaria (T. brucei), et de l'ordre de 0,3 entre les genres Trypanosoma (T. cruzi, T. brucei) et Leishmania (L. donovani) (tableau VIII).

L'analyse immunoélectrophorétique et les épreuves d'absorption croisée, effectuées avec les H.I.S. anti-L. donovani (LE RAY et al., 1976b) (tableau VIII), confirment parfaitement les résultats antérieurs.

Antigènes :	<u>T. cruzi</u>	<u>T. brucei</u>	<u>L. donovani</u>	<u>L. mexicana</u>
H.I.S.				
anti- <u>T. cruzi</u>	$\frac{30}{i = 1,0}$	$\frac{n = 14}{i = 0,4}$	$\frac{n = 10}{i = 0,3}$	$\frac{n = 11}{i = 0,3}$
anti- <u>T. brucei</u>	$\frac{n = 14}{i = 0,4}$	$\frac{34}{i = 1,0}$	$\frac{n = 10}{i = 0,3}$	NE
anti- <u>L. donovani</u>	$\frac{n = 9}{i = 0,3}$	$\frac{n = 9}{i = 0,3}$	$\frac{29}{i = 1,0}$	$\frac{n = 12}{i = 0,4}$

NE = non effectué

Tableau VIII : Parentés antigéniques (nombre de composants communs -n- et indices d'isologie -i-) entre Trypanosomatidae hétéroxènes.

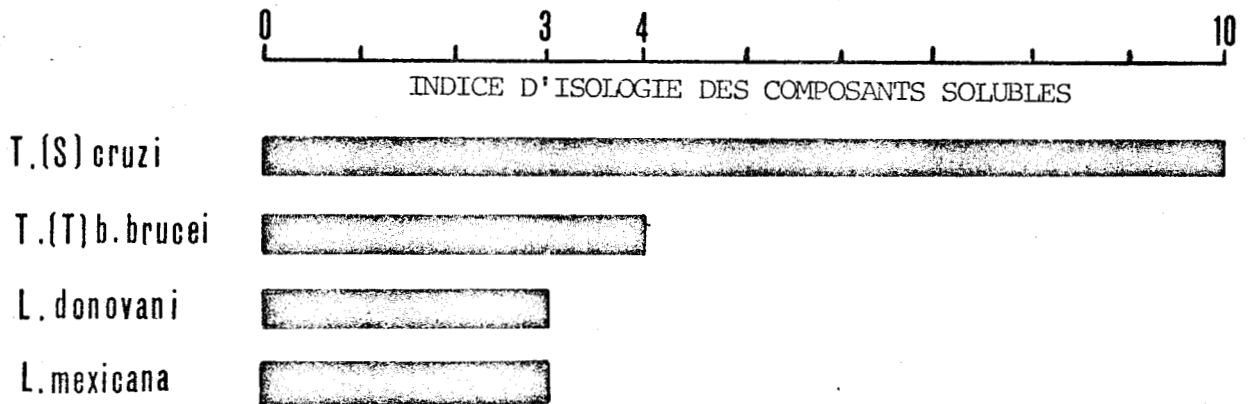


Figure 33 : Isologie antigénique témoinnée par T. cruzi au sein des Trypanosomatidae hétéroxènes.

Qualitativement et à quelques nuances près, ce sont les mêmes composants de L. donovani qui se retrouvent tant chez T. cruzi que chez T. brucei ; ceci se voit entièrement vérifié par les épreuves d'absorption croisée (tableau IX).

En effet, l'absorption d'un H.I.S. anti-T. cruzi et d'un H.I.S. anti-T. brucei par les antigènes hétérologues fait disparaître la quasi-totalité des systèmes précipitants communs.

H.I.S.	Absorption par	Nombre de composants restant partagés avec :		
		<u>T.cruzi</u>	<u>T.brucei</u>	<u>L.donovani</u>
<u>anti-T.cruzi</u>	<u>T.brucei</u>	16	-	1
	<u>L.donovani</u>	19	4	-
<u>anti-T.brucei</u>	<u>T.cruzi</u>	-	20	1
	<u>L.donovani</u>	4	24	-
<u>anti-L.donovani</u>	<u>T.cruzi</u>	-	1	19
	<u>T.brucei</u>	1	-	19

Tableau IX : Parentés immunotaxonomiques spécifiques entre Trypanosomatidae hétéroxènes après absorption des H.I.S. par les organismes hétérologues.

Des résultats similaires ont été obtenus avec l'H.I.S. anti-L. donovani absorbé par les antigènes hétérologues des deux espèces du genre Trypanosoma.

Il apparaît donc que L. donovani et T. cruzi ne sont pas reliés par des affinités particulières malgré leur multiplication intracellulaire.

Il existe donc une structure immunochimique fondamentale commune à ces trois espèces, de l'ordre des trois dixièmes des composants antigéniques totaux. De plus, ainsi qu'il ressort du tableau IX, l'apparentement des Salivaria (T. brucei) aux Stercoraria (T. cruzi) est plus marqué que l'apparentement de ces deux représentants du genre Trypanosoma au genre Leishmania. En effet, 4 composants antigéniques engagés dans les parentés T. cruzi - T. brucei ne se retrouvent pas dans la structure de L. donovani alors qu'un seul composant antigénique est partagé en propre avec L. donovani par chacun de ces deux trypanosomes.

4.6. SYNTHESE DES RELATIONS IMMUNOTAXONOMIQUES

En conclusion, les renseignements apportés par l'analyse immunoelectrophorétique mettent en évidence :

1. l'homogénéité de la section Stercoraria (six dixièmes des composants solubles analysés sont partagés entre T. cruzi, T. dionisii et T. rangeli);
2. l'hétérogénéité du genre Leishmania, au sein duquel trois niveaux distincts d'apparentement peuvent être observés ;
3. l'apparentement sensiblement équivalent entre Salivaria - Stercoraria et Leishmania, correspondant environ à trois dixièmes des structures antigéniques individuelles.

Les hypothèses phylogénétiques, résultant de ces parentés antigéniques et comparées aux données zoologiques, sont exposées dans les "discussions" (chapitre 9.2.1.).

CHAPITRE 5 : LES COMPOSANTS SPECIFIQUES DE T. (S.) CRUZI, de L. DONOVANI ET
DE T. (T.) B. GAMBIENSE

Les composants non concernés par les réactions croisées entre organismes distincts constituent en fait la "personnalité antigénique" des sous-genres Schizotrypanum, Trypanozoon et du genre Leishmania ; personnalité dont le trait le plus saillant est représenté par au moins un composant "remarquable" par son immunogénicité. Nous avons également trouvé au niveau des Trypanosomatidae, l'existence d'un composant antigénique "remarquable" par son immunogénicité et sa spécificité. Ces notions de "personnalité antigénique" ont été initialement décrites chez les helminthes par CAPRON et al. (1968a), CAPRON (1970).

5.1. COMPOSANT N°5 SPECIFIQUE DE T. (S.) CRUZI

Parmi les composants constituant la structure antigénique de T. cruzi accessible à l'analyse immunoélectrophorétique, l'un d'eux se distinguait par le caractère remarquable de son immunogénicité lors de l'immunisation expérimentale du lapin (chapitre 3.2.1.3.). Il s'agit du composant objectivé par l'arc de précipitation n°5. Nous avons montré antérieurement que ce composant était présent chez les trois souches de T. cruzi étudiées, et qu'il ne paraît pas être engagé dans des réactions croisées entre organismes taxonomiquement distincts.

Afin de rendre la démonstration plus évidente, nous avons absorbé les antisérums anti-T. cruzi par des extraits antigéniques de T. dionisii, T. rangeli, T. brucei et L. donovani. Les immunoélectrophorégrammes (figure 34) établissent l'absence de réactions croisées concernant le composant n°5 de T. cruzi.

Bien entendu, nous ne pouvons affirmer la spécificité absolue du composant n°5 de T. cruzi, au sein de la section Stercoraria en l'absence d'une étude complète menée à l'aide des principales espèces de la section (trois sous-genres : Megatrypanum, Herpetosoma, Schizotrypanum représentant 15 espèces environ). Néanmoins, étant donné que seuls T. rangeli et T. cruzi sont parasites de l'homme et que notre but principal est d'ordre diagnostique et immunitaire, nous pouvons dans ces limites considérer le composant n°5 comme "spécifique" de T. cruzi par rapport aux autres Trypanosomatidae parasites de l'homme.

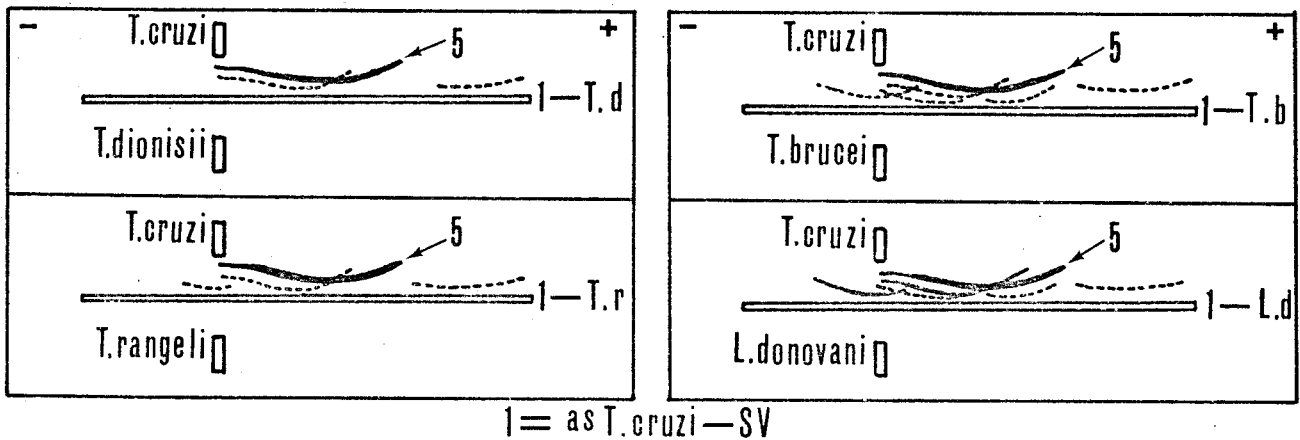


Figure 34 : Réaction homologue des anti-sérums anti-*T. cruzi* épuisés par des extraits d'organismes hétérologues, démontrant la spécificité du composant remarquable n°5 de *T. cruzi*.

5.2. COMPOSANTS N°4 et 24 de *L. DONOVANI*

Les composants n°4 et 24 de *Leishmania donovani*, correspondant aux arcs dénommés a et b dans une publication antérieure (LE RAY et al., 1973b) sont remarquables par leur immunogénicité et par leur spécificité (LE RAY et al., 1976a).

- (a) ils déterminent l'apparition précoce d'anticorps précipitants lors de l'immunisation expérimentale du lapin à l'aide d'un broyat de promastigotes, en absence de toute substance adjuvante (chapitre 3.2.4.2.) ;
- (b) ils témoignent, au sein de la famille des *Trypanosomatidae* d'une spécificité restreinte au genre *Leishmania*, à l'exclusion du genre *Trypanosoma* (*T. brucei*, *T. gambiense*, *T. rhodesiense*, *T. cruzi*) et des bactéries du genre *Mycobacterium*, comme le démontrent les épreuves d'absorption (figure 35).

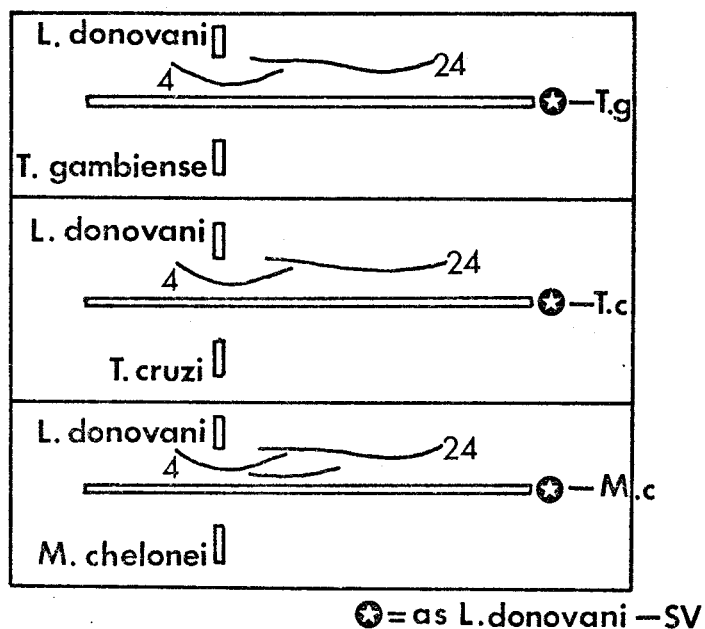


Figure 35 : Réaction homologue des anti-sérums *L. donovani*, après absorption par les extraits antigéniques hétérologues de *Trypanosoma* et de *Mycobacterium*, démontrant que la spécificité antigénique des composants remarquables 4 et 24 est limitée au genre *Leishmania*.

- (c) enfin, au sein du genre *Leishmania*, ces composants ont une spécificité sub-générique :
- (i) ils sont présents chez *L. tropica* et *L. adleri*, tout en présentant une variabilité nette de leur mobilité électrophorétique (figure 36, A) ;
 - (ii) ils sont absents des structures de *L. enrietti* (figure 36, B) ;
 - (iii) seul le composant 24 est présent chez *L. mexicana* (figure 36, B).

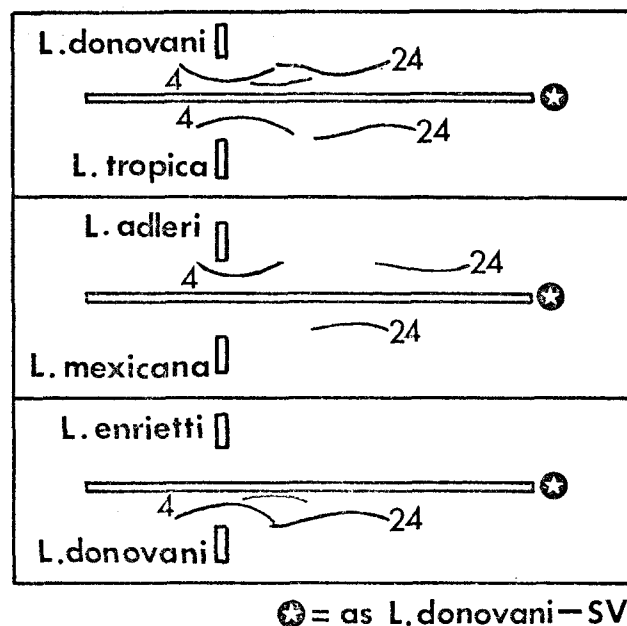


Figure 36 : Spécificité subgénérique des composants 4 et 24 de *L. donovani*.

5.3. COMPOSANTS DE T. (T.) B. GAMBIENSE

L'étude des composants spécifiques de stade et de type antigénique de *T. b. gambiense* (AFCHAIN et al., 1975a) a été conduite avec des H.I.S. anti-formes de culture et anti-formes sanguicoles soumis à des épreuves d'absorption croisée selon le protocole classique (chapitre 2.5.2.). Afin d'éliminer les anticorps dirigés contre les composants provenant du milieu de culture (sérum de veau) ou de l'hôte vertébré (sérum de rat), les H.I.S. ont été systématiquement absorbés au préalable par ces protéines sériques.

5.3.1. Spécificités liées au stade évolutif

La comparaison des trypanostigotes de culture et sanguicoles révèle des différences qualitatives et quantitatives au niveau de la zone cathodique des immunoelectrophorogrammes (chapitre 3.2.3., figure 26).

L'absorption de l'H.I.S. anti-formes de culture par un extrait lyophilisé de formes sanguicoles permet d'observer, dans nos conditions expérimentales, la présence d'au moins quatre composants spécifiques des formes de culture vis-à-vis des formes sanguicoles (figure 37, A).

Inversement, l'absorption de l'H.I.S. anti-formes sanguicoles par un extrait lyophilisé de formes de culture montre l'existence de plusieurs composants antigéniques (au moins quatre) spécifiques des formes sanguicoles (figure 37, B). Ces composants ont tous une localisation cathodique sur les diagrammes immunoélectrophorétiques.

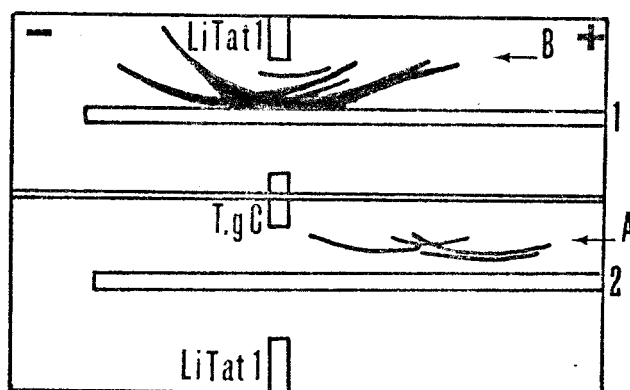


Figure 37 : Composants spécifiques de stade évolutif de T. b. gambiense

- LiTat-1 : extrait antigénique de T.b.gambiense (forme sanguicole du sérotype LiTat-1);
- TgC : extrait de T.b.gambiense, forme de culture ;
- 1 : sérum anti-T.b.gambiense, forme sanguicole du sérotype LiTat-1, absorbé par du sérum de rat et un extrait antigénique de T.b.gambiense, forme de culture;
- 2 : sérum anti-T.b.gambiense, forme de culture, absorbé par du sérum de veau et un extrait antigénique de T.b.gambiense, forme sanguicole du sérotype LiTat-1.

Il existe donc, à chaque stade de T. b. gambiense, plusieurs composants antigéniques spécifiques.

5.3.2. Spécificités liées au type antigénique (antigènes variables)

Après obtention de deux populations sanguicoles clônées représentant respectivement les types antigéniques LiTat-1 et LiTat-2, et des hyperimmunsérums correspondants :

- (a) l'absorption d'un H.I.S. anti-sérotype LiTat-1, par un extrait lyophilisé du sérotype LiTat-2, révèle l'existence de deux composants cathodiques spécifiques du sérotype LiTat-1 (figure 38, A) ;
- (b) réciproquement, après saturation de l'H.I.S. anti-LiTat-2 par LiTat-1, deux antigènes de localisation cathodique s'avèrent spécifiques du sérotype LiTat-2 (figure 38, B).

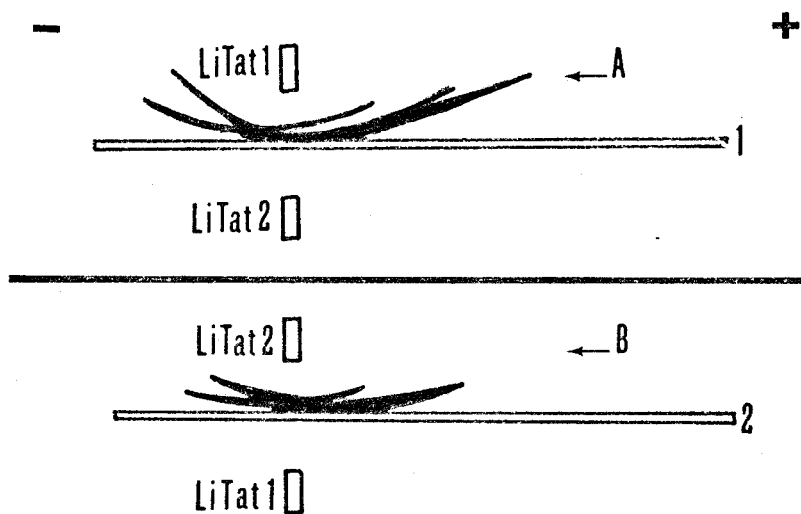


Figure 38 : Composants spécifiques du type antigénique
 - LiTat-1 : extrait antigénique de T.b.gambiense, sérotype LiTat-1 ;
 - LiTat-2 : extrait antigénique de T.b.gambiense, sérotype LiTat-2 ;
 - 1 : sérum anti-T.b.gambiense, sérotype LiTat-1 absorbé par du sérum de rat et un extrait antigénique du sérotype hétérologue LiTat-2 ;
 - 2 : sérum anti-T.b.gambiense, sérotype LiTat-2 absorbé par du sérum du rat et un extrait antigénique du sérotype hétérologue LiTat-1.

Il existe donc au moins, dans chaque population sanguicole de type antigénique distinct, deux composants spécifiques du sérotype. Après les épreuves d'absorption, les contrôles d'épuisement en macro-double diffu-

sion et en particulier, les résultats comparatifs de l'immunoélectrophorèse (figure 38), les deux composants antigéniques spécifiques du sérotype sanguicole LiTat-1 montrent une absence totale d'identité avec les deux composants antigéniques spécifiques du sérotype sanguicole LiTat-2. Ces composants ont la même localisation immunoélectrophorétique chez les deux clones étudiés. Ils expriment la spécificité immunochimique de chaque variant.

5.4. CONCLUSIONS

Parmi les composants antigéniques caractéristiques du profil immunoélectrophorétique d'un parasite donné, les uns reflètent la personnalité antigénique de l'espèce, tandis que d'autres voient leur spécificité liée au stade évolutif.

Ces observations permettent de dégager deux notions distinctes :

- (a) d'une part, en ne considérant que le seul stade évolutif de culture, l'étude comparative des formes de culture des Trypanosomatidae met en évidence des composants remarquables qui sont de véritables témoins taxonomiques du groupe ou de l'espèce considérée.

C'est ainsi que l'étude des formes de culture de T. cruzi et de L. donovani a mis en évidence 1°) le composant antigénique n°5, spécifique de T. cruzi par rapport aux autres Trypanosomatidae étudiés, 2°) plusieurs composants remarquables de L. donovani dont l'un (n°24) paraît spécifique du genre Leishmania et l'autre (N°4) propre au complexe donovani-tropica. N'ont été prises en considération que les seules espèces parasites de l'homme.

- (b) d'autre part, chez une espèce donnée, plusieurs composants sont spécifiques des différents stades et constituent donc des témoins du cycle évolutif complexe du parasite.

C'est ainsi que, chez T. b. gambiense, plusieurs composants sont spécifiques des trypanostigotes de culture, d'autres sont spécifiques des trypanostigotes sanguicoles ; parmi ces derniers deux sont caractéristiques du type antigénique sanguicole et soumis au phénomène de variation antigénique.

Dans le chapitre suivant, consacré au diagnostic immunologique des parasitoses dont nous venons d'étudier les agents étiologiques, nous nous sommes efforcé d'envisager l'intérêt immunologique des composants spécifiques au cours des infections expérimentales et des infections naturelles humaines et animales.

CHAPITRE 6 : INTERET DIAGNOSTIQUE DES ANTIGENES SPECIFIQUES DES TRYPANOSOMATIDAE

L'un des aspects les plus significatifs des relations unissant les parasites à leurs hôtes réside dans la nature et l'intensité des réactions de l'hôte au parasitisme.

Les nombreuses investigations concernant les aspects immunologiques des relations hôte-parasite chez les champignons (BIGUET et al., 1964) et les helminthes (CAPRON et al., 1966) nous ont servi de modèle dans cette étude qui nous a amené à déceler et identifier les précipitines sériques élaborées au cours des infections expérimentales et naturelles dues aux Trypanosomatidae.

6.1. DIAGNOSTIC IMMUNOELECTROPHORETIQUE DES AFFECTIONS HUMAINES A TRYPANOSOMATIDAE

L'étude immunoélectrophorétique des réactions humorales chez des hôtes infectés expérimentalement ou naturellement a l'avantage de proposer une nouvelle technique diagnostique et présente, en outre, l'intérêt d'apprécier l'immunogénicité des composants les plus spécifiques du parasite considéré.

6.1.1. Maladie de Chagas

L'étude, en immunoélectrophorèse, de l'évolution des anticorps précipitants au cours de la trypanosomiase à T. cruzi a été entreprise chez la souris expérimentalement infectée et chez l'homme naturellement contaminé. La localisation des fractions et l'étude de l'ordre d'apparition des précipitines correspondantes a permis de confirmer l'intérêt théorique et pratique du composant n°5 de T. cruzi.

6.1.1.1. Développement des anticorps précipitants au cours de l'infection expérimentale de la souris

Une étude initiale (AFCHAIN et CAPRON, 1971) a été menée avec 50 souris (souche SWISS) infectées par voie intrapéritonéale avec une dose de 2000 trypomastigotes sanguicoles (souche T. cruzi Tulahuen) par souris.

Depuis, cette expérience a été entièrement reproduite avec 50 souris Swiss à la dose de 4000 trypanomastigotes (souche T. cruzi Tehuantepec) par souris. Avec cette deuxième souche de T. cruzi, nettement moins pathogène pour la souris, nous avons obtenu des résultats comparables à ceux de la première expérience. Aussi, nous ne ferons que reprendre brièvement le travail initial dans le but d'établir la cinétique de l'apparition des anticorps précipitants et la caractérisation des composants antigéniques correspondants.

- a) le Tableau X montre le nombre de systèmes précipitants mis en évidence dans les sérums de souris par l'extrait soluble de T. cruzi.

Le nombre moyen de systèmes précipitants se situe entre 7 et 8 du 80ème au 280ème jour ; mais pour deux souris, entre le 220ème et le 280ème jour, nous avons observé 11 précipitines sériques (figure 40, B).

- b) La figure 39 montre le nombre moyen d'arcs de précipitation et la parasitémie en fonction du temps d'infection :

- . en période de parasitémie (entre le 15ème et le 30ème jour), le nombre de systèmes précipitants est presque nul (il y a quelquefois présence de l'arc spécifique n°5 : figure 40, A) ;

- . en absence de parasitémie, pendant la phase chronique de la maladie, le nombre d'arcs de précipitation, révélés par les sérums des animaux infectés, augmente progressivement pour atteindre un niveau très élevé.

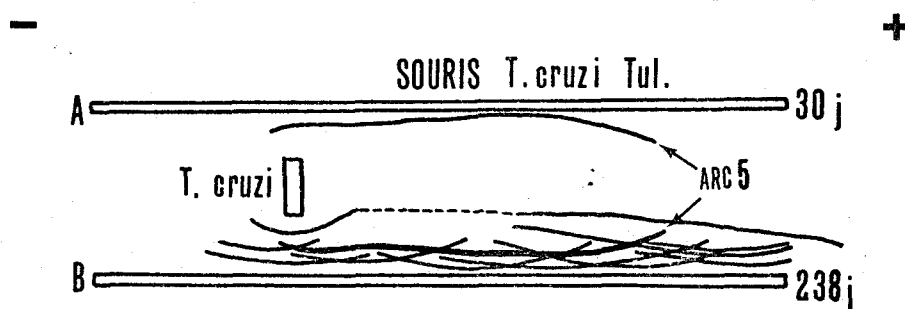


Figure 40 : Anticorps précipitants décelés chez des souris expérimentalement infectées depuis, respectivement, 30 jours (A) et 238 jours (B).

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 X. Nombre de systèmes précipitants mis en évidence en immunoélectrophorèse par l'antigène T. cruzi dans les sérums de souris infectées par T. cruzi et répartis selon la durée de l'infection.

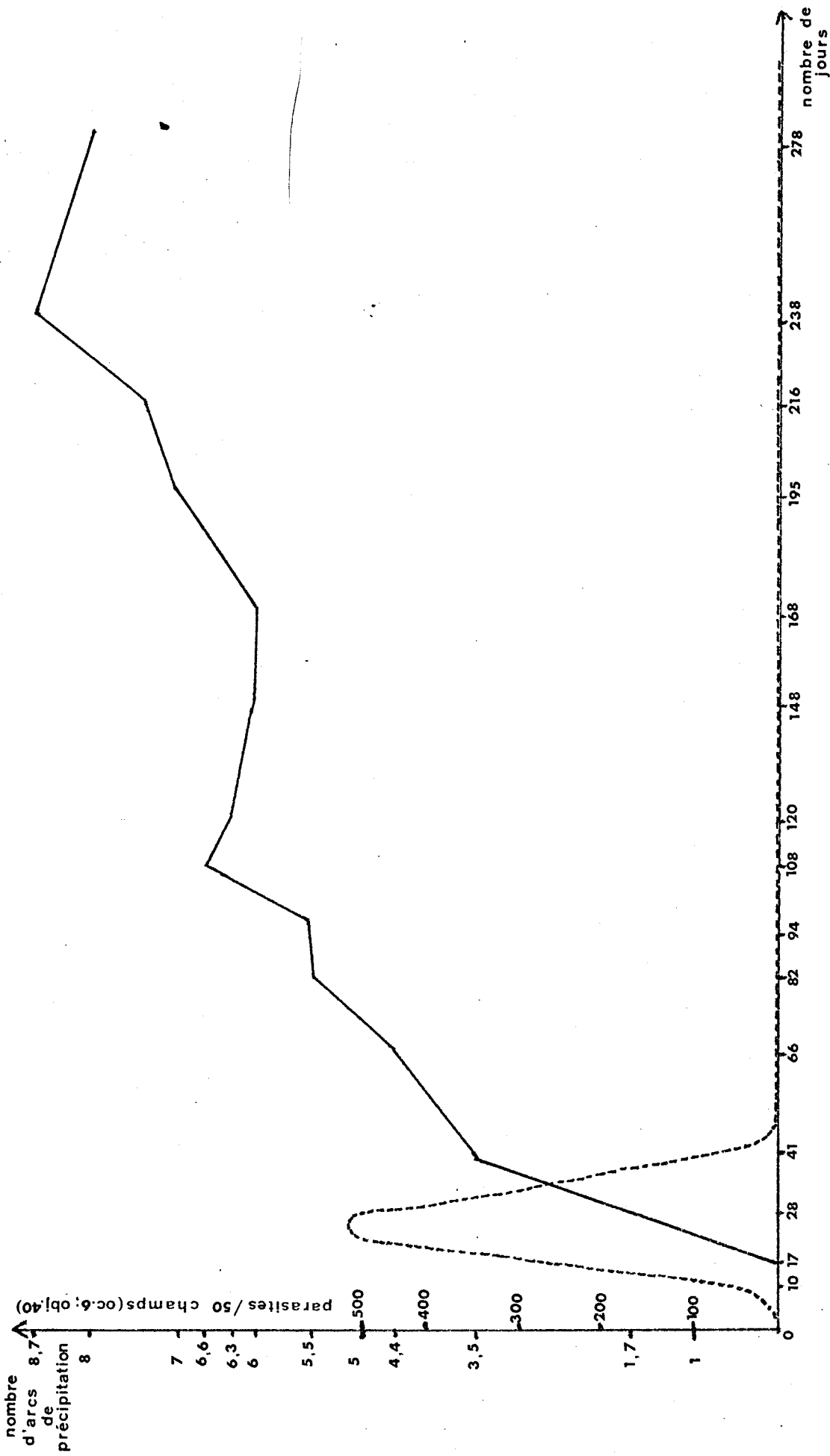


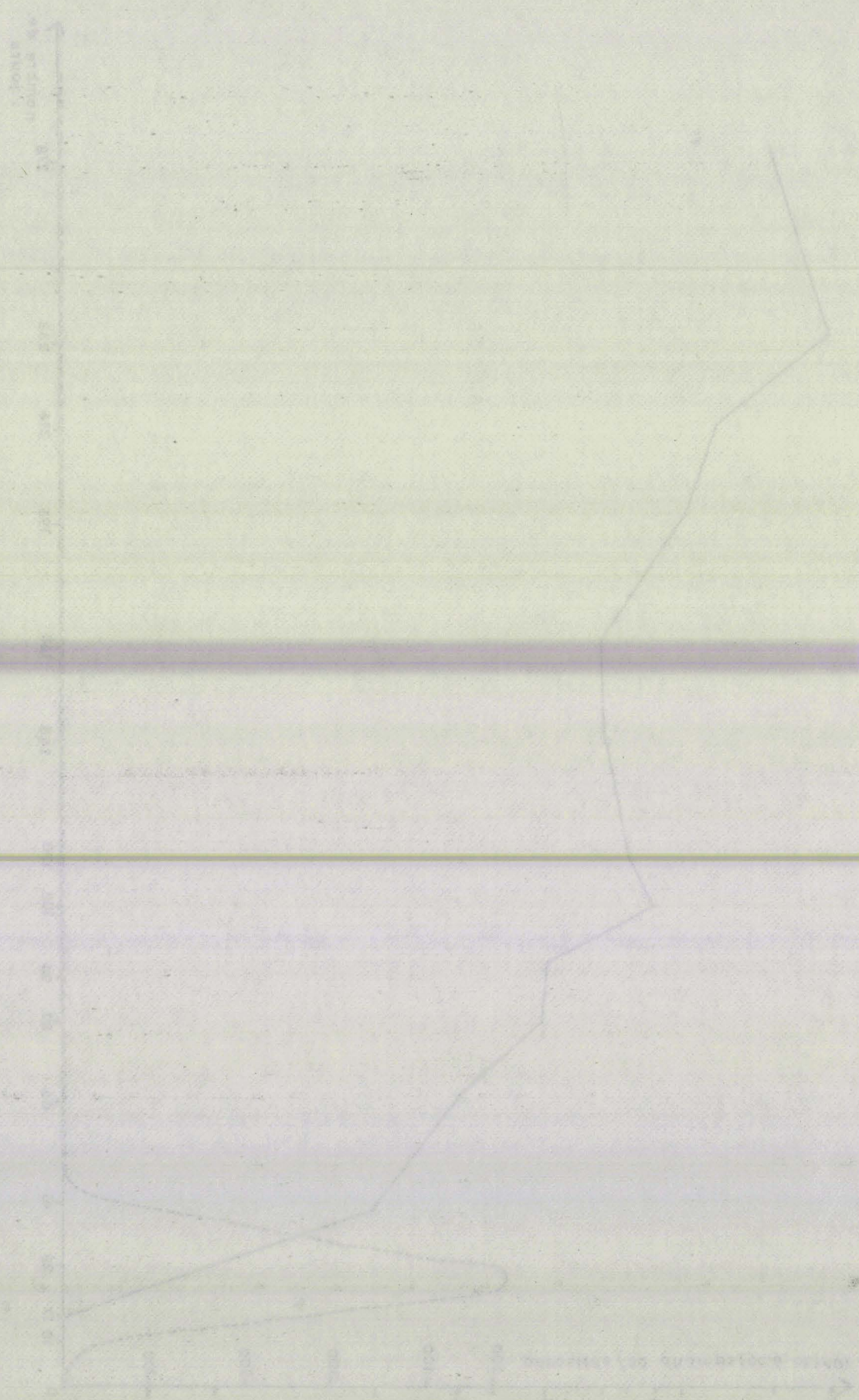
Figure 39.

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

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

Wahlkreis der Bundestagwahl im Saarland (1983) (1983)

1983



Wahlkreis der Bundestagwahl im Saarland (1983)

Les réactions humorales de la souris sont donc relativement importantes au cours de l'infection expérimentale par T. cruzi. Le composant n°5 de T. cruzi, composant le plus représentatif de l'espèce, détermine la production des premières précipitines observées.

6.1.1.2. Diagnostic immunoélectrophorétique de la maladie de Chagas

Nous avons disposé de 3 groupes de sérums de sujets atteints de maladie de Chagas :

- a) 27 sérums de malades confirmés sérologiquement (fixation du complément positive*) et cliniquement :
 - . 10 malades en phase aiguë
 - . 17 malades en phase chronique
- b) 16 sérums de malades à sérologie positive mais sans signes cliniques
- c) 11 sérums de malades suspects à sérologie négative.

L'étude des anticorps précipitants, effectuée en immunoélectrophorèse, fut réalisée en confrontant les divers sérums humains (concentrés au tiers) à l'extrait soluble de T. cruzi. Les tableaux XI, XII, XIII et XIV résument les résultats qu'il fut possible d'obtenir et autorisent les commentaires suivants :

- a) Sérums de malades confirmés sérologiquement et cliniquement (tableau XI : en phase aiguë ; tableau XII : en phase chronique)

En phase aiguë et chronique, on décèle l'existence d'une réaction de précipitation positive dans la totalité des cas (figure 41, A). En phase chronique, il est important de noter la présence presque constante des anticorps produits par le composant n°5 de l'antigène total. Ce composant est également responsable des premiers anticorps décelés au cours de l'immunisation artificielle du lapin et la trypanosomiase expérimentale de la souris (figure 41, B). En phase aiguë, le nombre d'anticorps précipitants est faible (1 à 3 arcs de précipitation) ; par contre, une augmentation significative du taux d'anticorps s'observe dans les sérums de malades en phase chronique (maximum observé : 9 systèmes précipitants).

* Les réactions de fixation du complément ont été réalisées et interprétées par le laboratoire du Professeur PRATA - Bahia (Brésil)

Tableau XI Nombre de systèmes précipitants mis en évidence par l'antigène T. CRUZI dans les sérums de malades confirmés, en phase aigüe.

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

Sérums humains T. cruzi	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	+

Abréviations employées dans les tableaux

Race: M = mulâtre

N = noir

B = blanc

Age: Ad = Adulte

F C' : fixation du complément.

C. H. F. : "congestive heart failure".

M. O. : megaesophage.

Tableau XIII 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 T. cruzi	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	

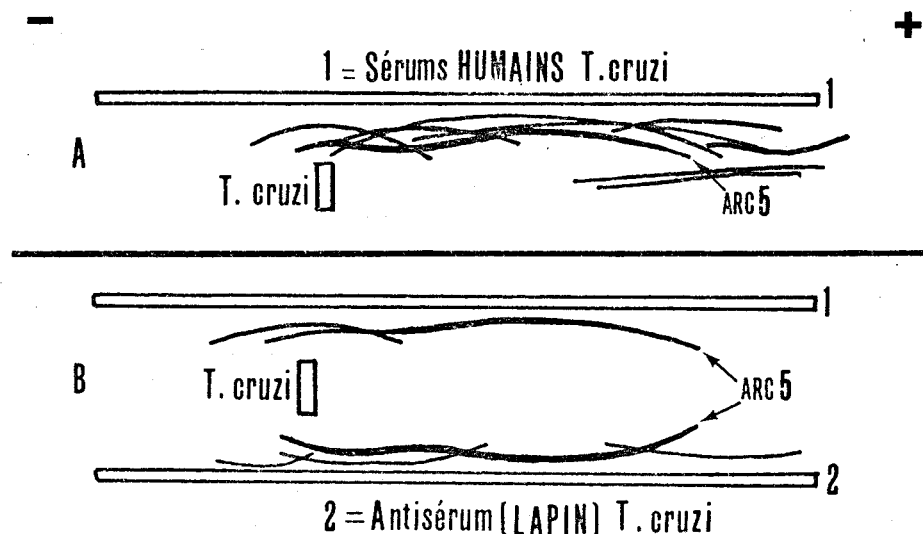


Figure 41 : Systèmes précipitants mis en évidence en immunoélectrophorèse (micro-méthode) par un extrait hydrosoluble de *T. cruzi* dans les sérums de sujets Chagassiques (A et B)

- 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.

b) Sérums de malades à sérologie positive mais sans signes cliniques (Tableau XIII)

Sur les 16 sérums étudiés, nous avons pu révéler des anticorps précipitants dans la moitié des cas. La majorité des réactions positives s'exprime par un ou deux arcs de précipitation dont notamment le composant n°5.

c) Sérums de malades suspects à sérologie négative (tableau XIV)

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

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

Sérums humains <i>T. cruzi</i> .	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	

Ce travail préliminaire (AFCHAIN *et al.*, 1970), réalisé en immuno-électrophorèse, révèle pour la première fois, de manière précise, l'existence d'anticorps précipitants dans le sérum de sujets en phase aiguë de maladie de Chagas et une augmentation significative du taux des anticorps dans les sérums de malades en phase chronique.

La présence pratiquement constante dans les sérums des anticorps correspondant au composant antigénique n°5 de l'antigène total et la haute spécificité des réactions qu'il détermine, démontrent ainsi les possibilités nouvelles de l'immunoélectrophorèse dans le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas.

6.1.2. Leishmaniose viscérale

Dans un premier temps, l'immunogénicité privilégiée des composants 4 et 24 de *L. donovani* a été étudiée chez le hamster expérimentalement infecté et chez le chien naturellement contaminé. Dans un deuxième temps, consacré au kala-azar humain (LE RAY *et al.*, 1973b), nous avons approfondi les observations de RANQUE *et al.* (1969a et b) à l'aide de l'antigène homologue *L. donovani*.

Chiens cas		Immunoélectrophorèse	
		Nbre d'arcs	arcs spécifiques
		4	24
(*1)			
F.	6	-	+
P.	9	-	+
L.	15	+	+
M.	15	+	+
T.	10	+	+
(*2)			
1246	0	-	-
70	9	+	+
1145	1	-	-
1317	2	+	-
1209	8	+	+
36	0	-	-
1267	13	+	+
1142	6	-	+
1324	7	+	+

Tableau XV : Anticorps précipitants anti-*L. donovani* observés dans la leishmaniose viscérale canine parasitologiquement confirmée.

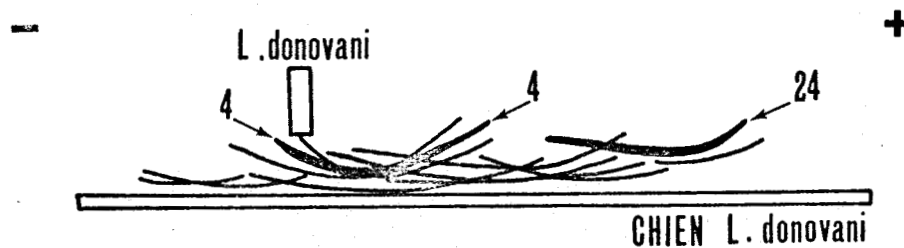


Figure 43 : Analyse immunoélectrophorétique du sérum d'un chien atteint de leishmaniose viscérale confirmée

* Les sérums nous ont été confiés par le Professeur RIOUX (Montpellier) (*1) et le Professeur QUILICI (Marseille) (*2).

6.1.2.1. Les anticorps précipitants chez le hamster expérimentalement infecté et chez le chien naturellement infecté

a) Hamsters. Les composants n°4 et 24 déterminent l'apparition précoce d'anticorps précipitants lors de l'infection expérimentale du hamster. Ils sont reconnus en premier lieu ainsi que l'illustre la figure 42.

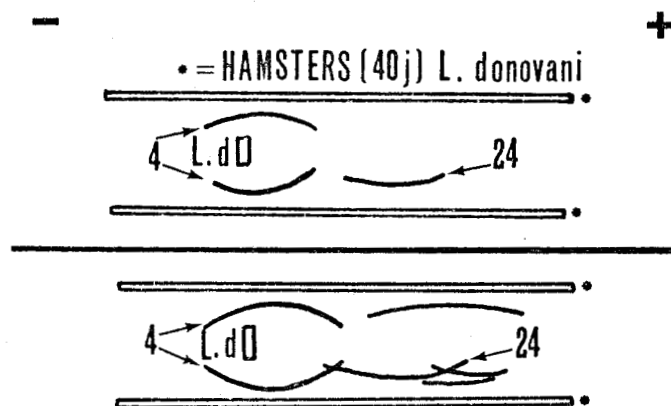


Figure 42 : Apparition précoce des anticorps précipitants correspondant aux composants n°4 et 24 chez le hamster expérimentalement infecté depuis 40 jours par L. donovani.

b) Chiens. Les composants 4 et 24 sont reconnus avec une fréquence élevée par les chiens leishmaniés parasitologiquement confirmés (tableau XV).

Les sérums canins proviennent de chiens dépistés dans le foyer méditerranéen français. L'analyse immunoélectrophorétique de 14 sérums canins s'est révélée positive dans 12 cas et permet d'objectiver de 1 à 15 arcs (figure 43 et tableau XV).

6.1.2.2. Diagnostic immunoélectrophorétique du kala-azar

Notre expérience porte sur l'examen de 18 cas humains. Quantitativement, la fréquence et l'importance des anticorps précipitants élaborés au cours de la leishmaniose viscérale humaine s'avèrent exceptionnellement élevées en comparaison des autres affections parasitaires dues à des protozoaires et à des

helminthes (tableau XVI et figure 44). Des anticorps précipitants ont été révélés dans tous les cas parasitologiquement confirmés. Les composants 4 et 24 sont reconnus avec une fréquence élevée : à propos de ces 18 observations, l'arc 24 a été révélé dans tous les cas et l'arc 4 a été révélé à onze reprises (tableau XVI).

cas humains	Immunoélectrophorèse	
	Nbre d'arcs	arcs spécifiques
		4 24
YL799	7	+ +
YL898	17	+ +
YL979	10	- +
YL1199	6	- +
YL1371	9	- +
YL1372	15	+ +
YL1432	11	+ +
YL1510	12	+ +
YL1716	5	- +
YL477/73	6	- +
ITMA17.530	16	+ +
ITMA21.929	16	+ +
ITMA22.203	4	+ +
ITMA23.421	4	+ +
GG 22.418	6	+ +
GG 22.420	2	- +
GG 22.656	1	- +
GG 23.519	2	+ +

Tableau XVI : Anticorps précipitants anti-*L.donovani* observés dans la leishmaniose viscérale humaine parasitologiquement confirmée

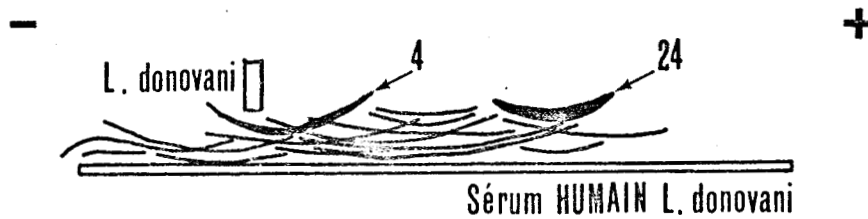


Figure 44 : Analyse immunoélectrophorétique d'un sérum de sujet atteint de kala-azar confirmé.

Ainsi, la constance, l'intensité et surtout la spécificité des réactions d'immunoprécipitation permettent de recommander l'analyse immunoélectrophorétique comme méthode privilégiée dans le diagnostic immunologique du kala-azar. Les résultats obtenus permettent d'attribuer également aux méthodes de précipitation en gel une efficacité certaine dans l'évaluation de l'importance des réservoirs animaux et humains de L. donovani.

Lors des contrôles de populations, le recours à l'immunoélectrophorèse est cependant entravé par des difficultés pratiques (technicité de la méthode et coût en antigène). La micro-double diffusion en gel corrige ces inconvénients ; elle permet d'examiner sur une lame porte-objet trente deux sérums à l'aide d'un milligramme d'extrait antigénique lyophilisé. C'est ainsi qu'une étude en cours, avec le Docteur BEN RACHID de Tunis et portant sur 37 sérums de leishmaniose viscérale infantile confirmés parasitologiquement, nous a permis à l'aide de la micro-double diffusion en gel de poser un diagnostic immunologique dans 91 % des cas (figure 45).

Cette technique, à condition de définir ses limites de spécificité, paraît pouvoir contribuer de manière particulièrement efficace au diagnostic du kala-azar.

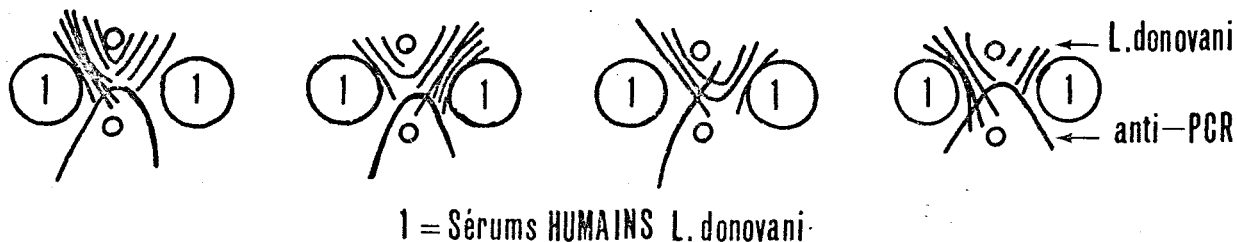


Figure 45 (x2) : Diagnostic immunologique de la leishmaniose viscérale à l'aide de la micro-double diffusion en gel. La réaction immunologique protéine-C réactive du sérum humain-anti-P.C.R. (Difco) révèle la présence d'un état inflammatoire aigu.

6.1.3. Diagnostic immunoélectrophorétique de la maladie du sommeil à *T. b. gambiense*

La caractérisation chez *T. gambiense* d'antigènes spécifiques des formes de culture et des formes sanguicoles nous a conduit à une étude comparative de la valeur diagnostique de ces deux stades évolutifs. Les résultats, menés en immunoélectrophorèse avec les extraits hydrosolubles de trypanomastigotes de culture et de trypanomastigotes sanguicoles, ont porté sur 69 sérums de malades à *T. gambiense* parasitologiquement confirmés.

L'utilisation d'extraits de formes de culture ne permet de révéler qu'un faible nombre de systèmes précipitants (1 à 2) en position anodique sur le diagramme immunoélectrophorétique (figure 46 : 1 → : "arcs anodiques"), de manière inconstante. Par contre, l'emploi d'extraits de formes sanguicoles permet de révéler en plus, de manière quasi-systématique, l'existence d'un nombre limité de systèmes précipitants (1 à 4), tous en position cathodique (figure 46 : 2 → : "arcs cathodiques").

Nous avons testé, à l'aide des antigènes de culture et sanguicoles, les 69 sérums de malades provenant de zones géographiques différentes. Le tableau XVII résume les résultats obtenus, en classant les arcs de précipitation observés suivant leur localisation "anodique" ou "cathodique".

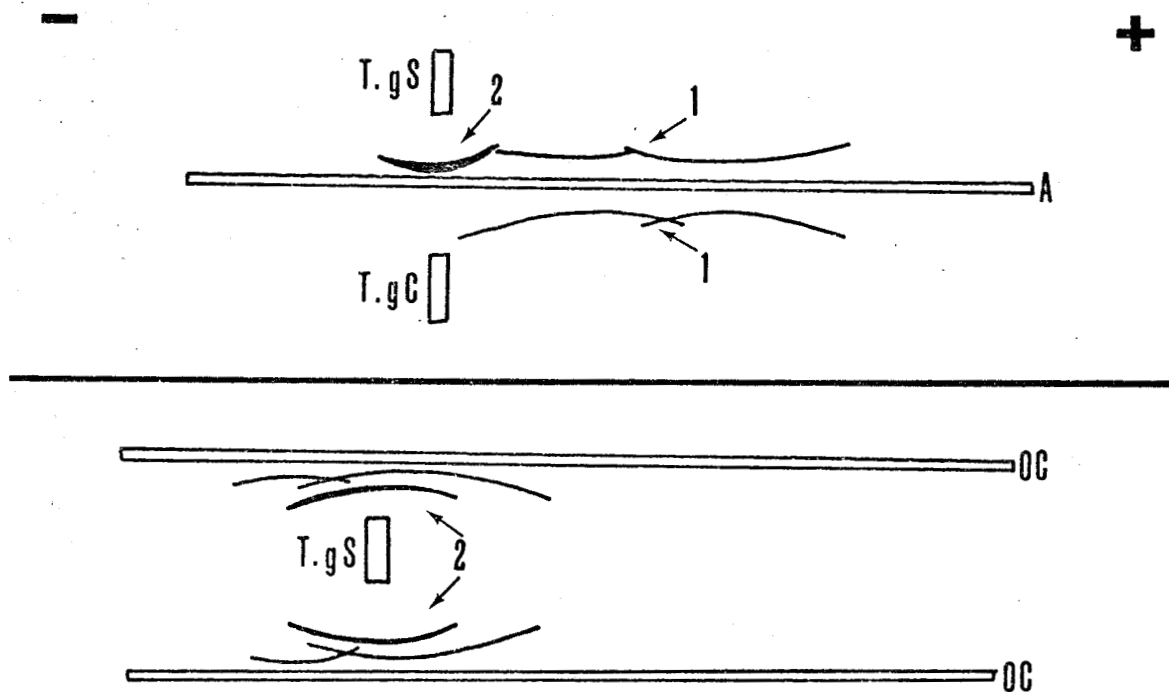


Figure 46 : Analyse immunoélectrophorétique de sérums de patients atteints de maladie du sommeil à T. gambiense.

T.gC : Antigène T. gambiense formes de culture

T.gS : Antigène T. gambiense formes sanguicoles

A et OC : sérums des malades

1 —> : "arcs anodiques"

2 —> : "arcs cathodiques"

Tableau XVII : Résultats comparatifs obtenus en immunoélectrophorèse portant sur 69 sérums de malades à T. gambiense (parasitologiquement confirmés traités ou non traités)

1) 45 sérums provenant du Centre Médical de Kimpese, province du Bas Zaïre (Dr M. WERY)

- "arcs anodiques" avec T. gambiense Sanguicole } 20 + —> 44 %
- T. gambiense Culture
- T. brucei Culture
- "arcs cathodiques" avec T. gambiense Sanguicole 42 + —> 93 %

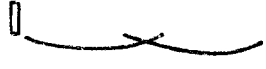

2) 20 sérums provenant de Côte d'Ivoire, Abidjan (Dr J. TONNEL) (AFCHAIN et al., 1975b)

- "arcs anodiques" avec T. gambiense Culture } 8 + → 40 %
- T. gambiense Sanguicole }
- "arcs cathodiques" avec T. gambiense Sanguicole 19 + → 95 %

3) Divers : 4 sérums provenant respectivement du Mali, Haute Volta, Cameroun et Congo, confiés par les Professeurs BECQUET (Lille) et GENTILINI (Paris)

- "arcs anodiques" avec T. gambiense Culture } 2 +
- T. gambiense Sanguicole }
- "arcs cathodiques" avec T. gambiense Sanguicole 2 +

Tableau XVIII : Pourcentages de positivité, en immunoélectrophorèse, avec deux antigènes de T. gambiense et portant sur 69 malades parasitologiquement confirmés.

Antigènes	Nbre de positifs	Nbre d'arcs variant de	Localisation immunoélectrophorétique des arcs de précipitation	% de positivité
<u>T. gambiense</u> formes de CULTURE	29	1 à 3	Anodique 	42 %
ou <u>T. brucei</u> CULTURE				
<u>T. gambiense</u> formes SANGUICOLES	63	1 à 4	Cathodique 	91 %

Ces données nous amènent à envisager trois points particuliers :

- la différence observée entre les résultats obtenus à l'aide des antigènes extraits des trypanostigotes sanguicoles et les résultats obtenus à l'aide des trypanostigotes de culture ;
- la localisation cathodique de la majorité des arcs de précipitation ;
- le nombre limité de ces systèmes précipitants.

La connaissance précise des antigènes spécifiques de stade évolutif et surtout leur localisation, nous permettent de penser que les anticorps précipitants, élaborés au cours de la trypanosomiase humaine à T. gambiense, paraissent être suscités en majorité par les composants antigéniques spécifiques des formes sanguicoles. Dans la maladie du sommeil humaine, le nombre de systèmes précipitants est très limité. Cependant, l'utilisation d'un extrait antigénique provenant des trypomastigotes sanguicoles permet de les révéler d'une manière quasi-systématique.

Néanmoins, une question plus fondamentale restait à résoudre : par quels types d'antigènes ces anticorps privilégiés sont-ils élaborés ? S'agit-il de composants spécifiques du stade sanguicole ou des composants spécifiques du sérotype ?

L'utilisation des deux extraits antigéniques LiTat-1 et LiTat-2 n'a pas donné des résultats identiques. Seul l'extrait provenant de la population LiTat-1 a permis l'obtention des résultats précédents ; l'utilisation de l'extrait LiTat-2 a donné systématiquement des résultats plus discutables avec un nombre d'arcs "cathodiques" toujours moins important et un mauvais équilibre antigène-anticorps.

L'absorption d'un sérum humain par la population sanguicole LiTat-2 (TgSP2), quelle que soit la dose d'épuisement, nous a toujours révélé au moins un composant antigénique par rapport à la population LiTat-1 (TgSP1) (figure 47).

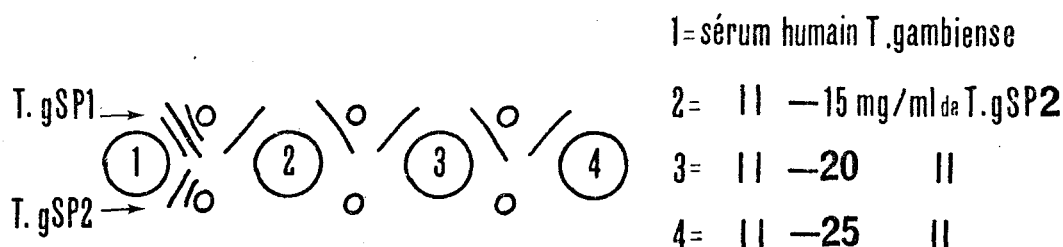


Figure 47 : Absorption d'un sérum humain à T. gambiense par un extrait lyophilisé de la population LiTat-2 (TgSP2) montrant systématiquement un arc de précipitation par rapport à la population sanguicole LiTat-1 (TgSP1).

The first part of the report is devoted to a general description of the project and the objectives to be achieved. It is followed by a detailed description of the experimental method and the results obtained. The last part of the report is devoted to a discussion of the results and the conclusions drawn from them.

The experimental method used in this project is based on the use of a special apparatus which has been designed for the purpose. The results obtained are shown in the following figures and tables.

The results of the experiment show that the rate of reaction is directly proportional to the concentration of the reactants. This is in agreement with the theoretical prediction.

The following table shows the results of the experiment for different concentrations of the reactants.

The results of the experiment are shown in the following figures and tables.

TABLE I

1	0.1	0.1	0.1
2	0.2	0.2	0.2
3	0.3	0.3	0.3
4	0.4	0.4	0.4
5	0.5	0.5	0.5

The results of the experiment are shown in the following figures and tables.

The results of the experiment are shown in the following figures and tables.

Inversement, l'absorption de ce même sérum par un extrait lyophilisé de la population LiTat-1 fait disparaître la totalité des réactions de précipitation aussi bien vis-à-vis de l'extrait LiTat-1 que de l'extrait LiTat-2.

Dans nos conditions expérimentales, on peut penser qu'au moins un de ces composants serait spécifique du type antigénique LiTat-1. Ainsi, une partie de la réponse humorale de l'hôte, partie hautement significative car assurant le diagnostic immunoélectrophorétique de cette parasitose, serait due aux antigènes variables spécifiques du sérotype.

6.2. REACTIONS CROISEES ENTRE T. CRUZI, T. B. GAMBIENSE, T. B. BRUCEI et L. DONOVANI, OBSERVEES EN IMMUNOELECTROPHORESE, DANS LES INFECTIONS EXPERIMENTALES ET HUMAINES

Afin d'assurer la spécificité des résultats diagnostiques en immunoélectrophorèse, ont été confrontés aux extraits antigéniques de T. cruzi, L. donovani et T. gambiense par les techniques de précipitation en gel :

- (a) des sérums provenant de cas humains et expérimentaux atteints de trypanosomiase américaine, de trypanosomiase africaine et de leishmaniose viscérale ;
- (b) des sérums de patients atteints de maladies parasitaires, bactériennes ou virales.

(a) Réactions croisées observées en immunoélectrophorèse dans les infections déterminées par les Trypanosomatidae

Le tableau XIX présente une synthèse des réactions croisées minimales observées.

Il existe donc, pour l'ensemble de ces Trypanosomatidae, des réactions croisées relativement importantes avec des sérums humains et expérimentaux. Ainsi ces résultats nous recommandent la prudence lors d'une interprétation diagnostique.

Tableau XIX : Nombre maximum d'arcs de précipitation mis en évidence en immunoélectrophorèse, dans nos conditions expérimentales, au moyen des antigènes homologues et hétérologues, dans les trypanosomiasés américaine, africaine et dans la leishmaniose viscérale.

Sérums:	Trypanosomiasé		Trypanosomiasé		Leishmaniose	
	américaine	africaine	africaine	humaine à T.gambiense	viscérale	viscérale
Antigènes	Souris	Homme	Bovine	Humaine à T.gambiense	Chien	Homme
T. cruzi	11	12	2	0	4	6
T. gambiense Culture	2	2	NE	3*	2	4
T. gambiense Sanguicole	2	2	NE	6	1	3
T. brucei Culture	5	3	4	3*	4	5
L. donovani	1	1	0	0	16	17

NE = non effectué

* tous les arcs de précipitation se trouvent en position "anodique" sur les diagrammes immunoélectrophorétiques.

(b) Ont été utilisés des sérums de malades atteints de :

- parasitoses diverses (bilharziose, hydatidose, distomatose, filariose, candidose, aspergillose, paludisme, amibiase, toxoplasmosé) ;
- maladies bactériennes ou virales : syphilis, hépatite virale, tuberculose ;
- maladies diverses : allergie pulmonaire, cirrhose alcoolique du foie, splénomégalias d'origine incertaine, lupus érythémateux disséminé.

A l'aide de ces sérums, les techniques de précipitation en gel (micro-double diffusion et immunoélectrophorèse), vis-à-vis des antigènes T. cruzi, L. donovani et T. gambiense n'ont permis de déceler qu'exceptionnellement un arc de précipitation comme le souligne le tableau suivant.

Antigènes	Sérums de malades atteints de	Micro-DDG	IEP	Nbre de cas +/au Nbre de sérums étudiés
<u>T. cruzi</u> et <u>L. donovani</u>	candidose	● ●	↓	2/10
<u>L. donovani</u>	gros foie (cirrhose alcoolique)	● ●	0	2/6
<u>T. cruzi</u> et <u>T. gambiense</u>	Lupus érythémateux disséminé (Ac anti-DNA)	● ●	0	1/4

Tableau XX : Résultats des contrôles de spécificité de la précipitation en gel lors du diagnostic des Trypanosomatidés.

Inversement, sur des sérums très riches en anticorps précipitants, provenant de malades atteints de maladie du sommeil, de maladie de Chagas et de kala-azar, nous avons effectué, en immunoélectrophorèse, de très nombreuses réactions vis-à-vis d'antigènes d'helminthes (S. mansoni, F. hepatica, D. viteae, E. granulosus, A. suum) de champignons (C. albicans, A. fumigatus) et de protozoaires (E. histolytica, T. gondii) ; nous n'avons jamais obtenu de réactions croisées.

Ainsi, d'éventuelles relations antigéniques de hasard avec des parasitoses très éloignées ou des maladies humaines diverses, observées dans les conditions expérimentales de l'immunoélectrophorèse, n'intéressent les Trypanosomatidae que de façon négligeable et ne peuvent altérer les résultats concernant le diagnostic immunoélectrophorétique de ces protozooses. Par contre, à l'intérieur des Trypanosomatidae, des réactions croisées importantes sont observées. Ceci nous a conduit à étudier les réactions croisées entre les Trypanosomatidae à l'aide de l'immuno-fluorescence indirecte, technique très employée dans le diagnostic de ces parasitoses.

6.3. ETUDE DIAGNOSTIQUE COMPARATIVE PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

L'immuno-fluorescence indirecte par sa simplicité technique et l'utilisation d'antigène figuré est à priori la méthode la plus facile à mettre en oeuvre pour le diagnostic des Trypanosomatidae. Malheureusement, comme le souligne le tableau XXI, cette technique d'une très grande sensibilité, fait preuve d'un manque évident de spécificité. En effet, l'utilisation d'antigènes figurés de T. cruzi, T. brucei et L. donovani, opposés à des sérums de malades atteints de trypanosomiase africaine,

américaine ou de leishmaniose viscérale, démontre des réactions croisées avec des titres maximaux d'immunofluorescence :

- du 200ème pour les sérums humains Chagasiques vis-à-vis des antigènes figurés T. brucei et L. donovani (le titre moyen^(*), en réaction homologue, est de 595 par rapport aux 20 cas positifs étudiés) ;
- du 400ème pour les sérums de malades atteints de kala-azar vis-à-vis des antigènes figurés T. cruzi et T. brucei (le titre moyen, en réaction homologue, est de 821 par rapport aux 10 cas positifs étudiés) ;
- du 50ème pour les sérums de sujets atteints de maladie du sommeil à T. gambiense vis-à-vis des antigènes figurés T. cruzi et L. donovani (le titre moyen, en réaction homologue, est de 342 par rapport aux 20 cas positifs étudiés).

Tableau XXI : Répartition des réactions croisées obtenues par immunofluorescence indirecte.

Sérums humains (Antigènes)	Maladie de Chagas	Maladie du sommeil à <u>T. gambiense</u>	Kala-azar
<u>T. cruzi</u> CULTURE	595*	50**	400**
<u>T. brucei</u> SANGUICOLE	200**	342*	400**
<u>L. donovani</u> CULTURE	200**	50**	821*

* Réactions homologues : moyennes des titres d'immunofluorescence (G.M.R.T. = "Geometric mean range titer") par rapport au nombre de cas positifs étudiés.

** Réactions hétérologues : titres maximaux d'immunofluorescence observés lors des réactions croisées.

* On appelle titre moyen, la moyenne géométrique des titres d'anticorps ou G.M.R.T. (geometrical mean range titer) donnée par la formule suivante :

$$G.M.R.T. = \text{antilog} \sum f(\log X) / N$$
 où X représente les différents titres d'anticorps, f le nombre de sérums qui ont respectivement donné chacun de ces titres et N le nombre total de sérums étudiés.

En règle générale, dans nos conditions expérimentales et à propos des sérums humains étudiés, le titre maximal de réaction croisée est inférieur au titre moyen (G.M.R.T.) calculé pour la réaction homologue. Ainsi, compte tenu des importantes réactions croisées, le diagnostic immunologique des parasitoses par immunofluorescence n'est concevable qu'à condition d'effectuer systématiquement :

- les réactions vis-à-vis des antigènes figurés T. brucei et L. donovani pour un sérum de malade provenant d'Afrique ;
- les réactions vis-à-vis des antigènes figurés T. cruzi et L. donovani pour un sérum de malade provenant d'Amérique du Sud.

Il est évident que ces résultats d'ordre diagnostic nous permettent de recommander 1°) une prudente interprétation des résultats sérologiques, surtout lorsque les titres en sont peu élevés, et 2°) le recours à une autre technique telle l'immunoélectrophorèse, peut-être moins sensible mais d'une remarquable spécificité par la visualisation des composants antigéniques spécifiques.



6.4. SYNTHESE : UN DIAGNOSTIC IMMUNOELECTROPHORETIQUE SPECIFIQUE REPOSE SUR LA MISE EN EVIDENCE DES COMPOSANTS SPECIFIQUES

Les deux techniques d'immunofluorescence indirecte et d'immunoélectrophorèse se complètent utilement. En effet, l'emploi systématique de l'immunoélectrophorèse pour un laboratoire est coûteux en antigène et requiert une technicité spécialisée. Par contre, l'immunofluorescence par sa simplicité technique et l'emploi d'antigènes figurés obtenus facilement in vitro ou in vivo est une remarquable méthode d'orientation. L'immunoélectrophorèse permet par la suite d'établir la spécificité des réactions par la caractérisation des composants spécifiques à savoir :

- le composant "spécifique" n°5 de T. cruzi
- les composants 4 et 24 de L. donovani
- les composants "cathodiques" visualisés avec l'extrait antigénique sanguicole de T. b. gambiense.

Aussi, l'obtention de ces antigènes spécifiques à l'état purifié devrait permettre l'accès à un diagnostic rigoureusement spécifique de ces parasitoses.

CHAPITRE 7 : PURIFICATION DES ANTIGENES SPECIFIQUES DE T. CRUZI ET DE
T. B. BRUCEI. OBTENTION D'ANTISERUMS MONOSPECIFIQUES.

L'isolement d'antigènes spécifiques apporte une contribution particulièrement intéressante au diagnostic et peut-être aussi à la prévention des protozooses. Après les travaux de TAILLIEZ (1970) sur l'isolement de l'antigène spécifique de Fasciola hepatica, l'utilisation des procédés classiques de purification physicochimique ne semblait pas promettre la généralisation de telles méthodes. L'imperfection des résultats obtenus pour T. cruzi à l'aide de la chromatographie sur gel de Séphadex nous a incité à recourir à la chromatographie d'affinité et plus précisément à l'immunoabsorption. Cette technique a déjà permis l'isolement sélectif et rapide d'un antigène spécifique du liquide hydatique (Echinococcus granulosus) par BOUT et al. (1974).

La seule condition, pour l'utilisation de l'immunoabsorption, est l'obtention préalable d'un antisérum rigoureusement monospécifique dont les anticorps doivent être très avides. En général, les sérums monospécifiques de notre étude furent préparés par injection au lapin de la zone de gel qui renferme l'arc de précipitation correspondant au composant spécifique.

L'utilisation des techniques d'immunoabsorption a permis l'obtention à l'état pur du composant N°5 de T. cruzi et du composant V spécifique du sérotype AnTat-1 de T. b. brucei.

7.1. PURIFICATION DU COMPOSANT SPECIFIQUE N°5 DE T. CRUZI

Les tentatives de purification biochimique par chromatographie sur gel de Séphadex n'ont abouti qu'à un extrait "semi-purifié". Par contre, la technique d'immunoabsorption a débouché sur sa purification et corrélativement sur l'obtention d'antisérums monospécifiques anti-composant 5.

7.1.1. Essais de purification biochimique par chromatographie sur gel de Séphadex. Obtention d'un extrait "semi-purifié"

Dans une étape préliminaire, le fractionnement de T. cruzi a été mené sur gel de Séphadex G200 superfine. La majorité des composants antigéniques se retrouvant dans le même pic d'éluion, nous avons fractionné l'extrait total sur gel de Séphadex G75 superfine et nous avons obtenu trois pics ; le pic I

d'exclusion, contenant le composant N°5, a été passé ensuite sur Séphadex G200 superfine.

● Séparation de l'extrait total de *T. cruzi* sur gel de Séphadex G200 superfine

Deux essais avec respectivement 200 mg et 300 mg d'extrait soluble ont donné les résultats suivants (figure 48) :

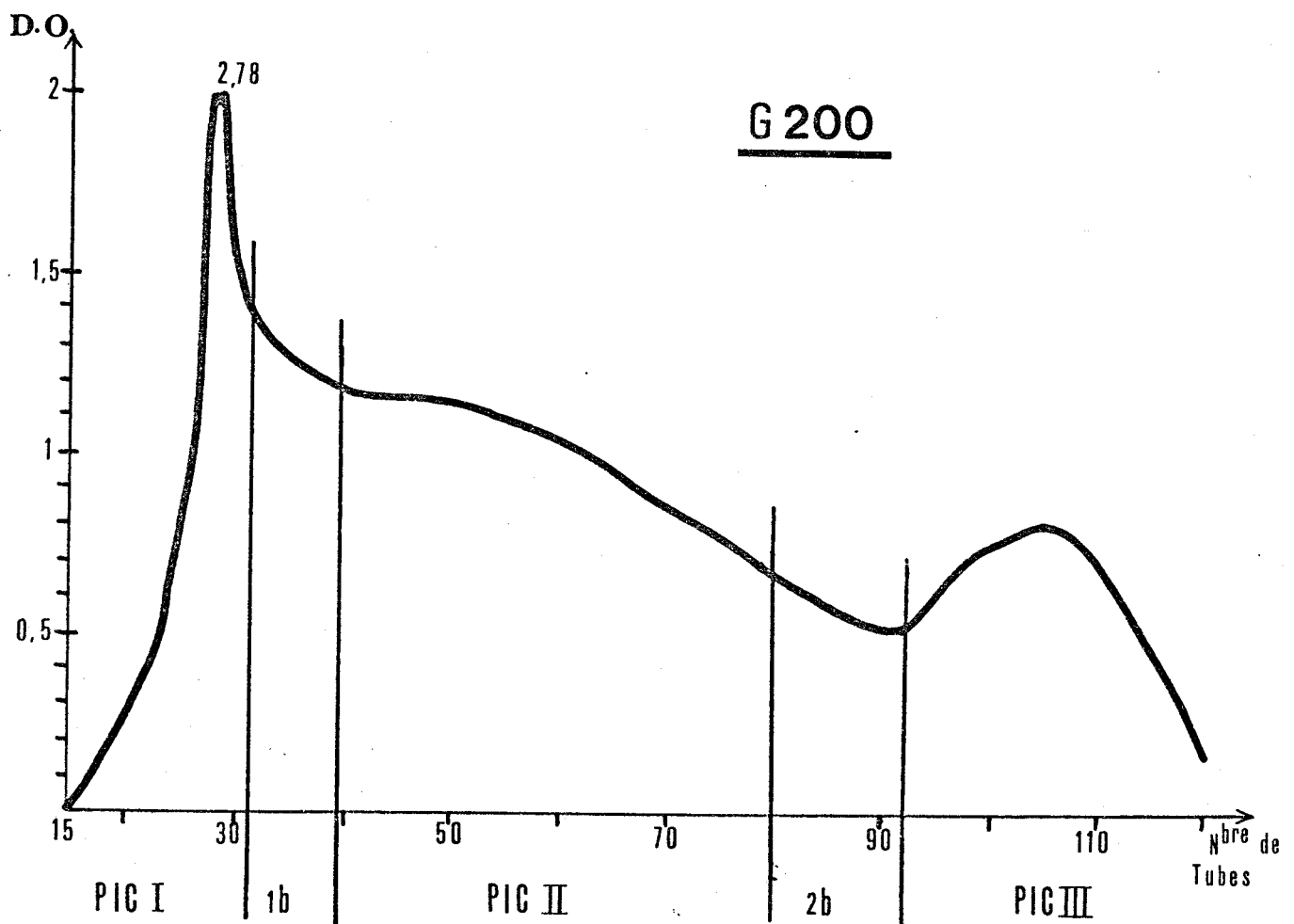


Figure 48 : Séparation de l'extrait total de *T. cruzi* sur gel de Séphadex G200 superfine.

La caractérisation dans les pics du composant N°5 et du nombre total de composants antigéniques a été effectuée en immunoélectrophorèse, en opposant respectivement chaque pic à un HIS anti-*T. cruzi* (tableau XXII).

Tableau XXII : Composition antigénique et caractérisation du composant N°5 dans chaque pic, par analyse immunoélectrophorétique, après séparation sur gel de Séphadex G200.

	PIC I	PIC II	PIC III
Présence du composant N°5	+	+++	-
Nbre de composants antigéniques	7	16	0

Le pic d'exclusion (Pic I) contient peu de composants antigéniques d'un PM supérieur à 200.000. La majeure partie des composants antigéniques, dont l'antigène 5, se situe dans la zone intermédiaire (PIC II). Il était donc nécessaire d'avoir recours à un gel de Séphadex ayant un pouvoir de séparation plus étendu.

● Séparation de l'extrait total de *T. cruzi* sur gel de Séphadex G75 superfine

Cinq essais avec respectivement 200 à 300 mg d'extrait soluble ont donné les résultats suivants (figure 49).

La caractérisation du composant N°5 et le nombre total de composants antigéniques dans chaque pic, en immunoélectrophorèse vis-à-vis d'un HIS anti-*T. cruzi* sont transcrits dans le tableau XXIII.

Tableau XXIII: Antigénicité immunoélectrophorétique des pics et zones intermédiaires (après séparation de *T. cruzi* sur Séphadex G75).

	PIC I	1b	PIC II	3a	PIC III
Présence du composant N°5	+++	++	+	±	-
Nbre de composants antigéniques	11	12	16	7	4

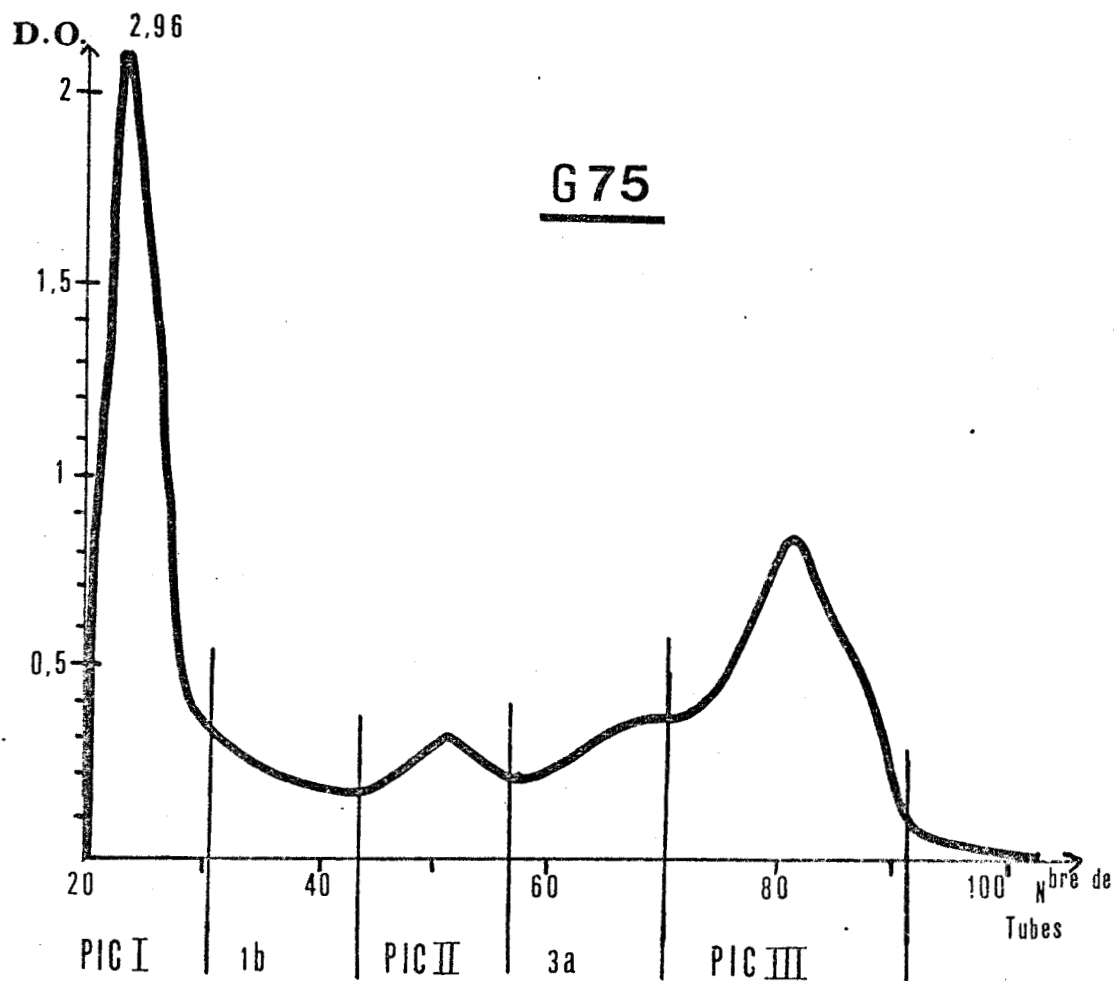


Figure 49 : Séparation de l'extrait total de T. cruzi sur gel de Séphadex G75 superfine.

Il est important de souligner que cette séparation n'est pas sélective. En effet, un même composant antigénique se retrouve dans plusieurs pics successifs à une concentration plus ou moins élevée. Le composant 5 est présent dans les deux premiers pics et dans les zones intermédiaires 1b et 3a. Néanmoins, seul le pic I (pic d'exclusion pour les molécules d'un PM supérieur à 75000) renferme le composant 5 en quantité importante.

Afin de mieux séparer l'antigène 5 des autres composants du pic I obtenu sur G75, ce pic a été fractionné sur gel de Séphadex G200 superfine.

● Séparation du pic I (obtenu sur G75) à l'aide d'un gel de Séphadex G200 superfine

Deux essais, à l'aide respectivement de 12 mg et de 15 mg provenant du pic I obtenu sur G75, ont abouti aux résultats suivants (figure 50).

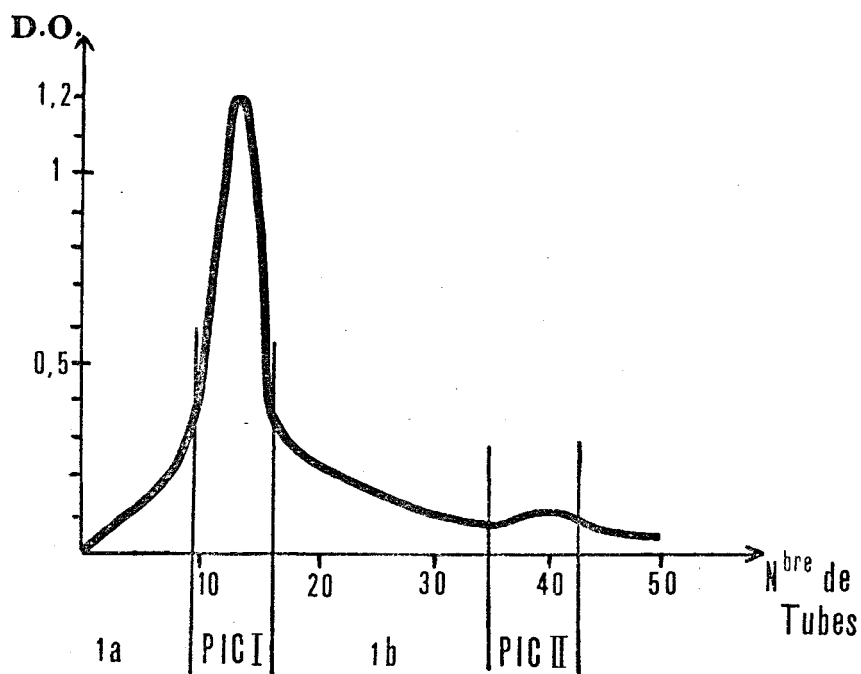


Figure 50 : Séparation du pic I (obtenu par passage de l'extrait de T. cruzi sur G75) à l'aide d'un gel de Séphadex G200.

L'analyse immunoélectrophorétique de chaque pic et des zones intermédiaires, à l'aide d'un HIS anti-T. cruzi, a permis la caractérisation des différents composants antigéniques.

Tableau XXIV : Réactivité immunoélectrophorétique des pics et zones intermédiaires (après passage sur Séphadex G200 du pic I provenant d'une séparation de T. cruzi sur G75).

	la	Pic I	lb	PIC II
Présence du composant N°5	0	+ -	+++	+ -
Nbre de composants antigéniques	0	7	8	1

Les immunoélectrophorégrammes correspondants (figure 51) montrent le chevauchement des mêmes composants antigéniques dans le pic I et la zone intermédiaire lb.

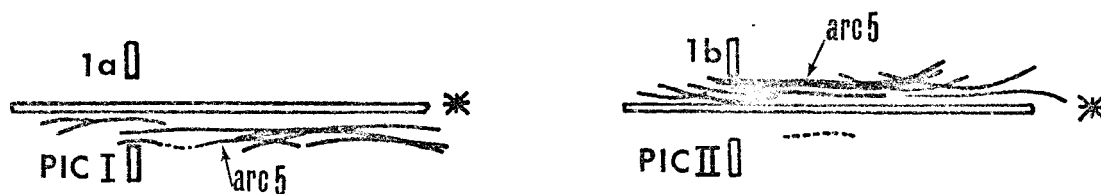


Figure 51 : Immunoélectrophorégrammes, vis-à-vis d'un HIS anti-T. cruzi (*), des pics et zones intermédiaires obtenus après filtration sur G200 du pic I séparé sur G75.

L'antigène 5 ne se situant pas dans le pic d'exclusion, son PM doit être compris entre 75000 et 200 000.

Ainsi, la purification physicochimique, par chromatographie sur gel de Séphadex, n'a permis l'obtention que d'une préparation antigénique "semi-purifiée", renfermant environ le tiers des composants antigéniques caractérisés dans l'extrait de T. cruzi.

7.1.2. Purification immunochimique par chromatographie d'affinité

La purification du composant N°5 par immunoabsorption a été réalisée selon le protocole décrit par BOUT et al. (1974) pour l'obtention à l'état

pur du composant spécifique du liquide hydatique (E. granulosus). Dans un premier temps, un sérum monospécifique anti-composant 5 a été obtenu par immunisation de lapins à l'aide de la zone de gel renfermant le précipité composant 5-anti-composant 5 visualisé sur immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Après épreuve d'immunoabsorption menée à l'aide de ce sérum monospécifique et de l'extrait total de T. cruzi, les contrôles immunologiques de pureté de l'antigène obtenu ont été effectués par immunisation de lapins.

7.1.2.1. Obtention d'un sérum monospécifique

L'analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle d'un immun-sérum anti-T. cruzi, riche en anticorps anti-composant 5 et renfermant peu d'autres anticorps, opposé à un extrait total de T. cruzi, a permis la caractérisation du pic correspondant au composant n° 5 (figure 52, A).

Avec un tel immun-sérum, de nombreuses immunoélectrophorèses bidimensionnelles (macro-technique) ont été réalisées. Les lames ont été lavées pendant quatre jours en eau physiologique tamponnée. Ensuite, la zone du pic correspondant au précipité composant 5-anti-composant 5 (zone pointillée sur la figure 52, A) a été injectée au lapin suivant la méthode d'immunisation décrite par VAITUKAITIS et al.. Six lapins ont été immunisés selon ce protocole (2.4.2.) seul l'un d'eux nous a donné, après 15 jours, un sérum monospécifique anti-pic 5. Les contrôles de monospécificité ont été effectués en macro-double diffusion et en immunoélectrophorèse bidimensionnelle (figure 52, B).

7.1.2.2. Immunoabsorption et contrôles immunochimiques de pureté de l'antigène obtenu

A l'aide de ce sérum monospécifique anti-pic 5 et de l'extrait total de T. cruzi, la technique d'immunoabsorption selon la méthode décrite par AXEN et al. (1967) a permis l'obtention d'éluats ayant une densité optique, à 280 nm, comprise entre 0,1 et 0,2. Ces éluats ont été concentrés par ultra-filtration sur une cellule Amicon équipée d'une membrane Diaflo UM-10.

Les éluats, ainsi réduits à un volume de 1 ml, nous ont servi à l'immunisation (VAITUKAITIS et al., 1971) de lapins afin de contrôler la pureté antigénique de la préparation. Toutes les épreuves de contrôle pratiquées (macro-double diffusion, immunoélectrophorèse : figure 52, C, et immunoélectrophorèse bidimensionnelle : figure 52, C) ont démontré la parfaite monospécificité des sérums récoltés au cours de l'immunisation de ces lapins.

Figure 52 : Purification du composant 5 de T. cruzi par immunoadsorption.

- A. Analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle réalisée avec un extrait antigénique total de T. cruzi et un immunosérum homologue. La zone pointillée, où se localise le pic 5, correspond à la zone de gel injectée au lapin pour obtenir un immunosérum anti-pic 5.
- B. Contrôles de spécificité, par double diffusion et immunoélectrophorèse bidimensionnelle, de l'immunosérum anti-pic 5 opposé à un extrait antigénique total de T. cruzi. L'immunosérum anti-pic 5 ne révèle que le système de précipitation correspondant au composant 5.
- C. Contrôles immunochimiques de pureté du composant 5 isolé par immunoadsorption.

L'immunoélectrophorèse simple et l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle, réalisées avec l'extrait antigénique total de T. cruzi et un HIS anti-éluat obtenu par immunisation de lapin avec le composant 5 isolé par immunoadsorption, ne révèlent qu'un seul système de précipitation. La monospécificité de l'immunosérum anti-éluat témoigne de l'obtention à l'état pur du composant 5.

IS anti-T. cruzi

+



pic5

- T. cruzi +

- A

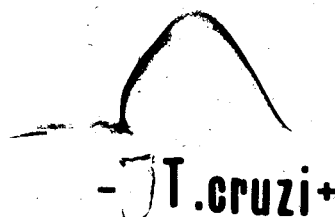
S. Veau

IS anti-Pic5

+



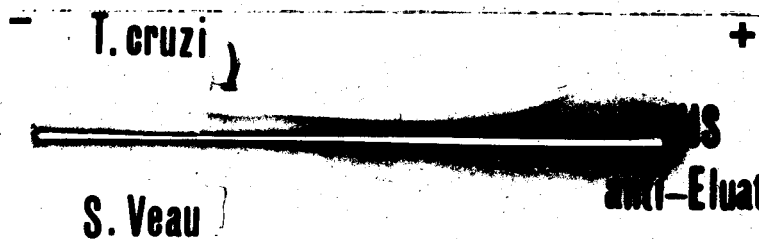
B



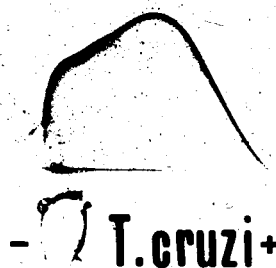
- T. cruzi +

-

HIS anti-Eluat



C



- T. cruzi +

Ainsi, cette méthode, d'une très grande rapidité et d'une relative simplicité, a permis l'obtention à l'état pur du composant N°5 de T. cruzi et corrélativement de sérums monospécifiques correspondants.

7.2. PURIFICATION DU COMPOSANT V DE T. B. BRUCEI, SPECIFIQUE DU TYPE ANTIGENIQUE AnTat-1

7.2.1. Rappel des résultats immunoélectrophorétiques obtenus par LE RAY (1975)

Une situation pratiquement analogue à celle de T. b. gambiense a été trouvée, précédemment à notre étude, chez T. b. brucei par LE RAY et al. (1973a), LE RAY (1975). Il existe pour T. b. brucei au moins quatre composants spécifiques des formes de culture et un composant spécifique des formes sanguicoles. Ce dernier, soumis au phénomène de variation antigénique, supporte la spécificité de chaque population antigénique clônée (figure 53, A). Ce composant variable (appelé V) se retrouve toujours en position cathodique sur les diagrammes immunoélectrophorétiques. Trois populations antigéniques distinctes, représentant respectivement les sérotypes AnTat-1, AnTat-2 et ETat-2 ont été analysées par LE RAY (1975).

Nous avons préféré étudier le composant variable V de T. b. brucei plutôt que ceux de T. b. gambiense pour les raisons suivantes :

- (i) le modèle AnTat-1 avait été l'objet d'une étude immunoélectrophorétique (LE RAY, 1975) et d'un sérotypage par trypanolyse et par immunofluorescence (VAN MEIRVENNE et al., 1975a). De plus, le composant V d'AnTat-1 présente une complexité immunochimique moindre que celle de LiTat-1.
- (ii) la souche EATRO 1125 de T. b. brucei comprenant le sérotype AnTat-1 n'est pas infectante pour l'homme, au contraire de la souche Eliane de T. b. gambiense que nous avons étudiée.

7.2.2. Purification immunochimique du composant V

Le composant antigénique V spécifique des formes sanguicoles du sérotype AnTat-1 de T. b. brucei a été purifié directement par chromatographie d'affinité (AFCHAIN et al., 1976).

Des expériences préliminaires ont été menées avec un hyperimmunsérum anti-AnTat-1, absorbé par un extrait soluble lyophilisé d'AnTat-2 à la dose de 45 mg par ml. Testé en immunoélectrophorèse vis-à-vis d'extraits d'AnTat-1 et d'AnTat-2, cet hyperimmunsérum absorbé révèle seulement le composant variable V spécifique du sérotype AnTat-1 et ne donne aucune réaction croisée avec AnTat2 (figure 53, A).

Un immunoabsorbant a été préparé avec ce sérum absorbé suivant la technique préconisée par AVRAMEAS et TERNYNCK (1969). L'éluat obtenu a servi à l'immunisation d'un lapin selon la technique de VAITUKAITIS. Les anticorps précipitants apparus au cours du premier mois d'immunisation se sont révélés monospécifiques du composant V. Par la suite, sont apparus deux anticorps hétérologues, montrant ainsi la présence d'antigènes communs dans l'éluat de l'immunoabsorbant.

Le recours à un hyperimmunsérum absorbé n'a donc pas permis l'obtention d'un composant V pur. Ceci est probablement dû à une absorption incomplète de l'hyperimmunsérum par l'extrait hétérologue AnTat-2; ce défaut d'absorption n'ayant pas été décelé par les techniques de précipitation en gel. Cet échec souligne la nécessité, lors d'une purification antigénique, d'avoir recours à l'immunisation expérimentale de lapins avec l'extrait supposé purifié.

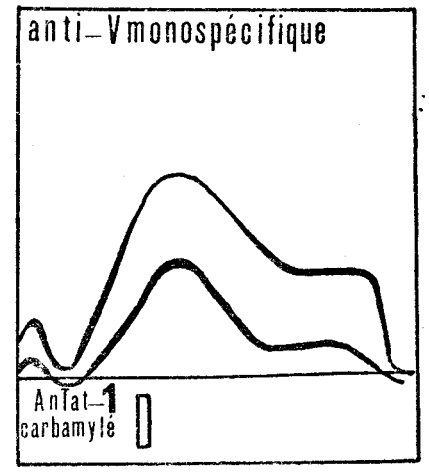
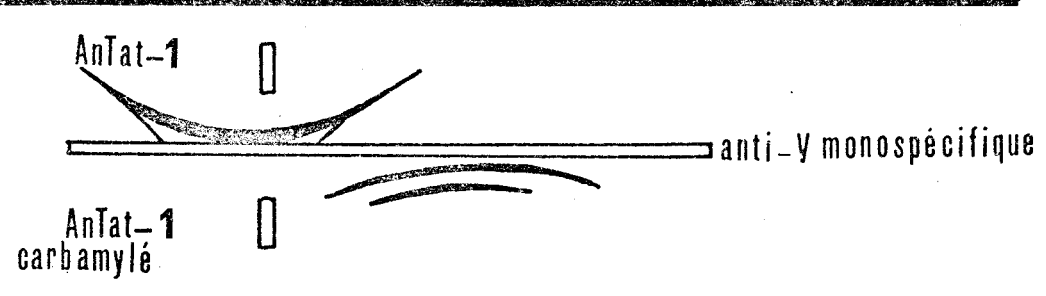
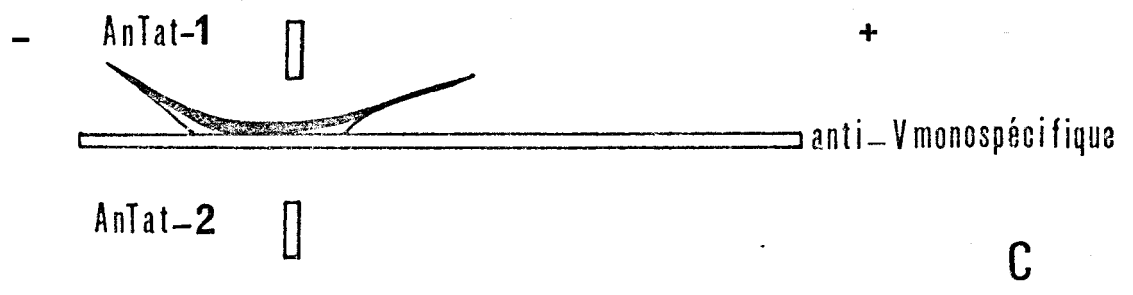
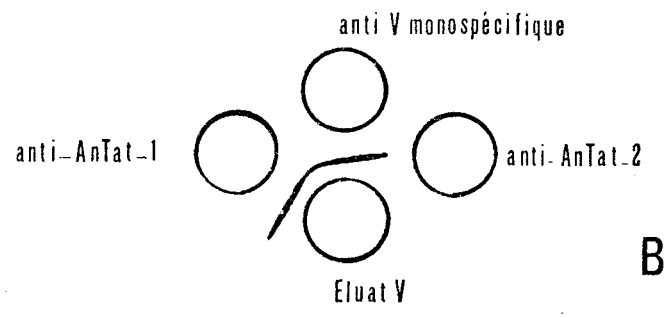
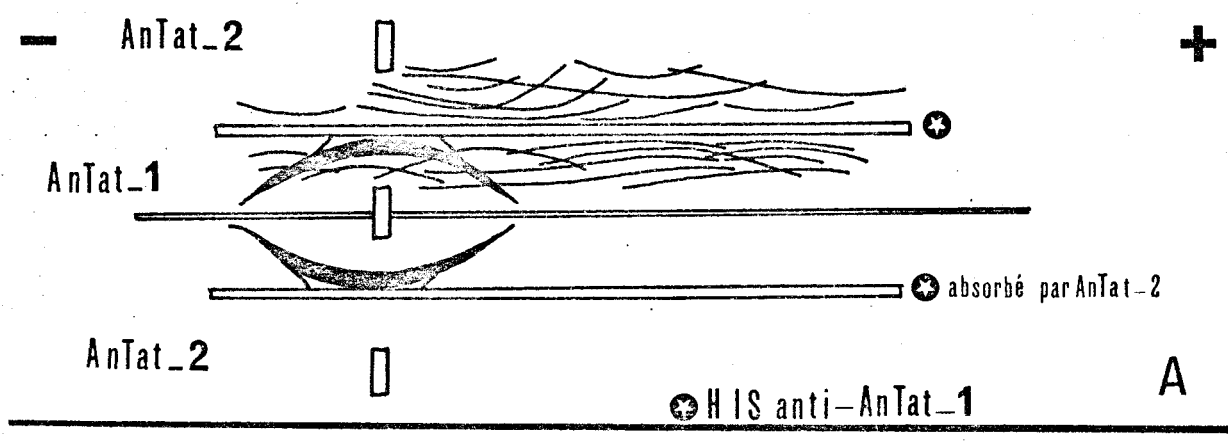
Il a donc été nécessaire d'avoir recours à une autre technique pour l'obtention d'un sérum monospécifique anti-composant V.

Un sérum monospécifique a été obtenu par immunisation selon VAITUKAITIS de lapins à l'aide de la zone du gel où se situe le précipité V-anti-V en immunoélectrophorèse. La monospécificité a été contrôlée selon les méthodes habituelles de macro-double diffusion et d'immunoélectrophorèse.

Avec cet hyperimmunsérum monospécifique (3 ml), l'immunoabsorption, conduite avec un extrait total d'AnTat-1 (50 mg), a abouti à la purification du composant V. Une partie de l'éluat concentré, opposé à des hyperimmunsérums anti-AnTat-1, anti-composant V et anti-AnTat-2, ne montre qu'un seul arc de précipitation en macro-double diffusion (figure 53, B). De plus, l'immunisation d'un lapin avec l'autre partie de l'éluat concentré a permis d'obtenir un hyperimmunsérum ne révélant, en immunoélectrophorèse, à l'égard de l'extrait d'AnTat-1 total que le seul composant V (figure 53, C). Ainsi, cette méthode d'immunoabsorption a permis l'obtention à l'état pur du composant V, spécifique du sérotype AnTat-1.

Figure 53 : Purification immunochimique du
composant V de T. b. brucei, sérotype AnTat-1.

- A. Immunoélectrophorèses montrant le composant majeur V, spécifique du sérotype AnTat-1, révélé par un hyperimmunsérum anti-AnTat-1 total avant et après absorption par un extrait hétérologue d'AnTat-2.
- B. Contrôle de pureté du composant V isolé par immunoadsorption. Le composant V est révélé dans l'éluat concentré opposé aux hyperimmunsérum anti-composant V et anti-AnTat-1. La réaction est négative vis-à-vis d'un hyperimmunsérum anti-AnTat-2.
- C. Immunoélectrophorèse, réalisée avec l'extrait total d'AnTat-1 et l'hyperimmunsérum anti-composant V purifié par immunoadsorption. Le critère de pureté du composant V isolé est démontré par la monospécificité de l'antisérum.
- D. Immunoélectrophorèse et immunoélectrophorèse bidimensionnelle, réalisées entre l'extrait antigénique total d'AnTat-1 après carbamylation et l'hyperimmunsérum anti-composant V. Le dédoublement et les trois épaulements du composant V démontreraient son hétérogénéité physico-chimique.



L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle, menée dans les conditions classiques avec un extrait total d'AnTat-1 et un sérum monospécifique anti-composant V, s'est révélée inefficace en raison de la trop faible mobilité électrophorétique du composant V. Aussi, un extrait soluble total d'AnTat-1 a été carbamylé afin d'accentuer la migration anodique du composant V lors des deux étapes électrophorétiques. Cette carbamylation a été effectuée selon les conditions techniques décrites par BJERRUM et al. (1973). Dans ces conditions et dans la mesure où une partie de l'extrait total d'AnTat-1 n'a pas été dénaturée lors de la carbamylation, l'immunoélectrophorèse simple et l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle montrent que le composant V serait constitué de deux sous-unités ayant un coefficient de migration légèrement différent, ce qui révélerait son hétérogénéité physicochimique (figure 53, D).

CHAPITRE 8 : LOCALISATION EN SURFACE DES ANTIGENES SPECIFIQUES DE T. B. BRUCEI
ET DE T. CRUZI. MICROSCOPIE OPTIQUE ET ELECTRONIQUE.

Disposant de sérums monospécifiques anti-composant 5 de T. cruzi et anti-composant V spécifique du sérotype AnTat-1 de T. b. brucei, la localisation des antigènes correspondants a été envisagée au niveau de la surface cellulaire des organismes considérés. L'emploi des techniques indirectes d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase à l'aide de la microscopie optique et électronique a permis une telle caractérisation.

Les tentatives de détection intracellulaire d'antigènes par les techniques d'immunoperoxydase combinées à la microscopie électronique n'ont bénéficié que de progrès encore trop préliminaires pour être appliquées aux Trypanosomatidae dans le cadre de ce travail. C'est pourquoi nous nous sommes attaché uniquement à la localisation de surface des antigènes spécifiques, en préfixant préalablement les organismes à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde (2,5 % en tampon cacodylate 0,1 M).

8.1. LOCALISATION DE L'ANTIGENE VARIABLE V de T. B. BRUCEI AU NIVEAU DU
MANTEAU DES FORMES SANGUICOLES. IMMUNOFLUORESCENCE ET IMMUNOPEROXYDASE
INDIRECTES

La spécificité des antigènes présents à la surface des trypanosomes sanguicoles du sérotype AnTat-1 de T. b. brucei, a été analysée à l'aide de techniques immunologiques appliquées à la microscopie optique et à la microscopie électronique (FRUIT et al., 1976).

Trois types d'antisérums ont été utilisés :

● des sérums de 6 jours d'infection, obtenus chez le lapin par inoculation intraveineuse d'une suspension de 1×10^6 trypanosomes AnTat-1 en tampon PSG, selon la méthode de VAN MEIRVENNE et al. (1975a). A l'aide de ce sérum spécifique du sérotype AnTat-1, les tests de trypanolyse et d'immunofluorescence effectués selon les techniques de VAN MEIRVENNE et al. (1975a) déterminent des réactions positives vis-à-vis du clone AnTat-1 et des réactions négatives vis-à-vis du clone AnTat-2 (VAN MEIRVENNE, communication personnelle). Ce type d'anti-sérum ne renferme pas d'anticorps précipitants.

● des hyperimmunsérums anti-formes sanguicoles hétérologues AnTat-2, anti-formes de culture de T. b. brucei, anti-protéines d'hôte (sérum de rat, globules rouges intacts ou lysés de rat). Tous ces hyperimmunsérums ont été préparés par immunisation sous-scapulaire (chapitre 2.4.1.).

● des antisérums monospécifiques dirigés contre le composant V spécifique du sérotype AnTat-1, préparés selon la méthode de VAITUKAITIS (chapitre 7.2.2.).

Avec l'aide des antisérums monospécifiques anti-composant V et des autres immunsérums homologues et hétérologues, la présence des antigènes correspondants au niveau du manteau des trypomastigotes AnTat-1 a été étudiée en immunofluorescence et en immunoperoxydase. Les observations microscopiques ont été comparées aux données immunoélectrophorétiques et à l'activité trypanocide des immunsérums utilisés. Les tests de trypanolyse ont été effectués par incubation des trypomastigotes vivants d'AnTat-1 dans des dilutions sériées de sérum, à 37°C, en présence de complément frais de cobaye, selon la technique de VAN MEIRVENNE et al. (1973b, 1975a). Ces tests ont été réalisés par VAN MEIRVENNE et MAGNUS (Institut de Médecine Tropicale, ANVERS).

Les résultats sont mentionnés et résumés dans le tableau XXV. L'expérimentation a été menée à l'aide des différents groupes d'antisérums vis-à-vis des trypomastigotes AnTat-1.

GRUPE I : Antisérums monospécifiques anti-composant V du sérotype AnTat-1 et immunsérum d'infection de 6 jours anti-AnTat-1

Ces sérums :

- exercent une activité trypanocide jusqu'à la dilution de 1/256^{ème} ;
- déterminent une réaction de surface positive en immunofluorescence (figure 54 A et B) ;
- entraînent une réaction de surface positive avec la peroxydase en microscopie optique (figure 54 D et E) et un marquage du manteau avec la peroxydase en microscopie électronique (figure 55, A).

GRUPE II : Hyperimmunsérums anti-antigènes communs du sérotype AnTat-2 et anti-formes de culture de T. b. brucei

Ces sérums ne donnent sur les trypomastigotes du sérotype AnTat-1 :

- aucune trypanolyse ;
- aucune réaction positive en immunofluorescence (figure 54, C) ;
- aucun marquage à la peroxydase aussi bien en microscopie optique (figure 54, F) qu'électronique (figure 55, B).




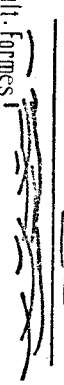

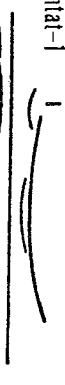
Techniques	IMMUNOELECTROPHORESE	Trypanolyse	Réactivité de Surface		
			IF	ANTAT - 1	ANTAT - 1
			PEROXYDASE		
			Photonique	Electronique	
I ANTAT - 1 (Monospécifique)	Antat-1 	+	+	+	+
	Antat-2	+	+	+	+
I ANTAT - 1 Infection (Gj)	Antat-1	+	+	+	+
	Antat-2	+	+	+	+
II ANTAT - 2	Antat-1 	-	-	-	-
	Antat-2 	-	-	-	-
II CULTURE	Antat-1 	-	-	-	-
	Cult. Formes I	-	-	-	-
III SERUM de RAT	Antat-1 	-	-	-	-
	Rat (Serum) I	-	-	-	-
III Globules Rouges de RAT	Antat-1 	-	-	-	-
	Rat (G.R.) I	-	-	-	-
IV TEMOIN SERUM de LAPIN		-	-	-	-

Tableau XXV : Activité trypanolytique et réactivité de surface sur les trypanomastigotes du sérotype Antat-1. Corrélation avec les données immunoelectrophorétiques.

Figure 54 : Localisation en surface du
composant variable V de T. b. brucei.
Immunofluorescence et immunoperoxydase
indirectes avec observations en micros-
copie optique.

- A et B. Réaction de surface positive, en immunofluorescence, sur les trypanomastigotes AnTat-1 mis en contact avec un antisérum homologue monospécifique du variant (x 2.200) ;
- C. Réaction négative, en immunofluorescence, sur les trypanomastigotes AnTat-1 mis en contact avec les sérums hétérologues (anti-AnTat-2, -formes de culture ou -antigènes d'hôte) (x 2.200) (coloration rougeâtre due au Bleu d'Evans)
- D et E. Marquage positif avec la peroxydase au niveau de la surface des trypanomastigotes AnTat-1 mis en contact avec un antisérum homologue monospécifique du variant (x 3.700) ;
- F. Réaction négative à la peroxydase avec les antisérums hétérologues.

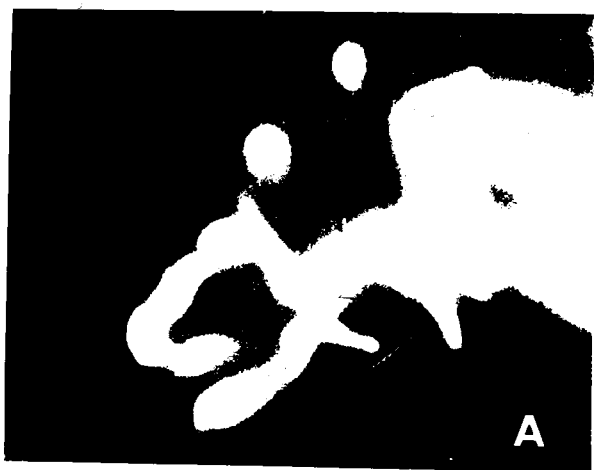
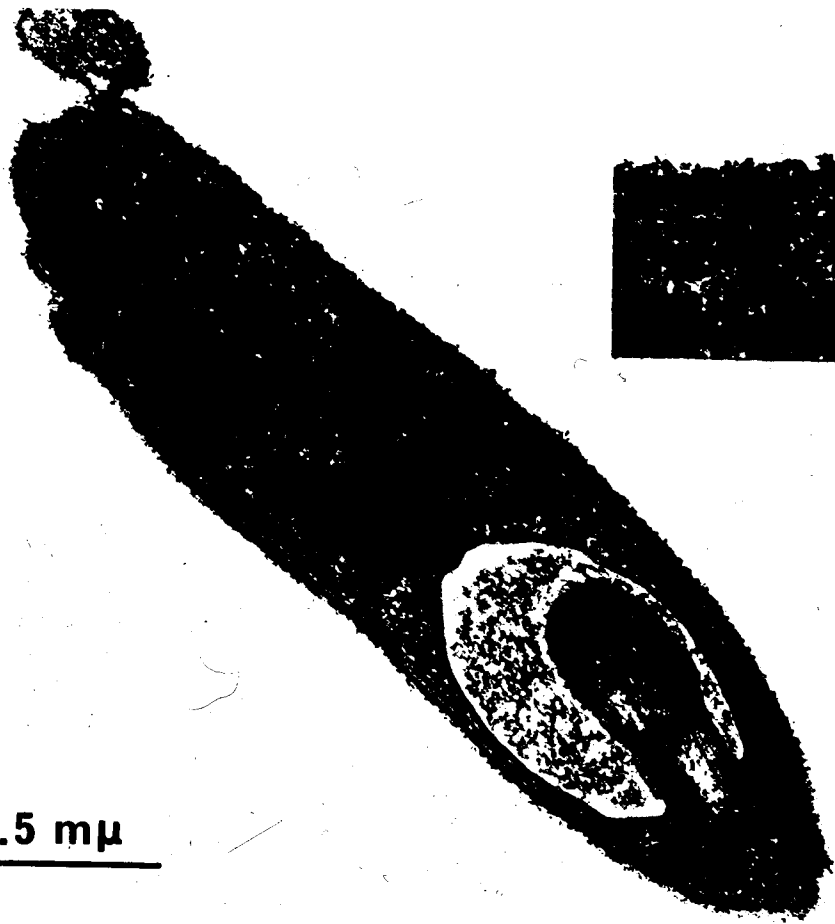


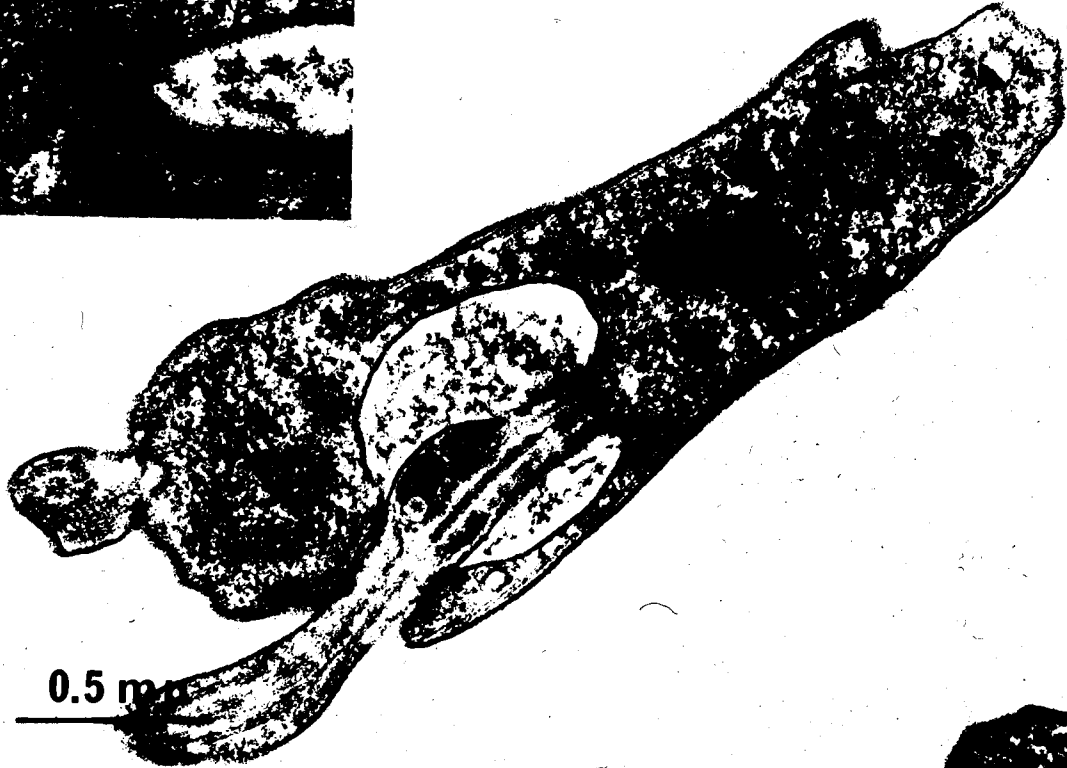
Figure 55 : Localisation en surface
du composant variable V de T. b. brucei.
Immunoperoxydase indirecte et microsco-
pie électronique.

- A. Marquage positif avec la peroxydase au niveau du manteau des formes try-
pomastigotes AnTat-1 à l'aide d'un antisérum homologue monospécifique
du variant. x 64.000 (Encart : haute résolution montrant le marquage en
surface. x120.000).
- B. Réaction d'immunoperoxydase négative sur les trypomastigotes AnTat-1 avec
les sérums hétérologues (anti-AnTat-2, -formes de culture, -antigènes
d'hôte). x 52.000 (Encart : structure classique de la surface des formes
sanguicoles; x120.000).



0.5 μ

A



0.5 μ



GROUPE III : Antisérums dirigés contre les antigènes d'hôte (rat) : sérum, globules rouges intacts et lysés

Aucune activité lytique ne fut observée à l'aide de ces sérums ; toutes les réactions de marquage à la fluorescéine ou à la peroxydase se sont révélées négatives en microscopie optique et électronique.

GROUPE IV : Témoin

Des résultats négatifs sont obtenus avec le sérum normal de lapin dans tous les tests mentionnés précédemment.

Ainsi les résultats, résumés sur le tableau XXV montrent clairement que l'activité trypanocide et la réactivité positive de surface ne sont observées qu'avec les seuls antisérums spécifiques du sérotype AnTat-1. Le constituant majeur de la surface du manteau des trypanosomes sanguicoles se trouve être le composant variable V. Les antigènes de sérotype hétérologue, des formes de culture, des constituants sériques ou érythrocytaires de l'hôte (rat), n'ont pu être mis en évidence sur le manteau cellulaire des trypanosomes sanguicoles du sérotype AnTat-1.

8.2. LOCALISATION DU COMPOSANT N°5 DE T. CRUZI AU NIVEAU DE LA SURFACE DES FORMES DE CULTURE. IMMUNOFLOUORESCENCE ET IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTES

A l'aide d'hyperimmunsérums anti-composant 5 (monospécifiques), anti-T. rangeli et anti-sérum de veau, les réactions d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase ont été effectuées sur les formes de culture épimastigotes de T. cruzi, préalablement préfixées dans une solution de glutaraldéhyde.

L'utilisation d'hyperimmunsérums anti-T. rangeli se justifie pour la recherche d'antigènes autres que le composant 5 au niveau de la surface des formes de culture de T. cruzi. Malheureusement, le recours à de tels hyperimmunsérums limite l'investigation aux seuls composants communs entre T. cruzi et T. rangeli à savoir les six dixièmes des composants totaux.

Les observations microscopiques, confrontées aux données immuno-électrophorétiques, sont résumées dans le tableau XXVI et permettent les commentaires suivants :

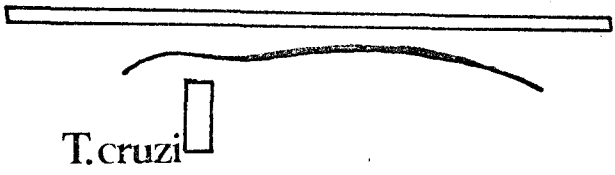
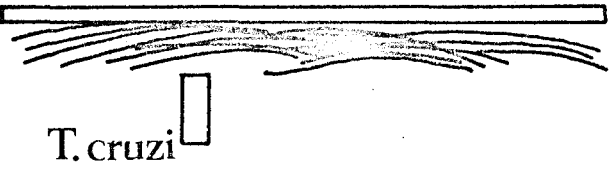
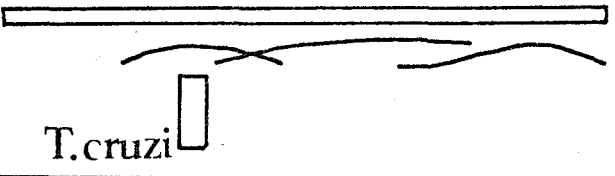
Techniques Immunsérums	IMMUNOELECTROPHO - RESE	Réactivité de Surface sur T.cruzi		
		IF	PEROXYDASE	
			optique	électronique
anti- Composant 5 (monospécifique)		+	+	+
anti- <u>T.RANGELI</u>		-	-	-
anti- Sérum de VEAU		-	-	-
Témoin Sérum de LAPIN		-	-	-

Tableau XXVI : Corrélation entre les données immunoélectrophorétiques et la réactivité de surface sur les formes de culture de T. cruzi.

Figure 56 : Localisation du composant
N°5 de T. cruzi au niveau de la surface
des formes de culture. Immunoperoxydase
indirecte et microscopie électronique.

- A. Marquage positif avec la peroxydase au niveau de la surface cellulaire et de la membrane flagellaire des formes de culture de T. cruzi à l'aide d'un antiserum monospécifique anti-composant 5 (x 40.000).
- B. Réaction d'immunoperoxydase négative sur les formes de culture de T. cruzi avec des hyperimmunsérums anti-T. rangeli et anti-sérum de veau (x 36.000).



μ

A



μ

B

* Antisérums monospécifiques anti-composant 5

Ces sérums :

- déterminent une réaction de surface positive en immunofluorescence
- entraînent une réaction de surface positive avec la peroxydase en microscopie optique et un marquage de la membrane cellulaire avec la peroxydase en microscopie électronique (figure 56, A).

* Hyperinmunsérums anti-T. rangeli et anti-sérum de veau

Toutes les réactions de marquage à la fluorescéine ou à la peroxydase se sont révélées négatives en microscopie optique et électronique ; (figure 56, B).

* Témoin (sérum de lapin sain)

Des résultats négatifs sont obtenus avec ce sérum de lapin dans tous les tests mentionnés précédemment.

Ainsi, les résultats, résumés sur le tableau XXVI, montrent clairement que le composant 5, spécifique de T. cruzi, a une localisation membranaire au niveau de la surface cellulaire et flagellaire. La présence d'antigènes communs à T. cruzi et T. rangeli, ainsi que celle des constituants sériques de veau du milieu de culture, n'a pu être démontrée au niveau de la surface des formes de culture de T. cruzi. Ceci ne veut pas dire que le constituant majeur de la surface cellulaire se trouve être le composant 5 ; en effet, l'utilisation d'un hyperinmunsérum anti-T. rangeli limite l'investigation aux seuls composants communs (les six dixièmes des composants totaux) et préserve l'intérêt que présente l'étude des composants spécifiques de T. cruzi autres que le composant 5.

La localisation du composant 5, au niveau de la surface cellulaire et de la membrane du flagelle externe, renforce la notion d'immunogénicité privilégiée de ce composant spécifique de T. cruzi.

CHAPITRE 9 : DISCUSSION

Avant de dégager la signification des données rassemblées au cours de la présente étude, nous voudrions en rappeler succinctement le cadre et les limites.

Nos résultats ne concernent que les antigènes solubles de divers Trypanosomatidés, accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique. Toutefois, les extraits antigéniques étudiés proviennent d'antigènes totaux (corps cellulaires entiers) et non fractionnés. Ces extraits sont obtenus à partir de populations maintenues in vitro ou in vivo en état de multiplication exponentielle permanente. Nos extraits contiennent vraisemblablement des protéines de structures membranaires car, à deux occasions au cours de la présente étude, nous avons établi une corrélation directe entre un composant soluble détectable par immunoélectrophorèse et des antigènes constitutifs de la membrane ou du manteau cellulaire.

Il faut rappeler que chaque arc de précipitation objective non pas une protéine, mais une famille de protéines, distinctes par leurs caractères physicochimiques, pouvant exercer différentes activités enzymatiques et donc différentes fonctions métaboliques.

En définitive, s'il est certain que l'immunoélectrophorèse n'analyse qu'une partie des composants solubles d'un protozoaire vivant, nous allons voir que cette méthode analytique donne néanmoins des résultats significatifs. La confrontation des données bibliographiques à nos résultats taxonomiques, à nos résultats diagnostiques et à l'étude des spécificités antigéniques, permet d'affirmer une correspondance étroite des caractères généraux du parasite considéré et des caractères immunoélectrophorétiques.

9.1. APPORT DE L'ANALYSE IMMUNOELECTROPHORETIQUE A LA CONNAISSANCE DES STRUCTURES ANTIGENIQUES DES TRYPANOSOMATIDAE HETEROXENES

9.1.1. Reproductibilité des résultats obtenus

L'immunoélectrophorèse, par la spécificité des réactions antigène-anticorps qu'elle suscite, compense largement le manque apparent de sensibilité qui lui est souvent attribuée.

The first part of the discussion is devoted to a general overview of the problem. It is then divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case. The first part is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case.

The second part of the discussion is devoted to the study of the particular case. It is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case. The first part is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case.

The third part of the discussion is devoted to the study of the particular case. It is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case. The first part is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case.

APPENDIX A : BIBLIOGRAPHY

A.1. General Bibliography

The following list of references is given for the general case. It is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case. The first part is divided into two main parts: the first part is devoted to the study of the general case, and the second part is devoted to the study of the particular case.

Si la méthodologie nous apparaît sortir du cadre de cette discussion, la nature des immunsérums mérite d'être envisagée. L'emploi d'anticorps élaborés au cours de l'infection par le parasite vivant, parfaitement justifié lorsque l'étude immunologique des relations hôte-parasite est envisagée, ne fournit qu'un système de référence tronqué lorsqu'il est nécessaire de reconstituer la mosaïque antigénique de ce parasite ou lorsque l'on veut apprécier la spécificité ou analyser la pureté d'un de ses constituants. L'utilisation d'hyperimmunsérums expérimentaux, préparés le plus souvent à l'aide de lapins, immunisés au moyen d'un extrait antigénique total (n'ayant subi qu'un minimum de dégradation au cours de sa préparation) apparaît au contraire comme un procédé analytique de choix pour mener à la connaissance précise de la structure antigénique d'un parasite. Elle constitue par ailleurs la seule voie rationnelle permettant la normalisation qualitative des antigènes et leur purification ultérieure.

Les résultats obtenus sont rigoureusement reproductibles dans la mesure où :

- (i) les extraits antigéniques sont parfaitement normalisés par contrôle immunoélectrophorétique ;
- (ii) les hyperimmunsérums sont obtenus par immunisation prolongée ;
- (iii) les techniques de précipitation en gel sont correctement effectuées avec un rapport antigène-anticorps standardisé.

La plupart des comparaisons immunostructurales de la présente étude ont été effectuées parallèlement dans deux laboratoires distincts (Lille et Anvers) travaillant à l'aide de leurs propres réactifs (antigènes et hyperimmunsérums) préparés selon les mêmes méthodes. La parfaite corrélation des résultats obtenus dans les deux cas paraît constituer une preuve de l'efficacité réelle de l'analyse.

9.1.2. Notion de mosaïque antigénique complexe

Que l'on s'adresse aux formes de culture ou aux formes sanguicoles des trypanosomes et des leishmanies, l'analyse immunoélectrophorétique objective une quarantaine de composants antigéniques. Ce chiffre montre la grande complexité antigénique de ces protozoaires parasites, comparable à celle des protozoaires libres (WILLAERT, 1975), des champignons (BIGUET *et al.*, 1965d), des invertébrés et des vertébrés (CAPRON *et al.*, 1968a ; CAPRON et AFCHAIN, 1970).

Au sein du profil immunoélectrophorétique du parasite, il est important de distinguer les antigènes hétérospécifiques (polysaccharides du type de la substance C, antigènes ubiquistes, antigènes partagés avec le milieu) des antigènes "propres à l'espèce". Chez les helminthes parasites, ces derniers sont aussi appelés "antigènes spécifiquement parasitaires" ; la présence de plusieurs antigènes de T. brucei chez des Flagellés libres (Euglena) (LE RAY, 1975) condamne cette expression. Désirant néanmoins réserver l'appellation "d'antigènes spécifiques" pour désigner les composants qu'un organisme possède seul en propre, nous les qualifierons désormais d'antigènes "propres à l'espèce".

9.1.2.1. Antigènes hétérospécifiques

Ces antigènes sont représentés essentiellement : (i) par des polysaccharides du type de la substance C, (ii) par des antigènes de nature non identifiée mais retrouvés occasionnellement chez des organismes non apparentés et qualifiés d'antigènes ubiquistes, (iii) par des antigènes partagés avec le milieu : hôte vertébré ou milieu de culture.

Ces antigènes hétérospécifiques représentent environ les deux dixièmes de la structure antigénique de chaque flagellé étudié.

● Des polysaccharides du type de la substance C se rencontrent fréquemment dans les extraits antigéniques fongiques et helminthiques (BIGUET et al., 1965a ; CAPRON et al., 1965). Ils ont été trouvés chez les quatre Trypanosomatidae étudiés mais n'entraînent pas de réaction antigène-anticorps vraie (TILLET et FRANCIS, 1930 ; BALDO et FLETCHER, 1973). L'incubation systématique des précipités en présence de citrate trisodique élimine les fausses réactions dues à ces polysaccharides.

● Les antigènes ubiquistes accessibles à l'analyse immunoélectrophorétique ont été recherchés en confrontant T. cruzi, T. brucei et L. donovani à une série d'organismes étrangers au phylum tels que les helminthes et les champignons. L'importance de ces parentés de hasard est pratiquement négligeable. Des réactions croisées ne s'observent que dans cinq cas, tous fongiques, et ne s'expriment que par un seul arc souvent redissous en partie par le citrate trisodique (tableau III).

Par contre, consécutivement aux travaux de RANQUE et al. (1972) et de OELERICH (1973), se confirme la présence de parentés relativement importantes (deux à quatre composants) entre L. donovani et les Mycobacteriaceae ; et l'absence de cette parenté chez T. cruzi.

Les antigènes de type FORSSMAN, signalés chez T. b. brucei (HOUBA et ALLISON, 1966 ; HOUBA et al., 1969) et chez T. cruzi (ENOS et ELTON, 1950), ne sont ordinairement pas détectés par les techniques de précipitation en gel.

Exceptionnellement des réactions croisées, ne s'exprimant souvent que par un seul arc en double diffusion, s'observent avec des sérums de malades atteints de candidose, de cirrhose alcoolique du foie et de lupus érythémateux disséminé. Ces relations antigéniques de hasard n'altèrent pas les résultats du diagnostic immunoélectrophorétique des protozooses concernées. Par contre elles pourraient éventuellement fausser l'interprétation d'un diagnostic immunologique lors de l'emploi de techniques sérologiques plus sensibles et moins spécifiques ; c'est ainsi que OELERICH et al. (1974) ont montré, par les techniques sérologiques de fixation du complément et d'hémagglutination passive, la possibilité de rencontrer des réactions croisées faibles entre T. cruzi et des sérums de malades atteints de lèpre ou de tuberculose, ou encore de Borréliose à B. turicatae selon FELSENFELD et WOLF (1973).

● Les antigènes partagés avec le milieu : hôte vertébré et milieu de culture

L'existence de communautés antigéniques entre les parasites et leurs hôtes est un fait bien établi en bactériologie (GOLDSTEIN, 1972 ; DE VAY et al., 1972) et en parasitologie, notamment chez les helminthes (DAMIAN, 1954 ; CAPRON et al., 1968a). Les Trypanosomatidés ne font pas exception à cette règle : les protéines de milieu de culture ou de l'hôte vertébré constituent la majeure partie des antigènes hétérospécifiques rencontrés au cours de notre étude.

L'analyse immunoélectrophorétique révèle la présence d'au moins 5 à 7 protéines sériques dans les extraits des formes sanguicoles et des formes de culture étudiés. Deux à trois de ces composants sont révélés par l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes parasitaires à l'aide d'hyperimmunsérums anti-milieu ; les autres, par l'analyse immunoélectrophorétique des sérums de lapin immunisés au moyen des extraits parasitaires.

Un phénomène analogue a été décrit dans le cas des formes sanguicoles de T. vivax (KETTERIDGE, 1970, 1971, 1972), de T. b. rhodesiense (BIGALKE, 1966) et de T. lewisi (ENTNER, 1968 ; D'ALESSANDRO, 1972), ainsi que chez les formes de culture de T. theileri (SPLITTER et al., 1967). Certains de ces compo-

sants ont été identifiés à des immunoglobulines (ENTNER, 1968), à une sialoglycoprotéine (KETTERIDGE, 1972) et à des composants érythrocytaires (BIGALKE, 1966).

Nous avons montré, ainsi que SPLITTER et al. 1967), LE RAY (1969) et KETTERIDGE (1971), que cette présence d'antigènes de milieu, aux divers stades évolutifs, n'est pas due à un défaut de lavage des corps parasitaires. Néanmoins, une adsorption à la surface du parasite ainsi qu'une éventuelle séquestration de ces protéines sériques au niveau de la poche flagellaire pourraient rendre compte de ce mode de contamination.

Cependant, 1°) l'étude en microscopie optique et électronique, menée à l'aide d'anticorps anti-protéines sériques marqués indirectement, ne détecte pas la présence d'antigènes hétérospécifiques de milieu à la surface des formes de culture de T. cruzi ni des formes sanguicoles de T. b. brucei. LE RAY (1975) a montré récemment, pour T. b. brucei, l'absence de corrélation entre anticorps anti-hôte et l'activité lytique, ce qui confirme d'une autre façon l'absence d'adsorption de surface. Toutes ces observations à propos de T. b. brucei sont en contradiction avec celles de KETTERIDGE (1971, 1972) qui, chez T. vivax, a montré indirectement, par des tests de trypanolyse, que des globulines sériques de l'hôte sont présentes à la surface du parasite. Il apparaîtrait par conséquent que T. brucei diffère à cet égard de T. vivax.

2°) la probabilité d'une séquestration antigénique au niveau de la poche flagellaire est soulignée par les observations de STEINERT et NOVIKOFF (1960), de BROWN et al. (1965), de BROOKER et PRESTON (1967), de JADIN (1971) et de LANGRETH et BALSER (1975). En effet, tous ces auteurs ont démontré la localisation temporaire des antigènes de milieu, à l'état apparemment non dégradé dans la poche flagellaire et dans les phagosomes qui lui sont associés.

Néanmoins, cette séquestration éventuelle ne peut faire exclure, à priori, la synthèse d'antigènes communs à l'hôte ou au milieu par le trypanosome lui-même. Chez les helminthes parasites et particulièrement chez les schistosomes, les parentés avec l'hôte définitif ne proviennent pas seulement d'une simple adsorption tégumentaire, et diverses hypothèses ont été envisagées par DAMIAN (1964), CAPRON et al. (1968a) et SMITHERS et TERRY (1969) pour les expliquer (absorption digestive, pinocytose et synthèse).

9.1.2.2. Les antigènes "propres à l'espèce"

Par opposition aux antigènes hétérospécifiques, les antigènes "propres à l'espèce" constituent environ les huit dixièmes du profil antigénique des Trypanosomatidés étudiés.

L'absence d'une méthodologie appropriée avait, pendant longtemps, laissé supposer que la complexité antigénique des Protozoaires était réduite en comparaison de celle des Métazoaires. Des travaux récents, ayant eu recours à l'immunoélectrophorèse (AFCHAIN et CAPRON, 1969, 1971 ; LE RAY, 1969, 1975 ; DWYER, 1973 ; AFCHAIN et al., 1975a ; LE RAY, 1976a et b), ont montré que la structure antigénique des trypanosomes et des leishmanies était au contraire d'une grande complexité. Que l'on s'adresse à des extraits solubles provenant de formes de culture ou de formes sanguicoles, 25 à 35 composants antigéniques propres à l'espèce peuvent être mis en évidence, révélant ainsi le profil immunoélectrophorétique caractéristique de chaque parasite étudié.

La notion du stade de développement choisi comme source d'antigène est à prendre en considération (FIFE, 1971). Les conditions techniques de l'analyse immunoélectrophorétique nous ont imposé l'étude des seuls stades de développement où l'obtention en masse des organismes est possible : chez les trypanosomes Stercoraria (T. cruzi, T. rangeli) et les leishmanies (L. donovani), ce sont les formes de culture ; par contre, chez les trypanosomes Salivaria, ce sont également les formes de culture, auxquelles s'ajoutent les formes parasites sanguicoles obtenues en grande quantité chez le rat.

Chez les trypanosomes Salivaria, remarquables par la fréquence de leurs variations antigéniques, les antigènes des formes sanguicoles se divisent en antigènes stables communs à toutes les populations et en antigènes variables. Ces derniers, d'une immunogénicité privilégiée, déterminent un type antigénique ou sérotype à la population sanguicole correspondante. Ainsi, les antigènes des formes sanguicoles voient leur spécificité principalement liée au type antigénique. Par contre, les antigènes des formes de culture sont d'expression constante tout au long de leur entretien.

Chez les trypanosomes Stercoraria (T. cruzi) et les leishmanies (où les phénomènes de variation antigénique chez l'hôte définitif n'ont guère été démontrés), on remarque la même constance des structures antigéniques des formes de culture (chapitres 3.2.1.4. et 3.2.4.3). Cette propriété apparaît être un caractère général des Trypanosomatidés (SEED, 1964 ; BRAY, 1969 ; LE RAY, 1975). De plus, l'existence de différences métaboliques marquées, observées entre les Salivaria et les Stercoraria au niveau de leurs formes sanguicoles, ne se

retrouve pas au niveau des formes de l'insecte ou de culture. Cette stabilité est en faveur de l'emploi des formes de culture dans les études immunotaxonomiques, car elle suggère une grande constance de l'expression antigénique dans cette condition particulière d'entretien. Ces formes de culture sont considérées comme analogues à celles des stades évolutifs des Insectes hôtes intermédiaires.

En conclusion, la structure antigénique des Trypanosomatidae hétéroxènes voit son expression se modifier suivant que l'on s'adresse aux formes de culture ou aux formes sanguicoles. C'est pourquoi, dans la discussion qui suit, l'apport de la connaissance des structures antigéniques sera envisagé séparément, à propos des formes de culture et à propos des formes sanguicoles.

9.2. APPORT DE LA CONNAISSANCE DES ANTIGENES EXTRAITS DES FORMES DE CULTURE

9.2.1. Taxonomie et phylogénèse

Le domaine de la systématique botanique et zoologique avait déjà bénéficié d'informations nouvelles grâce à l'analyse immunoélectrophorétique (BOYDEN, 1964 ; HAWKES, 1968 ; BACKHAUSZ, 1967 ; AVISE, 1974). La comparaison de la structure antigénique de diverses espèces fongiques (BIGUET et al., 1965d) et helminthiques (CAPRON et al., 1968a) et, parmi les Protozoaires, des amibes libres (WILLAERT, 1975) avait permis de caractériser des catégories taxonomiques et de dégager leurs relations phylétiques.

La stabilité antigénique des Trypanosomatidés, cultivés in vitro, apporte-elle des arguments nouveaux d'ordre taxonomique ?

Le groupe des Trypanosomatidae hétéroxènes a fait l'objet d'une classification solide par HOARE (1966, 1972), et de nombreuses spéculations phylogéniques (GRASSE, 1952 ; BAKER, 1963, 1965 ; WALLACE, 1966 ; HOARE, 1967 ; WOO, 1970) basées sur la morphologie et la biologie. Ainsi un tel modèle était-il particulièrement favorable à une évaluation des résultats immunoélectrophorétiques. Le degré d'apparement antigénique a été exprimé par l'indice d'isologie des composants solubles, indice égal au rapport du nombre des composants antigéniques observés en réaction hétérologue au nombre des composants observés en réaction homologue.

A) Groupe - espèce :

a) Au niveau intraspécifique, nos résultats établissent la constance antigénique qualitative des formes de culture de différentes souches de T. cruzi et de L. donovani, d'origines géographiques et parasitaires diverses. Cette constance n'exclut pas la possibilité de différences enzymatiques pouvant expliquer les distinctions de virulence entre souches. Toutefois, si de telles différences existent, elles ne sont pas appréhendées par l'analyse immunoélectrophorétique, dans nos conditions expérimentales.

En contradiction avec nos résultats, NUSSENZWEIG et al. (1963), NUSSENZWEIG et GOBLE (1966) et GONZALEZ-CAPPA et KAGAN (1969) ont réparti des souches de T. cruzi en trois groupes distincts, selon l'existence de différences antigéniques au niveau des formes de culture. Ces trois groupes sont définis suivant le degré d'absorption des anticorps agglutinants et précipitants des immunosérums homologues par les extraits antigéniques des différentes souches. Néanmoins, la démonstration n'est pas évidente ; en effet, les auteurs utilisent des immunosérums pauvres, ne fournissant que quelques systèmes de référence fragmentaires et tronqués en réaction homologue ; de plus, l'absorption d'un immunosérum par un extrait homologue détermine encore une réaction de précipitation vis-à-vis d'une souche hétérologue.

La possibilité de l'existence de telles différences antigéniques entre souches de T. cruzi ne peut être exclue, mais demanderait confirmation à l'aide d'un protocole expérimental analogue au nôtre.

b) Des observations préliminaires, faites en comparant les formes de culture de T. b. brucei et T. b. gambiense, nous avaient révélé l'existence d'une spécificité immunologique entre ces deux sous-espèces, initialement interprétée comme le témoin de la spéciation de ces deux parasites (LE RAY et al., 1971). En fait, la poursuite des travaux par LE RAY (1975) a montré que les antigènes supportant cette spécificité ne sont pas constamment reconnus par l'animal immunisé et qu'il pourrait dès lors s'agir, soit de différences subsécifiques, soit de différences quantitatives. Il est évident que ces deux sous-espèces (HOARE, 1966, 1972) morphologiquement semblables (RUDZINSKA et VICKERMAN, 1969) mais biologiquement distinctes (HOARE, 1972) méritaient d'être analysées par des méthodes plus sensibles que l'analyse immunoélectrophorétique. Certaines de ces méthodes ont apporté récemment des arguments biologiques, biochimiques et immunologiques nouveaux. Elles reposent notamment sur la sensibilité différentielle des parasites à l'action trypanocide du sérum

humain (ROBSON et al., 1972 ; HAWKING et al., 1973), sur l'analyse de leurs ADN (NEWION et BURNETT, 1972 ; STEINERT et al., 1973) et sur la caractérisation de leurs isoenzymes (BAGSTER et PARR, 1973 ; KILGOUR et GODFREY, 1973) ; elles démontreraient que les trois sous-espèces africaines seraient distinctes mais l'hétérogénéité des résultats ne permet pas encore de clore cet inlassable débat.

B) Groupe-genre

a) Au sein de la section Stercoraria, des travaux très préliminaires, en immunoélectrophorèse, avaient montré des relations étroites entre T. (S.) cruzi et T. (S.) vespertilionis (BICE et ZELEDON, 1971) au niveau de six composants antigéniques.

Nous avons comparé des espèces appartenant aux sous-genres Schizotrypanum (T. cruzi, T. dionisii) et Herpetosoma (T. rangeli). Les parentés immuno-chimiques entre ces trois espèces intéressent en fait les six dixièmes de leurs composants antigéniques. Le degré d'isologie observé entre ces trois Stercoraria est comparable à celui des trypanosomes Salivaria.

La parenté antigénique rend compte de l'homogénéité des trypanosomes Stercoraria, tandis que la différence de leurs spécificités antigéniques rend bien compte de la diversité des espèces à ce niveau taxonomique peu élevé.

En raison de son ubiquité, de sa virulence et de sa multiplication intracellulaire chez l'hôte vertébré, T. cruzi est souvent présenté comme un membre aberrant de la section des Stercoraria (BAKER, 1965 ; LUMSDEN, 1974). De même, les tendances Salivaria de T. rangeli, lors de son développement chez l'insecte vecteur, ont été soulignées par HOARE (1969). Nos résultats ne permettent pas d'attribuer à ces caractères une signification phylétique, mais indiquent plutôt qu'il s'agit là de phénomènes de convergence. En effet, l'isologie antigénique partielle observée entre T. cruzi, T. dionisii et T. rangeli et confrontée à celle des trypanosomes Salivaria démontre simultanément l'individualité réelle de la section Stercoraria et son homogénéité.

b) A propos du genre Leishmania, les travaux de BRAY et LAINSON (1966), SCHNEIDER et HERTIG (1966) et CHAVES (1970) n'avaient qu'ébauché la démonstration de parentés entre les leishmanies. De notre expérience, limitée à 3 souches, il résulte que le complexe L. donovani - L. tropica paraît être constitué d'organismes antigéniquement très voisins, chez lesquels il peut néanmoins exister des spécificités de l'ordre de 1 à 2 composants, irrégulièrement reconnus par nos hyperimmunsérums. Cette situation reste délicate à interpréter. Elle est

analogue à celle que nous avons décrite entre les trypanosomes *Salivaria* T. b. brucei et T. b. gambiense. Nos résultats sont à rapprocher de ceux de BRAY et LAINSON (1966) et de SCHNUR et ZUCKERMAN (SCHNUR et al., 1973 ; ZUCKERMAN et al., 1973). Ces derniers auteurs ont observé, à l'aide de la précipitation en gel, l'existence de sérotypes distincts au sein du complexe donovani-tropica.

Des 6 espèces de leishmanies étudiées, ce sont les Leishmania parasites de Reptiles africains qui sont antigéniquement les plus voisines des Leishmania humaines du bassin méditerranéen. Ceci vient à l'appui de l'hypothèse d'ADLER (1964) qui considérait L. adleri comme un jalon phylétique important entre les Leishmania primitives et les Leishmania de mammifères. Nos observations permettent d'étendre ces conclusions à L. tarentolae. Elles conseillent d'envisager une étude approfondie de l'infectivité de ce parasite pour les mammifères.

L'étude des relations antigéniques des leishmanies tendrait à démontrer qu'il s'est produit au sein du genre Leishmania une différenciation moléculaire importante jointe à la conservation des structures morphologiques, contrairement aux phénomènes qui ont affecté le genre Trypanosoma. Les différences antigéniques peuvent être aussi importantes au sein du genre Leishmania qu'au sein du genre Trypanosoma.

c) T. cruzi et T. brucei partagent entre eux ainsi qu'avec L. donovani près des quatre dixièmes de leurs structures immunochimiques. L'apparement de T. cruzi - T. brucei est qualitativement et quantitativement plus marqué que leur apparement respectif à L. donovani. Les parentés immunostructurales entre trypanosomes *Stercoraria* et *Salivaria* sont du même ordre de grandeur que les parentés existant entre le genre Trypanosoma et le genre Leishmania. Ces résultats confirment donc les arguments morphologiques et biologiques ayant conduit HOARE (1966) à distinguer, au sein du genre Trypanosoma, la section des trypanosomes *Salivaria* et celle des trypanosomes *Stercoraria*.

Du point de vue phylogénétique, avant tout essai d'interprétation, il sera nécessaire d'inclure, dans cette étude immunostructurale, un plus grand nombre de représentants des Trypanosomatidae hétéroxènes et de préciser leurs relations avec les Trypanosomatidae monoxènes. Nos résultats actuels suggèrent toutefois une évolution parallèle des trois groupes *Salivaria*, *Stercoraria* et Leishmania.

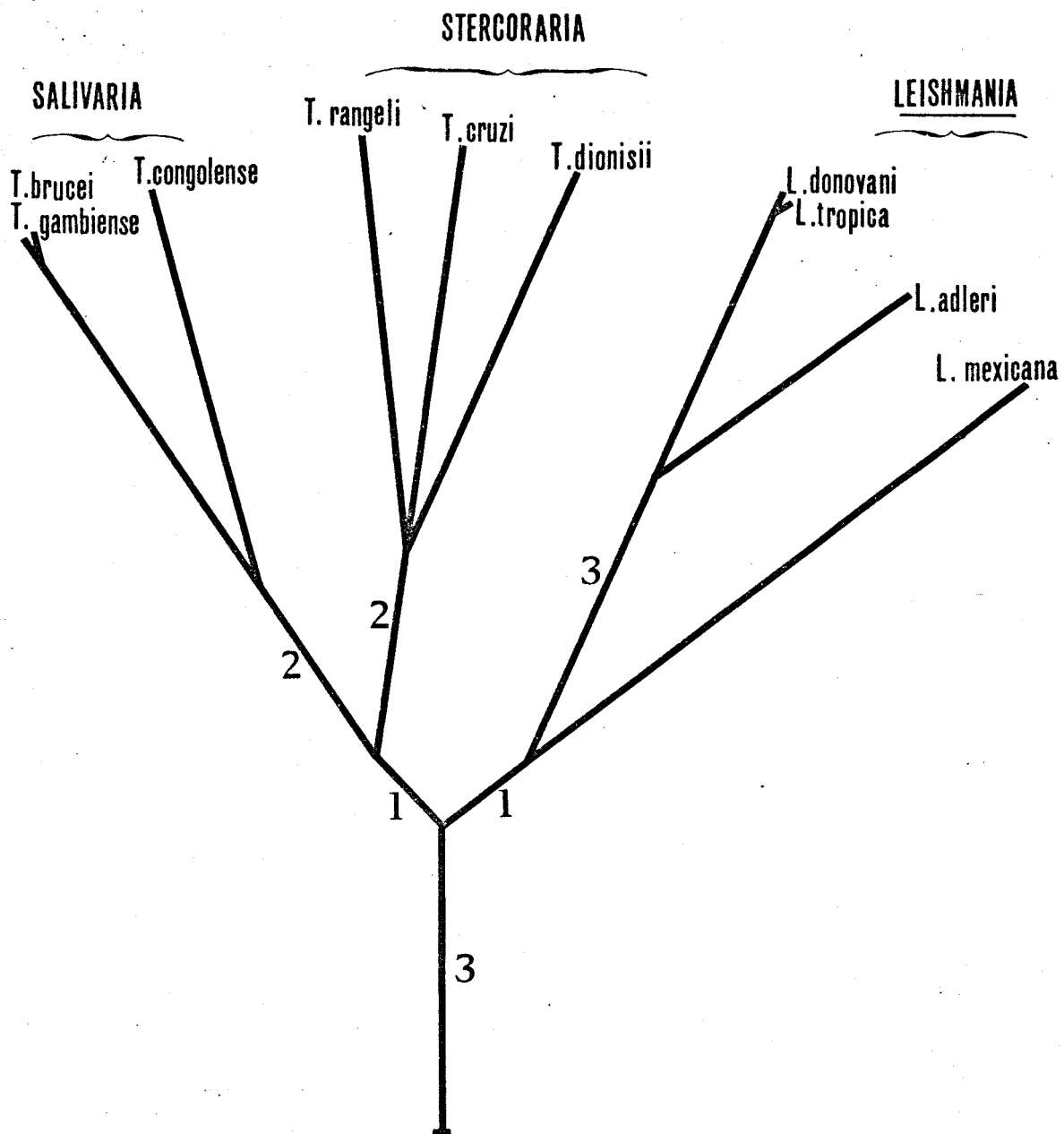


Figure 57 : Essai de reconstitution phylétique des Trypanosomatidae hétéroxènes à partir des données immunoélectrophorétiques. Echelle proportionnelle aux indices d'isologie des composants solubles.

En conclusion, il existe, au sein de la famille des Trypanosomatidae hétéroxènes, une structure immunochimique fondamentale concernant environ les trois dixièmes des composants antigéniques strictement d'espèce et reflétant la mosaïque antigénique originelle. Il paraît s'être produit sur ce fond commun une diversification immunostructurale plus importante que ce que l'on attendait, compte tenu de l'homogénéité de l'organisation cellulaire de ce groupe. Ces deux aspects, d'ailleurs complémentaires, permettent d'attribuer à l'analyse immunoélectrophorétique un rôle privilégié dans les études taxonomiques à mener chez les Protozoaires. Un essai de reconstitution phylétique à partir des données immunoélectrophorétiques est envisagé sur la figure 57.

9.2.2. Notion de personnalité antigénique

Les composants antigéniques non impliqués dans les réactions croisées constituent en fait la personnalité antigénique de chaque parasite étudié, personnalité dont le trait le plus saillant est représenté par un composant remarquable par son immunogénicité. Ces notions de personnalité antigénique et de composant remarquable ont été initialement décrites chez les champignons parasites (BIGUET et al., 1965c) et chez les helminthes (CAPRON et al., 1968a ; CAPRON, 1970). Nous avons également retrouvé au niveau des protozoaires, l'existence d'au moins un composant antigénique remarquable par son immunogénicité et sa spécificité. Il s'agit du composant n°5 "spécifique" de T. cruzi, du moins par rapport aux autres trypanosomes Stercoraria étudiés, et des composants 4 et 24 de L. donovani de spécificité subgénérique.

De l'ensemble des composants antigéniques solubles de T. cruzi objectivables par l'analyse immunoélectrophorétique à l'aide d'hyperimmunsérums homologues, seuls quatre dixièmes de ceux-ci sont spécifiques de T. cruzi. Parmi ces composants, le composant N°5 s'individualise par son immunogénicité privilégiée observée à la fois en immunisation expérimentale et lors des infections expérimentales ou naturelles. De plus, ce composant, d'une très grande antigénicité, a la faculté de déterminer, en précipitation en gel, un arc d'une très grande intensité. Sa localisation sur les diagrammes immunoélectrophorétiques et son double épaulement, à partir du puits de dépôt de l'antigène, sont des caractéristiques très importantes de son identification.

La notion de personnalité antigénique de L. donovani est encore mal élucidée. Les informations concernant les antigènes somatiques solubles de L. donovani ne permettent pas une distinction nette entre L. donovani et L. tropica qui constituent un ensemble particulièrement homogène du point de

vue antigénique. Les différences antigéniques mineures, qu'offrent ces deux espèces, indiquent cependant leur divergence génétique. N'étant pas reconnues avec constance par les animaux immunisés, ces différences n'apparaissent pas suffisamment tranchées pour permettre de caractériser des antigènes spécifiques de L. donovani.

La caractérisation des antigènes d'excrétion - sécrétion par la précipitation en gel a conduit SCHNUR et ZUCKERMAN à distinguer, dans les populations du complexe L. donovani - L. tropica, plusieurs sérotypes dont la distribution n'est pas en accord avec la classification clinique actuelle (SCHNUR et al., 1972, 1973 ; ZUCKERMAN et al., 1973). Cependant, la valeur qualitative et la signification taxonomique de ces sérotypes restent à établir.

Par contre, dans la famille des Trypanosomatidae, les Leishmania se différencient nettement des autres espèces hétéroxènes du genre Trypanosoma. Parmi les composants "spécifiques" des Leishmania, deux composants (N°4 et 24) sont remarquables par leur immunogénicité. Ils déterminent l'apparition précoce d'anticorps précipitants lors de l'immunisation expérimentale. Leur immunogénicité s'exprime de façon comparable au cours de l'infection expérimentale du hamster, par l'apparition privilégiée des précipitines correspondantes. Ils sont reconnus en premier lieu dans le kala-azar canin et humain avec une fréquence élevée. Ils paraissent spécifiques du genre Leishmania.

Outre leur aspect diagnostique, les composants 5 de T. cruzi, 4 et 24 de L. donovani ont un intérêt systématique évident. Ils permettent, en effet, de situer une espèce dans une catégorie taxonomique précise.

9.2.3. Conséquences diagnostiques

La connaissance des antigènes extraits des formes de culture a facilité l'étude des relations hôte-parasite. De manière générale, on sait que l'importance de la réponse humorale chez l'hôte infecté est fonction directe des modalités hôte-parasite et de la charge parasitaire.

Très marquée dans la leishmaniose viscérale, la réponse humorale de l'hôte engendre l'élaboration de taux élevés d'anticorps variés, et de nombreux anticorps précipitants. Ces derniers sont proportionnellement beaucoup plus élevés au cours de la leishmaniose viscérale qu'au cours des autres affections parasitaires dues à des protozoaires (CAPRON et al., 1972) et à des helminthes (CAPRON et al., 1968b), sans doute parce que le système réticulo-endothélial est plus directement impliqué.

Dans la trypanosomiase américaine humaine, les sérums de malades en phase chronique possèdent aussi des anticorps précipitants en nombre relativement important ; ils sont beaucoup moins nombreux lors de la phase aiguë.

Ainsi, l'intensité de la réponse humorale dans la leishmaniose viscérale est nettement plus élevée que dans la maladie de Chagas. L'existence de parentés antigéniques entre les Trypanosomatidae souligne la nécessité d'un immunodiagnostic différentiel dans les zones où les leishmanioses coexistent avec la maladie de Chagas ou les trypanosomiasés africaines. Ces parentés se traduisent par l'existence de plusieurs réactions croisées en diagnostic sérologique (CHANG et NEGHERBON, 1947 ; VITETTA et GUTTMAN, 1967 ; CAMARGO et REBONATO, 1969 ; GARCIA et al., 1969 ; OELERICH, 1969 ; NEAL et MILES, 1970 ; SEAH et MARSDEN, 1970). Ces réactions croisées, appréciées quantitativement en immunoélectrophorèse dans ce travail à l'aide de sérums humains et expérimentaux (tableau XIX), nous conduisent à conseiller la détermination rigoureuse du seuil de spécificité des réactions sérologiques classiques lors du diagnostic de ces protozooses par réaction de fixation du complément, d'hémagglutination passive et d'immunofluorescence indirecte. La pratique conjointe d'au moins deux réactions techniquement éloignées est à recommander. Les qualités analytiques et la précision de l'immunoélectrophorèse confèrent à cette dernière méthode un caractère de spécificité rigoureuse dont l'intérêt est particulièrement évident dans tous les cas où les réactions sérologiques sont positives à un taux peu significatif. L'immunoélectrophorèse a en outre l'avantage qualitatif de permettre la visualisation des systèmes précipitants les plus représentatifs du parasite. C'est ainsi que la démonstration d'anticorps précipitants correspondant aux composants antigéniques n°5 de T. cruzi et n°4 et 24, typiques des Leishmania, permet de poser un diagnostic spécifique et donc d'individualiser un kala-azar dans un foyer d'endémie Chagasiennne.

9.2.4. Isolement du composant N°5 de T. cruzi, sa localisation au niveau de la surface des formes de culture

Avant d'aborder l'étude du rôle immunologique spécifique des antigènes les plus représentatifs d'une espèce parasitaire, il est nécessaire d'entreprendre leur purification immuno-chimique et leur localisation cellulaire. Les possibilités de purification qu'offrent les techniques de chromatographie, d'électrophorèse, ou d'ultracentrifugation, n'ont permis l'obtention de fractions immunologiquement pures que dans de très rares cas (SAWADA et al., 1965 ; KORACH et BENEX, 1966 ; TAILLIEZ, 1970) malgré de nombreux essais, concernant essentiellement des helminthes.

Cette voie physicochimique a été appliquée à un extrait total de T. cruzi par chromatographie sur gel de Séphadex G-200 et G-75. Nous n'avons obtenu qu'un extrait semi-purifié comportant environ le tiers des composants antigéniques totaux dont un certain nombre supportait encore des parentés avec les autres Trypanosomatidés. Le profil des pics de fractionnement et les activités antigéniques des différents pics sont analogues à ceux décrits par GONZALEZ-CAPPA et KAGAN (1973).

L'imperfection des résultats obtenus lors de ces essais de purification par voie physicochimique nous a incité à mettre en oeuvre la technique d'immunoabsorption pour purifier le composant 5 de T. cruzi. Cette technique permet théoriquement un isolement sélectif et rapide d'une fraction antigénique. L'étape initiale de l'immunoabsorption est l'obtention d'un sérum monospécifique. Si dans la description de nos résultats cette méthodologie semble banale, rapide et sans problèmes, il n'en est rien dans la réalité. L'obtention d'un immunosérum monospécifique demande l'immunisation de très nombreux lapins avec le précipité "composant 5 - anti-composant 5" obtenu en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Cette méthode, du moins pour T. cruzi, n'a pas permis l'obtention d'antigène purifié en quantité appréciable. Toutes les préparations ont servi au contrôle de pureté de l'antigène 5 par immunisation de lapins. Il est vrai que le but de cet isolement était de tracer une nouvelle voie d'orientation pour les purifications futures. Celles que nous avons effectuées ont toujours été pratiquées avec des quantités raisonnables d'extrait de T. cruzi (50 à 100 mg). A plus grande échelle, il faut espérer optimiser une telle méthodologie par l'emploi de quantités très importantes d'antisérum monospécifique et surtout d'extrait total. Néanmoins, malgré cette réserve quantitative sur le rendement, les résultats qualitatifs montrent, pour la première fois chez un protozoaire, les possibilités d'isolement à l'état pur de fractions antigéniques.

La surface cellulaire et la membrane du flagelle externe des formes de culture épimastigotes de T. cruzi sont formées pour une part d'antigènes correspondant au composant 5. Cette situation explique en partie l'immunogénicité privilégiée du composant 5 lors des infections expérimentales et humaines, car les antigènes de surface, tout comme les produits d'excrétion - sécrétion, jouent un rôle privilégié dans la réponse immunologique de l'hôte au parasitisme. Or les premiers anticorps précipitants, décelables lors des infections expérimentales et humaines, sont bien ceux correspondant au composant N°5.

Les épreuves diagnostiques par agglutination, à l'aide des formes de culture de T. cruzi, seraient pour certains auteurs d'une grande spécificité (VATTUONE et YANAVSKY, 1971 ; ALLAIN et KAGAN, 1974). Ces résultats s'expliqueraient par le rôle privilégié que doivent jouer les antigènes 5 dans une telle réaction.

Suite au fractionnement subcellulaire des formes de culture de T. cruzi (SEGURA et al., 1975), nous avons montré que la fraction contenant les membranes cellulaires et les flagelles réagissait d'une façon privilégiée avec les anticorps précipitants anti-composant 5 (SEGURA, communication personnelle, travail de collaboration en cours de réalisation). Ces résultats confirment nos observations ultrastructurales en immunoperoxydase.

Des travaux préliminaires, obtenus par GONZALEZ-CAPPA et SEGURA (communication personnelle), montrent une éventuelle possibilité de vaccination expérimentale de la souris à l'aide de la fraction membranaire et flagellaire des formes de culture de T. cruzi. Aussi, l'isolement et l'obtention à l'état pur du composant 5 de T. cruzi, pourrait avoir d'importantes répercussions sur l'immunoprophylaxie de cette parasitose.

Les tentatives d'immunisation contre T. cruzi réalisées - soit par des antigènes homologues : parasites vivants (souches avirulentes ou inactivées), broyats (JOHNSON et al., 1963), ou antigènes grossièrement purifiés (KANEDA, 1973), - soit par des antigènes hétérologues de Trypanosomatidae monoxènes (SOUZA et ROITMAN, 1972), ont conduit à des résultats variables et difficilement interprétables. Elles révèlent la nécessité de procéder dans les années à venir 1°) à une purification des divers antigènes susceptibles d'induire la protection, et 2°) à une analyse précise de leur fonction immunogène humorale et cellulaire.

9.3. APPORT DE LA CONNAISSANCE DES ANTIGENES EXTRAITS DES FORMES SANGUICOLES DES SALIVARIA

Le rôle fonctionnel des antigènes spécifiques de stade évolutif n'a pu être abordé dans notre étude qu'à propos des trypanosomes Salivaria (T. b. gambiense et T. b. brucei). Les trypanosomes Stercoraria et les Leishmania présenteraient également des transformations cycliques de leur profil antigénique ; mais peu de renseignements ont été acquis à cet égard jusqu'à présent. Chez L. donovani, lors de la transformation des formes micromastigotes en formes promastigotes, des composants antigéniques spécifiques de ces deux stades ont

été visualisés par précipitation en gel (SIMPSON, 1968 ; DWYER, 1973). Pour T. cruzi, une étude récente (KLOETZEL et al., 1975) effectuée en immunofluorescence indirecte suggère l'existence de spécificités antigéniques liées aux trois stades de développement.

9.3.1. Spécificités de stade évolutif et de type antigénique chez T. b. gambiense. Répercussions diagnostiques

Chez les trypanosomes Salivaria, l'étude des spécificités antigéniques a surtout été envisagée au niveau des antigènes de surface des formes sanguicoles et à l'aide des méthodes d'agglutination et de lyse (LOURIE et O'CONNOR, 1937 ; CUNNINGHAM et VICKERMAN, 1962 ; GRAY, 1962). A propos de T. b. gambiense, les deux voies principales de recherche ont concerné la variation antigénique (GRAY, 1972, 1975 ; SEED, 1972 ; OELERICH et MANNWEILER, 1972 ; TAKAYANAGI, 1970, 1973a) et l'obtention d'extrait antigénique à des fins diagnostiques (DESMET et al., 1970 ; WANE, 1972). Dans les deux cas, les résultats acquis à propos de T. b. brucei ont trop souvent été extrapolés à T. b. gambiense.

Qu'il s'agisse de l'étude de la variation antigénique dans un but d'immunoprophylaxie ou de la mise au point de techniques d'immunodiagnostic, la connaissance fondamentale de la structure antigénique a toujours été négligée. Une approche rationnelle des structures antigéniques des deux stades évolutifs, nous a permis de préciser les composants antigéniques impliqués dans la variation antigénique et d'aborder le diagnostic immunologique sur des connaissances précises et rigoureuses. Comme chez T. b. brucei (LE RAY et al., 1973a ; LE RAY, 1975), les épreuves d'absorption démontrent, qualitativement, l'existence d'antigènes spécifiques de stade chez T. b. gambiense (AFCHAIN et al., 1975a). Les formes de culture possèdent en propre un minimum de quatre composants anodiques d'immunogénicité médiocre. Les formes sanguicoles se caractérisent par la présence de quatre composants spécifiques, de localisation cathodique, dont deux sont doués d'une immunogénicité majeure. En outre, la comparaison de populations clônées sérologiquement distinctes permet de préciser que la variabilité antigénique affecte spécifiquement les deux composants majeurs cathodiques.

Une situation immunoélectrophorétique similaire mais moins complexe se retrouve chez T. b. brucei (LE RAY et al., 1973a). Les variants antigéniques de T. b. brucei se caractérisent par la présence d'un seul composant appelé V, affecté par la variabilité antigénique.

Ces composants spécifiques du type antigénique de T. b. gambiense témoignent en outre d'une hétérogénéité importante dans leurs motifs antigéniques. En effet, le composant majeur, situé sous le puits de dépôt de l'antigène, présente plusieurs éperons aux extrémités de l'arc de précipitation. Ces composants variables représentent donc en fait une famille complexe d'antigènes.

De ce travail descriptif, plusieurs caractères généraux concernant les antigènes variables peuvent être néanmoins dégagés. Le fait le plus significatif est la constance de la localisation immunoélectrophorétique des antigènes variables. Cette localisation cathodique est constante ; elle a été observée à propos des différents sérotypes de T. b. brucei (WEITZ, 1960 ; WILLIAMSON et BROWN, 1964 ; BIGALKE, 1966), de T. b. rhodesiense (OELERICH et MANNWEILER, 1970), de T. b. gambiense (OELERICH et MANNWEILER, 1972 ; TAKAYANAGI et al., 1973a), de T. evansi (LE RAY et KAGERUKA, communication personnelle) et de T. equiperdum (MATTERN et al., 1975). Ceci semble indiquer que les antigènes variables des différents trypanosomes *Salivaria* possèdent des caractéristiques moléculaires communes ou très proches.

Deux autres caractéristiques des antigènes variables concernent leur hétérogénéité physicochimique et leur localisation à la surface du trypanosome. Ces aspects seront envisagés et discutés à propos de T. b. brucei chez lequel la purification immunochimique des antigènes variables s'est avérée riche d'enseignements.

Enfin, un dernier caractère des antigènes variables des trypanosomes *Salivaria* est leur immunogénicité majeure que nous confirmons chez T. b. gambiense. Lors de l'immunisation expérimentale, il s'élabore une quantité exceptionnellement élevée d'anticorps précipitants correspondants ; lors de l'infection expérimentale, un phénomène analogue est observé par GRAY (1965a), SEED et al. (1969), SEED (1972) et VAN MEIRVENNE et al. (1973b, 1975a et b). C'est ainsi qu'au cours d'infections expérimentales de lapins, des anticorps lytiques et des anticorps observables en réaction d'immunofluorescence, spécifiques des antigènes variables, apparaissent rapidement dès le 5ème jour (GRAY, 1965 ; VAN MEIRVENNE, 1975a) ; les anticorps précipitants spécifiques du sérotype sont décelables vers le 10ème jour et fait très important, se maintiennent très longtemps (LE RAY, 1975). De même, LE RAY (1975) a montré toujours à propos

de T. brucei, qu'après l'arrêt d'une hyperimmunisation, les anticorps précipitants anti-composant variable V se maintiennent pendant près d'un an. Ceci nous semble important pour la compréhension de la réponse immunologique de l'hôte infecté et en particulier dans le cadre du diagnostic. Nous avons montré que les antigènes extraits des formes de culture de T. b. gambiense ne permettent pas d'assurer le diagnostic immunoélectrophorétique de cette parasitose. Par contre, l'emploi d'un antigène extrait des formes sanguicoles de T. b. gambiense permet de poser, de façon quasi-systématique, le diagnostic immunoélectrophorétique de la maladie du sommeil. Les composants les plus représentatifs, assurant la spécificité de la réaction, sont tous situés en position cathodique sur le diagramme immunoélectrophorétique. Ceci est un apport capital pour le diagnostic de cette parasitose. Tout aussi importante à considérer est l'immunogénicité fonctionnelle des antigènes responsables de la réponse humorale chez l'hôte naturel. Nous avons observé qu'au moins une partie de cette réponse humorale était due aux antigènes variables de la population clônée correspondant au sérotype LiTat-1. L'emploi d'un extrait des formes sanguicoles du sérotype LiTat-2 ne permet pas d'assurer le diagnostic avec un pourcentage élevé de positivité. Cette différence de réactivité pourrait être éventuellement due à des variations qualitatives lors de la préparation des extraits antigéniques solubles ; mais il est plus logique de penser que la réponse humorale de l'hôte vertébré est déclanchée, en majeure partie, par les antigènes variables correspondant aux types antigéniques les plus dominants. En effet, nos observations chez T. b. gambiense, ainsi que celles de LE RAY à propos de T. b. brucei (1975), montrent que l'immunogénicité des antigènes variables n'a pas la même intensité pour tous les sérotypes. Les composants variables du sérotype LiTat-2 de T. b. gambiense et du sérotype AnTat-2 de T. b. brucei possèdent une immunogénicité plus faible et ne suscitent pas régulièrement l'élaboration d'anticorps précipitants lors d'une hyperimmunisation. De plus, ils se distinguent des types dominants par une infectivité réduite pour l'animal. Des faits similaires ont déjà démontré précédemment qu'il existait une relation étroite entre le type antigénique et la virulence (Mac NEILLAGE et HERBERT, 1968 ; GRAY, 1969 ; SOLTYS et TIZARD, 1972 ; VAN MEIRVENNE et al., 1975b).

Ces différences d'immunogénicité entre les types antigéniques doivent être importantes à considérer dans le cadre de la réponse humorale de l'hôte vertébré. Ces faits suggèrent que le diagnostic immunologique de la maladie du sommeil à T. gambiense serait assuré, pour une partie, par les anticorps correspondant aux types antigéniques dominants. La révélation quasi-

systematique de ces anticorps pourrait être due soit à leur persistance pendant une période très longue, soit à la réapparition périodique de certains types antigéniques dominants lors de la succession des "vagues" de parasitémie.

Néanmoins, la réponse humorale de l'hôte vertébré est complexe. Elle est déterminée à la fois par des composants cathodiques stables communs aux différentes populations sanguicoles et par des composants variables appartenant aux sérotypes dominants. Ceci limite considérablement les possibilités diagnostiques dans la maladie du sommeil à T. b. gambiense. Si l'intérêt de recourir aux formes sanguicoles semble évident, il faut se limiter à l'emploi de certains types antigéniques dominants tel LiTat-1.

9.3.2. La variation antigénique chez T. b. brucei. Isolement et localisation du composant variable

Les techniques physicochimiques n'ont pas permis jusqu'à présent l'obtention d'un antigène variable de trypanosome *Salivaria*, à l'état purifié. L'emploi de la chromatographie d'affinité utilisant l'immunoabsorption, couplée avec des contrôles analytiques en immunoélectrophorèse simple et bidimensionnelle, nous a permis d'obtenir à l'état pur le composant antigénique V, spécifique du sérotype AnTat-1 de T. b. brucei, et corrélativement l'antisérum monospécifique correspondant. Ceci est essentiel pour les futurs progrès dans la connaissance analytique de la variation antigénique des trypanosomes *Salivaria*.

Dans cette étude, les techniques de précipitation en gel après carbamylation de l'extrait antigénique total ont montré que le composant variable V serait formé d'au moins deux familles complexes de protéines. Cette hétérogénéité physicochimique ne peut être due à une hétérogénéité de la population clônée de trypanosomes. En effet, les sérotypages, effectués en immunofluorescence et par le test de trypanolyse, ont montré que la population clônée, utilisée dans ce travail, est constituée de 100 % d'organismes du type AnTat-1. Cependant, cette éventuelle hétérogénéité physicochimique pourrait résulter d'une dénaturation de l'extrait antigénique lors de la carbamylation.

Néanmoins, cette observation est en accord avec les travaux antérieurs. WILLIAMSON et BROWN (1964) ont montré que les antigènes spécifiques de variant comportaient deux groupes de protéines ayant un poids moléculaire distinct, chacun de ces deux groupes étant formé par différents composants antigéniques. De même, ALLSOPP et NJOGU (1974) ont rapporté que les antigènes variables de T. b. brucei, étudiés par électrophorèse annulaire en gel d'acrylamide et par chromatographie, peuvent être séparés en deux groupes. Mais dans ces deux études, les populations n'étaient pas clônées et les auteurs n'avaient pas envisagé des épreuves d'absorption croisée.

A condition qu'il ne s'agisse pas d'une dénaturation après carbamylation, les deux sous-unités physicochimiques du composant variable V, montrent des pics parfaitement parallèles en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Cette configuration similaire nous autorise à penser que l'hétérogénéité physicochimique apparente pourrait résulter de la présence de différents polymères. Cette possible polymérisation pourrait peut-être expliquer les poids moléculaires variés et différents attribués aux antigènes variables : de 20 000 à 260 000 (WILLIAMSON et BROWN, 1964 ; LE PAGE, 1968 ; LANHAM et TAYLOR, 1972 ; CROSS, 1973 ; TAKAYANAGI et al., 1973a).

En analyse immunoélectrophorétique bidimensionnelle, chaque pic présente trois épaulements successifs mais continus, suggérant une hétérogénéité immunochimique.

La purification des antigènes variables de T. b. brucei par la chromatographie d'affinité est d'ailleurs la première étape de l'analyse moléculaire de ces antigènes.

Les observations en microscopie optique et électronique à l'aide de marquages indirects à la fluorescéine et à la peroxydase, nous ont montré que le composant variable V est le constituant majeur du manteau des formes sanguicoles de T. b. brucei. Nos résultats ont été acquis à l'aide d'anticorps monospécifiques marqués indirectement, préparés avec une population clônée et sérotypée. Ceux-ci confirment et développent les arguments préliminaires de VICKERMAN et LUCKINS (1969) aussi bien que les déductions biochimiques indirectes de CROSS (1973) et de NJOGU et al. (1974).

Il est important de souligner le marquage homogène que nous avons observé en microscopie électronique. A cause de la préfixation à la glutaraldéhyde, indispensable pour éviter une trypanolyse, il n'a été possible d'explorer que les seuls antigènes de surface et de ce fait aucun marquage ne

peut être observé dans le cytoplasme et la poche flagellaire. Une distribution homogène du composant variable V est observée tout autour de la surface cellulaire et sur la membrane du flagelle externe. Ces observations ne sont pas en accord avec les résultats de TAKAYANAGI et al. (1973b), chez T. b. gambiense, qui observent, avec des anticorps conjugués à la ferritine, une localisation presque négligeable autour de la surface cellulaire et un marquage particulièrement abondant sur la membrane du flagelle externe ; toutefois, la nature exacte des anticorps conjugués à la ferritine n'est pas explicite et les contrôles analytiques immunologiques de monospécificité n'ont pas été envisagés par ces auteurs.

Dans les limites de la technique et des antisérums utilisés (anti-formes de culture de T. b. brucei, anti-formes sanguicoles d'un autre variant : AnTat-2, anti-antigènes d'hôte), seul le composant variable V a pu être mis en évidence sur le manteau cellulaire d'AnTat-1. Or, des expériences, concernant T. vivax (KETTERIDGE, 1972), ont montré que des anticorps anti-protéines d'hôte étaient lytiques pour les trypanostigotes vivants. De nos résultats, il apparaît que T. b. brucei diffère, à cet égard, de T. vivax. D'ailleurs, récemment LE RAY (1975) chez T. b. brucei, a montré l'absence de corrélations entre anticorps anti-hôte et l'activité lytique ; mais il suggère indirectement, par les tests de trypanolyse et leurs comparaisons avec les résultats immunoélectrophorétiques, la présence sur les formes sanguicoles d'un antigène commun aux différents sérotypes sanguicoles et aux formes de culture. Nos observations, effectuées avec des antisérums dirigés contre les formes sanguicoles du sérotype AnTat-2 et contre les formes de culture, ne confirment pas cette suggestion. Les réactions négatives que nous avons obtenues en immunoperoxydase, méthode d'une grande sensibilité, en corrélation avec les tests de trypanolyse, apparaissent être une bonne indication de la spécificité de nos résultats. Néanmoins, nous ne pouvons exclure l'éventualité d'un certain masquage antigénique par l'antigène variable, au niveau du manteau cellulaire des formes sanguicoles ; la préfixation renforce l'inaccessibilité des anticorps pour les antigènes communs ou réduit l'affinité antigène-anticorps. Même si un tel phénomène existe, il n'en reste pas moins vrai que l'antigénicité majeure du manteau de la surface cellulaire et de la membrane flagellaire de T. b. brucei est essentiellement exprimée par les antigènes spécifiques de variant.

L'obtention des antigènes variables à l'état pur permettra peut-être d'analyser avec précision la réponse immunologique spécifique induite chez l'hôte vertébré ainsi que les mécanismes de destruction lors de la trypanolyse. En effet, une immunité absolue a pu être induite par des antigènes parasitaires mais elle se révèle spécifique du type antigénique (SEED, 1963), la réponse trypanocide de l'hôte se trouvant rapidement esquivée par le développement de populations antigéniquement distinctes. En fait, il apparaît qu'il reste beaucoup à faire, à la fois dans l'appréciation de la fonction immunogène précise des antigènes identifiés mais également dans celle de la part respective que jouent, dans cette immunité, les mécanismes humoraux ou cellulaires ou leur éventuelle coopération.

CONCLUSION

Le développement de la recherche en immunologie parasitaire, au cours des dernières années, et plus précisément, les travaux consacrés aux Trypanosomatidae ont permis d'atteindre plusieurs objectifs.

Le premier est d'ordre théorique ; il démontre que les parasites constituent, par leurs caractères biologiques et par les modalités de la réponse immunitaire qu'ils induisent chez leur hôte, des modèles privilégiés de recherche fondamentale en immunologie des maladies infectieuses, dont l'intérêt, par conséquent, déborde largement le cadre de la parasitologie.

Ces modèles parasitaires constituent un matériel de choix pour l'étude de nombreux mécanismes immunologiques :

- a) L'acquisition d'antigènes d'hôte, particulièrement bien étudiée chez les schistosomes, mériterait d'être analysée chez les trypanosomes et les leishmanies aussi bien au niveau de l'hôte vertébré qu'à celui de l'hôte invertébré.
- b) L'intervention de mécanismes d'immunosuppression est actuellement suspectée dans le paludisme et la trypanosomiase. Des phénomènes d'immunosuppression spécifique, liée à une dépression spécifique de la réponse T ont été démontrés dans la leishmaniose cutanée diffuse ; des mécanismes immunosuppresseurs différents, liés à des phénomènes de compétition antigénique entraînant une diminution de la réponse immune des sujets atteints de maladie du sommeil vis-à-vis d'antigènes variés, ont été décrits. La production par les parasites de substances non spécifiques, susceptibles de bloquer les réactions immunitaires des malades, n'est actuellement pas exclue dans les affections à flagellés sanguicoles.
- c) La plupart des parasites libèrent chez leur hôte, soit des produits d'excrétion, soit des produits de sécrétion. Il s'ensuit que, dans de nombreuses parasitoses, des antigènes parasitaires solubles ont été décelés dans le sérum et/ou dans les urines des hôtes infectés. Le rôle de ces antigènes dans la survie du parasite apparaît multiple : compétition antigénique, induction de tolérance, stimulation de cellules T suppressives, neutralisation d'anticorps de haute affinité, formation de complexes circulants, immunodéviations. Ces recherches peuvent dorénavant être menées dans les affections à Trypanosomatidae.
- d) L'étude des mécanismes intimes de la variation antigénique chez les trypan-

nosomes et les coccidies (Plasmodium et Babesia) débordent le cadre de la parasitologie : la variabilité antigénique chez certains groupes de protozoaires libres (Paramecium) serait le résultat d'une expression génique induite par le milieu ambiant et contrôlée par l'état du cytoplasme. La variation antigénique est certainement un facteur essentiel de survie de l'organisme parasitaire, et la compréhension d'un tel mécanisme risque d'avoir d'importantes répercussions en biologie cellulaire.

Le second objectif est d'ordre pratique. Il se rapporte à la connaissance précise de l'antigénicité parasitaire. Cette dernière a mené 1°) à la mise au point de méthodes immunoélectrophorétiques de diagnostic précis et rigoureux en ce qui concerne les affections déterminées par L. donovani, T. cruzi et T. b. gambiense ; 2°) à la purification de certains antigènes (composant 5 de T. cruzi, composant variable V de T. b. brucei) dont l'immunogénicité peut désormais être étudiée en relation avec le développement chez l'hôte des mécanismes effecteurs humoraux ou à médiation cellulaire récemment décrits.

L'utilisation de méthodes immunoenzymologiques modernes faisant appel à des antigènes purifiés, telle la technique d'immunoabsorption d'enzymes conjuguées (E.L.I.S.A. : Enzyme Linked Immunosorbent Assay), ouvre désormais la voie au diagnostic rigoureusement spécifique, quantitatif et automatisé de la maladie de Chagas et peut-être plus tard, grâce à des recherches complémentaires, au diagnostic de la maladie du sommeil et la leishmaniose viscérale ; de la même façon que ce diagnostic est déjà applicable à certaines helminthiases (BOUT et al., 1975).

Un dernier objectif pratique, toujours visé, est constitué par la vaccination préventive contre les maladies infectieuses. Celle-ci existera-t-elle bientôt contre les trypanosomiasés et les leishmaniosés ? Il faudra sûrement encore attendre plusieurs décades, mais les progrès récents réalisés dans la connaissance des antigènes de ces flagellés permettent d'envisager, avec un optimisme relatif, l'isolement d'antigènes protecteurs.

RESUME

Les caractères antigéniques de quelques trypanosomes (T. cruzi, T. rangeli, T. dionisii, T. gambiense, T. brucei) et leishmanies (L. donovani, L. tropica, L. mexicana, L. enrietti, L. adleri, L. tarentolae) ont été précipités au moyen d'une étude comparative menée par les techniques de précipitation en gel (double diffusion et immunoélectrophorèse).

La connaissance des antigènes, les plus représentatifs des Trypanosomatidés parasites de l'homme, dépendait de l'inventaire préalable de leur structure antigénique, de l'étude des parentés intra- et interspécifiques et des relations hôte-parasite. L'efficacité de l'analyse immunoélectrophorétique, grâce à l'emploi d'extraits antigéniques de bonne qualité et d'antisérums hyperimmuns, a permis, avec l'aide des épreuves d'absorption croisée, de souligner l'existence d'antigènes hautement spécifiques et très immunogènes.

1. Structure antigénique

L'existence d'antigènes, liés à la séquestration ou à l'adsorption par le parasite de substances provenant de l'hôte vertébré ou du milieu de culture, conduit à la nécessité d'épreuves d'absorption avant toute étude rigoureuse des antigènes propres à l'espèce. Nos observations démontrent :

- a) l'existence d'antigènes ubiquitaires (polysaccharides du type de la substance C, parentés entre les leishmanies et les mycobactéries atypiques), dont la signification fonctionnelle reste imprécise ;
- b) la grande complexité des antigènes somatiques solubles, propres à l'espèce, des trypanosomes et des leishmanies. Vingt-cinq à trente composants antigéniques ont été identifiés chez chacun des parasites étudiés ; certains de ces composants, bien différents d'une espèce à l'autre, confèrent à chacune d'elles un profil immunochimique caractéristique.

2. Etudes intra- et interspécifiques, et relations hôte-parasite

L'analyse immunoélectrophorétique comparée des structures antigéniques des Trypanosomatidés hétéroxènes permet l'étude précise des relations interspécifiques, des variations intraspécifiques et des relations hôte-parasite.

a) Les parentés antigéniques des trypanosomes Salivaria, des trypanosomes Stercoraria et des Leishmania s'établissent comme suit.

● Au niveau de la section Stercoraria, entre les sous-genres Schizotrypanum (T. cruzi, T. dionisii) et Herpetosoma (T. rangeli), les parentés intéressent environ les six dixièmes des composants totaux identifiés.

● Au sein du genre Leishmania, s'individualisent trois groupes de parentés pourvus, à notre avis, d'une valeur taxonomique et phylogénétique. Le complexe Leishmania donovani-tropica comprend des protozoaires antigéniquement très voisins ; il offre plus de parentés antigéniques avec les Leishmania parasites de Reptiles africains (L. adleri, L. tarentolae) (sept dixièmes) qu'avec une leishmanie humaine d'Amérique latine (L. mexicana) (quatre dixièmes).

● Au niveau des sections Stercoraria (T. cruzi) et Salivaria (T. brucei) et au niveau des genres Leishmania (L. donovani) et Trypanosoma (T. cruzi, T. brucei), les parentés antigéniques révélées concernent sensiblement les trois dixièmes de la structure antigénique.

b) Chez les trypanosomes Salivaria, où le cycle évolutif individualise des stades différents successifs, on peut identifier des antigènes spécifiques de ces stades. Les épreuves d'absorption croisée confirment l'existence chez T. b. gambiense de plusieurs composants antigéniques, - les uns, spécifiques des formes de culture, considérées comme équivalentes des formes du tube digestif des glossines, - les autres, spécifiques des formes sanguicoles, parasites de l'homme. Parmi ces derniers, au moins deux composants sont spécifiques de chaque variant, représenté par une population sanguicole clônée et sérotypée; ils supportent la spécificité immuno-chimique des antigènes variables.

c) Le fait essentiel de cette analyse des structures antigéniques réside dans la mise en évidence au sein de cette mosaïque complexe, d'antigènes très caractéristiques de l'espèce et très immunogènes.

L'immunogénicité de certains composants antigéniques, établie primitivement à l'aide d'hyperimmunsérums expérimentaux, est confirmée dans un second temps par l'analyse de sérums d'infection humaine naturelle et de sérums d'infection expérimentale d'animaux de laboratoire.

Il s'agit : (i) du composant n°5 spécifique de T. cruzi par rapport aux autres Trypanosomatidés étudiés, (ii) des composants 4 et 24 de L. donovani spécifiques du genre Leishmania, et (iii) des composants "cathodiques" spécifiques des formes sanguicoles de T. b. gambiense.

Les progrès, concernant la connaissance de la structure antigénique globale des Trypanosomatidés et surtout celle des composants reflétant la personnalité antigénique des espèces de cette famille de protozoaires, ont permis de progresser dans l'étude des relations hôte-parasite menée lors des infections humaines et expérimentales. Un nombre important de systèmes précipitants est révélabile chez les malades atteints de leishmaniose viscérale ou de la maladie de Chagas. Par contre, ce nombre est plus faible dans la trypanosomiase africaine à T. gambiense quel que soit le type d'antigène utilisé. L'emploi d'antigène extrait des formes sanguicoles permet d'assurer le diagnostic immunoélectrophorétique de cette parasitose.

En dépit de la variabilité de la réponse humorale observée dans les infections déterminées par les Trypanosomatidés, la révélation des anticorps précipitants par immunoélectrophorèse occupe une place de choix parmi les méthodes diagnostiques de laboratoire, en raison de la spécificité conférée à ces techniques par l'existence de composants immunogènes et spécifiques, déterminant la production des anticorps correspondants.

3. Purification et localisation subcellulaire

Enfin, la chromatographie d'affinité, utilisant des immunoadsorbants, permet la purification du composant n°5 spécifique de T. cruzi et du composant variable V, spécifique des formes sanguicoles de T. b. brucei ; ainsi que, corrélativement, l'obtention des antisérums monospécifiques correspondants.

La localisation subcellulaire de ces antigènes est désormais rendue possible à l'aide des techniques d'immunofluorescence et d'immunoperoxydase utilisant la microscopie optique et électronique. Déjà ces techniques nous ont permis : (i) de localiser des antigènes correspondant au composant n°5 à la surface des formes de culture de T. cruzi, et (ii) de montrer la localisation du composant variable V de T. b. brucei au niveau du manteau de la surface cellulaire et de la membrane du flagelle externe des formes sanguicoles homologues.

4. Conclusion

La connaissance de l'antigénicité des composants les plus représentatifs des Trypanosomatidés permettra une meilleure approche des problèmes diagnostiques et immunoprophylactiques, ainsi que l'étude des mécanismes moléculaires de la variation antigénique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABELEV, G.I. (1960) : Modification of the agar precipitation method for comparing two antigen-antiserum systems. *Folia Biol.* 6 : 56 - 58.
- ADLER, S. (1964) : Leishmania. *Adv. Parasit.* 2 : 35 - 96.
- ADLER, S. (1965) : Immunology of leishmaniasis. *Israel J. med. Sci.* 1 : 9 - 13.
- ADLER, S. & GUNDERS, A.E. (1964) : Secretion of antigen in cultures of leptomonads and hamster spleen infected with Leishmania. *J. Protozool.* 11, Suppl., 42.
- AFCHAIN, D. (1970) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase américaine humaine et expérimentale de la souris. Thèse troisième cycle, Faculté des Sciences, Lille, 56pp.
- AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1969) : Etude préliminaire des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *C. R. Acad. Sci. Paris, D* 269 : 272 - 274.
- AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1971) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *Gaz. méd. Bahia* 71 : 7 - 15.
- AFCHAIN, D., CAPRON, A. & PRATA, A. (1970) : Les anticorps précipitants dans la trypanosomiase américaine humaine. *Gaz. méd. Bahia* 3 : 141 - 147.
- AFCHAIN, D., LE RAY, D., CAPRON, A. & JADIN, J. (1973) : Analyse antigénique comparée, par immunoélectrophorèse, des formes de culture de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi, Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et Leishmania donovani. Conséquences taxonomiques et diagnostiques. *Protistologica* 9 : 213 - 220.
- AFCHAIN, D., LE RAY, D., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1974) : Comparative antigenic analysis of trypanosomes Stercoraria. Practical consequences. *Proc. third int. Congress Parasit., München*, pp. 216 - 217.
- AFCHAIN, D., LE RAY, D., VAN MEIRVENNE, N., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1975a) : Analyse immunoélectrophorétique comparative des formes de culture et des formes sanguicoles de Trypanosoma (Trypanozoon) brucei gambiense. Caractérisation d'antigènes spécifiques de stade et de type antigénique. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 126 C : 45 - 50.

AFCHAIN, D., TONNEL, J., FRUIT, J., DUGIMONT, J.C., WAITRE, P., CAPRON, A., LE BRAS, M. & BERTRAND, Ed. (1975b) : Apport de l'immunologie au diagnostic de la maladie du sommeil à T (T.) b. gambiense.
Méd. Afr. noire 22 : 1 - 10.

AFCHAIN, D., FRUIT, J., PETITPREZ, A., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., BOUT, D. & CAPRON, A. (1976) : Trypanosoma brucei brucei : a variant specific antigenic component. I - Immunochemical purification by affinity chromatography.
Exp. Parasit., sous presse.

ALLAIN, D.S. & KAGAN, I.G. (1974) : An evaluation of the direct agglutination test for Chagas'disease.
J. Parasit. 60 : 179 - 184.

ALLSOPP, B.A. & NJOJU, A.R. (1974) : Monosaccharide composition of the surface glycoprotein antigens of Trypanosoma brucei.
Parasit. 69 : 271 - 281.

ALLSOPP, B.A., NJOJU, A.R. & HUMPHRYES, K.C. (1971) : Nature and location of Trypanosoma brucei subgroup exoantigen and its relationship to 4S antigen.
Exp. Parasit. 29 : 271 - 284.

AMBROISE-THOMAS, P. (1969) : Etude séro-immunologique de dix parasitoses par les techniques d'immunofluorescence.
Thèse D. Sc., Lyon, 644 pp.

AVISE, J.C. (1974) : Systematic value of electrophoretic data.
Syst. Zool. 23 : 465 - 481.

AVRAMEAS, S. (1969) : Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies.
Immunochemistry 6 : 43 - 52.

AVRAMEAS, S. & TERNYNCK, T. (1969) : The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents.
Immunochemistry 6 : 53 - 66.

AVRAMEAS, S. & URIEL, J. (1966) : Méthode de marquage d'antigène et d'anticorps avec les enzymes : son application en immunodiffusion.
C. R. Acad. Sc. (Paris) 262 : 2543 - 2545.

AXELSEN, N.H. (1971) : Human precipitins against a micro-organism (Candida albicans) demonstrated by means of quantitative immunoelectrophoresis.
Clin. Exp. Immunol. 9 : 749 - 752.

AXELSEN, N.H. & BOCK, E. (1972) : Identification and quantitation of antigens and antibodies by means of quantitative immunoelectrophoresis. A survey of methods.
J. Immunol. Methods 1 : 109 - 121.

AXEN, R., PORATH, J. & ERNBACK, S. (1967) : Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides.
Nature 214 : 1302 - 1304.

- BACKHAUSZ, R. (1967) : Immunodiffusion und immunoelektrophorese. Grundgalen, Methoden und Ergebnisse. Iena, Fischer Verlag, Chap. 9, pp. 312 - 331.
- BAGSTER, I.A. & PARR, C.W. (1973) : Trypanosome identification by electrophoresis of soluble enzymes. Nature 244 : 364 - 366.
- BAKER, J.R. (1963) : Speculations on the evolution of the family Trypanosomatidae Doflein, 1901. Exp. Parasit. 13 : 219 - 233.
- BAKER, J.R. (1965) : The evolution of parasitic Protozoa. in : Evolution of Parasites, Taylor A.E.R. éd., Oxford, Blackwell Sci. Publ., pp. 1 - 27.
- BAKER, J.R., GREEN, S.M., CHALONER, L.A. & GABORAK, M. (1972) : Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii of Pipistrellus pipistrellus (Chiroptera) : intra- and extracellular development in vitro. Parasit. 65 : 251 - 263.
- BALDO, B.A. & FLETCHER, T.C. (1973) : C-reactive protein-like precipitins in plaice. Nature 246 : 145 - 146.
- BERGENDI, L., KNIERIM, F. & APT, W. (1970) : Trypanosoma cruzi : immunological properties of a soluble extract of culture forms. Exp. Parasit. 28 : 258 - 262.
- BICE, D.E. & ZELEDON, R. (1971) : Immuno-electrophoretic comparison of Trypanosoma verpertilionis and Trypanosoma cruzi. Rev. Biol. Trop. 19 : 149 - 152.
- BIGALKE, R.D. (1966) : Observations on the antigens of some trypanosomes with special reference to common antigens. Onderstepoort J. vet. Res. 33 : 277 - 286.
- BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. & FRUIT, J. (1964) : Analyse immunoélectrophorétique d'extraits cellulaires et de milieux de culture d'Aspergillus fumigatus par des immunsérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'Aspergillome bronchopulmonaire. Ann. Inst. Pasteur 107 : 72 - 97.
- BIGUET, J., CAPRON, A., TRAN VAN KY, P. & ROSE, F. (1965a) : Présence de substances de type C dans les antigènes vermineux et de protéine anti-C au cours des helminthiases humaines ou expérimentales. I - Etude immunologique préliminaire et répercussions pratiques. Rev. Immunol. (Paris) 29 : 233 - 240.
- BIGUET, J., ROSE, F., CAPRON, A. & TRAN VAN KY, P. (1965b) : Contribution de l'analyse immunoélectrophorétique à la connaissance des antigènes vermineux. Incidences pratiques sur leur standardisation, leur purification et le diagnostic des helminthiases par immuno-électrophorèse. Rev. Immunol. (Paris) 29 : 5 - 30.

- BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. & DEGAEY, R. (1965c) : Etude immunoélectrophorétique de la nature et de l'ordre d'apparition des anticorps précipitants du sérum de lapin en fonction de leur mode d'immunisation contre Candida albicans. Sabouraudia 4 : 148 - 157.
- BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. & FRUIT, J. (1965 d) : Analyse immunoélectrophorétique des antigènes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses. Mycopath. Mycol. appl. 26 : 241 - 256.
- BJERRUM, O.J., INGILD, A., LOWENSTEIN, H. & WEEKE, B. (1973) : Carbamylated antibodies used for quantitation of human IgG. A routine method. Scand. J. Immunol. 2, supplt 1, pp. 145 - 148.
- BONE, G.J. & CHARLIER, J. (1975) : L'hémagglutination indirecte capillaire : une méthode de diagnostic de la trypanosomiase applicable sur le terrain. Ann. Soc. belge Méd. trop. 55 : 181 - 191.
- BOUT, D., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1974) : Purification d'un antigène spécifique de liquide hydatique. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 125 C : 775 - 788.
- BOUT, D., DUGIMONT, J.C., FARAG, H. & CAPRON, A. (1975) : Le diagnostic immunoenzymologique des affections parasitaires. II - Immunoenzymologie quantitative (E.L.I.S.A.). Lille Méd. 20 : 561 - 566.
- BOYDEN, A. (1964) : Perspectives in systematic serology. in : Taxonomic biochemistry and serology, C.A. Leone, éd., New York, Ronald Press, pp. 75 - 99.
- BRAY, R.S. (1969) : Studies on the immunology and serology of leishmaniasis : VI - Search for antigenic variation in single strains of Leishmania spp. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 63 : 378 - 382.
- BRAY, R.S. & LAINSON, R. (1966) : The immunology and serology of leishmaniasis. IV - Results of Ouchterlony double diffusion tests. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 60 : 605 - 609.
- BRENER, Z. (1973) : Biology of Trypanosoma cruzi. Annu. Rev. Microbiol. 27 : 347 - 382.
- BRETTON, R., TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. (1972) : Comparison of peroxidase and ferritin labelling of cell surface antigens. Exp. Cell Res. 71 : 145 - 155.
- BROOKER, B. & PRESTON, T.M. (1967) : The cytostome in trypanosomes and allied flagellates. J. Protozool. 14, supplt., 41.
- BROWN, K.N. & WILLIAMSON, J. (1962) : Antigens of Brucei trypanosomes. Nature 194 : 1253 - 1255.

- BROWN, K.N. & WILLIAMSON, J. (1964) : The chemical composition of trypanosomes. IV - Localisation of antigens in subcellular fractions of Trypanosoma rhodesiense.
Exp. Parasit. 15 : 69 - 86.
- BROWN, K.N., ARMSTRONG, J.A. & VALENTINE, R.C. (1965) : The ingestion of protein molecules by blood forms of Trypanosoma rhodesiense.
Exp. Cell Res. 39 : 129 - 135.
- CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. (1969) : Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 18 : 500 - 505.
- CAMPBELL, D.H. & WELIKY, N. (1967) : Immunoabsorbents : preparation and use of cellulose derivated.
in : Methods in immunology and immunochemistry, Williams & Chase eds, Academic Press, New York, Vol. I, 365 pp.
- CANTRELL, W. (1958) : Mutation rate and antigenic variation in Trypanosoma equiperdum.
J. inf. Dis. 103 : 263 - 271.
- CAPRON, A. (1970) : L'antigène parasitaire. Structure et fonction.
J. Parasit. 56 : 515 - 521.
- CAPRON, A. & AFCHAIN, D. (1970) : Structure antigénique et taxinomie des vertébrés inférieurs.
Bull. Muséum nat. Hist. nat., 2° série, 42 : 122 - 125.
- CAPRON, A., VERNES, A. & BIGUET, J. (1966) : Les précipitines sériques dans les bilharzioses humaines et expérimentales à Schistosoma mansoni, S. haematobium et S. japonicum.
Ann. Parasit (Paris) 41 : 123 - 187.
- CAPRON, A., BIGUET, J., VERNES, A. & AFCHAIN, D. (1968a) : Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite.
Path. Biol. 16 : 121 - 138.
- CAPRON, A., GENTILINI, M. & VERNES, A. (1968b) : Le diagnostic immunologique des filarioses. Possibilités nouvelles offertes par l'immuno-électrophorèse.
Path. Biol. 16 : 1039 - 1045.
- CAPRON, A., VERNES, A., TSUJI, M. & AFCHAIN, D. (1969) : Les paragonimoses humaines et expérimentales. Structure antigénique et relations hôte-parasite de trois espèces du genre Paragonimus.
Ann. Parasit. (Paris) 44 : 709 - 732.
- CAPRON, A., BRYGOO, E.R. & AFCHAIN, D. (1972a) : Apport de l'étude de la structure antigénique à la phylogénie des Helminthes.
Bull. Muséum nat. Hist. nat., 3° série, 69 : 877 - 885.
- CAPRON, A., VERNES, A., NIEL, G. & BOUVRY, M. (1972b) : Le diagnostic immunologique de l'amibiase. Evaluation à propos de 100 observations des techniques d'immunofluorescence indirecte et d'immunoélectrophorèse.
Méd. Chir. Digest. 1 : 5 - 13.

- CAPRON, A., WAITRE, P., CAPRON, M. & LEFEBVRE, M.N. (1972c) : Le diagnostic biologique moderne des parasitoses humaines.
Rev. Prat. 22 : 3661 - 3674.
- CAPRON, A., LE RAY, D., AFCHAIN, D., VAN MEIRVENNE, N. & JADIN, J.B. (1973) : Analyse antigénique des trypanosomes *Salivaria* et *Stercoraria*.
Progress in Protozoology, ed. de Puytorac et Grain, Clermont-Ferrand, p. 79.
- CHANG, S.L. & NEGHERBON, W.O. (1947) : Studies on hemoflagellates. III - The specificity of serological reactions of *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropica* and *Trypanosoma cruzi*.
J. infect. Dis. 81 : 209 - 227.
- CHAVES, J. (1970) : Immuno-diffusion reactions among various samples of *Leishmania*.
Acta Cient. Venezolana 21 : 68 - 70.
- CLARCK, T.B. & WALLACE, F.G. (1960) : A comparative study of kinetoplast ultrastructure in the Trypanosomatidae.
J. Protozool. 7 : 115 - 124.
- CLARKE, H.G. et FREEMAN, T. (1968) : Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins.
Clin. Sci. 35 : 403 - 413.
- CLARKSON, M.J. & AWAN, M.A.Q. (1969) : The immune response of sheep to *Trypanosoma vivax*.
Ann. trop. Med. Parasitol. 63 : 515 - 527.
- CLENTON, B.A., PALCZUK, N.C. & STAUBER, L.A. (1972) : *Leishmania donovani*, partial characterization of some flagellate cytoplasmic immunogens.
J. Immunol. 108 : 1580 - 1577.
- COONS, A.H. (1951) : Fluorescent antibodies as histochemical tools.
Federation Proceedings 2 : 558 - 559.
- CREEMERS, J. & JADIN, J.M. (1967) : Etude de l'ultrastructure et de la biologie de *Leishmania mexicana* Biagi, 1953. I - Les modifications qui surviennent lors de la transformation leishmania-leptomonas.
Bull. Soc. Path. exot. 60 : 53 - 58.
- CROOK, R.H., SCOTT, L.V. & PAINODE, R.A. (1969) : Characterization of antigens from *Leishmania mexicana* grown in dialysate culture.
J. Parasit. 55 : 977 - 981.
- CROSS, G.A.M. (1973) : Identification and purification of a class of soluble surface proteins from *Trypanosoma brucei*.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67 : 261.
- CUNNINGHAM, M.P. & VICKERMAN, K. (1962) : Antigenic analysis in the *Trypanosoma brucei* group, using the agglutination reaction.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 56 : 48 - 59.

- D'ALESSANDRO, P.A. (1972) : Trypanosoma lewisi : production of exoantigens during infection in the rat.
Exp. Parasit. 32 : 149 - 164.
- DAMIAN, R.T. (1964) : Molecular mimicry : antigen sharing by parasite and host and its consequences.
Amer. Natural. 98 : 129 - 149.
- DARMAN, M. (1941) : Multiplication du Trypanosoma cruzi dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues.
Ann. Parasit. (Paris) 18 : 166 - 179.
- DE SIQUEIRA, A.F., FERRIOLLI, F. & CARVALHEIRO, J.R. (1966) : Um antígeno solúvel presente no sêro de ratos infetados com Trypanosoma cruzi.
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 8 : 148.
- DESMET, G., MATTERN, P. & MASSEYEFF, R. (1969) : Libération in vivo d'antigènes solubles par une souche virulente de Trypanosoma gambiense.
Méd. Afr. noire 16 : 139 - 143.
- DESOWITZ, R.S. (1970) : African trypanosomes.
in : Immunity to parasitic animals, Jackson, Herman and Singer, Appleton - Century - Crafts, 2 : pp. 551 - 596.
- DE VAY, J.E., CHARUDATTAN, R. & WIMALAJEEVA, D.L.S. (1972) : Common antigenic determinants as a possible regulator of host-pathogen compatibility.
Amer. Natural. 106 : 185 - 194.
- DODIN, A. & FROMENTIN, H. (1962) : Mise en évidence d'un antigène vaccinant dans le plasma de souris expérimentalement infectées par Trypanosoma gambiense et par Trypanosoma congolense.
Bull. Soc. Path. exot. 55 : 128 - 138.
- DWYER, D.M. (1973) : Amastigote and promastigote stages of Leishmania donovani : an immunologic and immunochemical comparison.
Progress in Protozoology, fourth int. Congress on Protozoology, ed. P. de Puytorac et J. Grain, Clermont-Ferrand, p. 129.
- DWYER, D.M. (1974) : Lectin binding saccharides on a parasitic protozoan.
Science 184 : 471 - 473.
- DWYER, D.M., LANGRETH, S.G. & DWYER, N.K. (1974) : Evidence for a polysaccharide surface coat in the developmental stages of Leishmania donovani : a fine structure-cytochemical study.
Z. Parasitenk. 43 : 227 - 249.
- E.A.T.R.O. (1967) : East African Trypanosomiasis Research Organization, Report 1966, pp. 16 - 17.

EHRlich, P. (1909) : Über partialfunktionen der Zelle.
Münch. Med. Woch. 56 : 217 - 222.

ENOS, W.F. & ELTON, N.W. (1950) : Fatal acute Chagas'disease in a North American in the Canal Zone.
Am. J. trop. Med. 30 : 829 - 833.

ENINER, N. (1968) : Further studies on antigenic changes in Trypanosoma lewisi.
J. Protozool. 15 : 638 : 640.

ENINER, N. & GONZALEZ, C. (1966) : Changes in antigenicity of Trypanosoma lewisi during the course of infection in rats.
J. Protozool. 13 : 642 - 645.

FELSENfeld, O. & WOLF, R.H. (1973) : Interference between borreliae and trypanosomes. I - Antigenic analysis, fluorescent antibody and immobilisine studies of Borrelia turricatae and Trypanosoma cruzi.
Ann. Trop. Med. Parasit. 67 : 335 - 340.

FIFE, E.H. (1971) : Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases.
Exp. Parasit. 30 : 132 - 163.

FRANKE, E. (1905) : Über trypanosomentherapie.
Münch. Med. Woch. 52 : 2059 - 2060.

FRUIT, J., AFCHAIN, D., PETITPREZ, A., VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., BOUT, D. & CAPRON, A. (1976) : Trypanosoma brucei brucei : a variant specific antigenic component. II - Localisation on the surface coat with labelled specific antibodies.
Exp. Parasit., sous presse.

GALLIARD, H., LAPIERRE, J. & COSTE, M. (1962) : Contribution à l'étude d'une souche pathogène de Trypanosoma cruzi (souche Tulahuén, Chili). I - L'infection chez la souris. Evolution. Effets de la splénectomie, des traitements par la cortisone et l'hormone somatotrope.
Ann. Parasit. (Paris) 37 : 495 - 503.

GARCIA, B.S. (1965) : Antigenic components of Leishmania tropica.
J. Philippine med. Ass. 41 : 647 - 652.

GARCIA, W., OELERICH, S. & MUHLPFORDT, H. (1969) : Relaciones inmunológicas entre Trypanosoma cruzi y Trypanosoma lewisi.
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 11 : 67 - 70.

GHOSH, B.K. (1963) : Isolation and characterization of the membrane of Leishmania donovani.
Ann. Biochem. Exp. Med. 23 : 159 - 168.

GILL, B.S. (1965) : Properties of soluble antigen of Trypanosoma evansi.
J. gen. Microbiol. 38 : 357 - 361.

GOBLE, F. (1970) : South American trypanosomes.
in : Immunity to parasitic animals, Jackson, Herman and Singer, Appleton - Century - Crafts, 2 : pp. 597 - 689.

- GOLDSTEIN, I. (1972) : Réactions immunologiques croisées hôte - parasite. Cas particulier du streptocoque du groupe A. Rev. Immunol. (Paris) 36 : 203 - 266.
- GONZALEZ-CAPPA, S.M. & KAGAN, I.G. (1969) : Agar gel and immunoelectrophoretic analysis of several strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit. 25 : 50 - 57.
- GONZALEZ-CAPPA, S.M. & KAGAN, I.G. (1973) : Antigenicity of fractions of a somatic antigen of Trypanosoma cruzi. J. Parasit. 59 : 1080 - 1084.
- GRABAR, P. & BURTIN, P. (1964) : Immuno-electrophoretic analysis. Applications to human biological fluids. Amsterdam, Elsevier, 302 pp.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. (1953) : Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochem. Biophys. Acta 10 : 193 - 194.
- GRABAR, P. & WILLIAMS, C.A. (1955) : Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochem. Biophys. Acta 17 : 67 - 74.
- GRASSE, P.P. (1952) : Ordre des Trypanosomidés. in : Traité de Zoologie, P.P. GRASSE éd., Paris, Masson, tome I, premier fascicule, pp. 602 - 668.
- GRAY, A.R. (1961) : Soluble antigens of Trypanosoma vivax and of other trypanosomes. Immunology 4 : 253 - 261.
- GRAY, A.R. (1962) : The influence of antibody on serological variation in Trypanosoma brucei. Ann. trop. Med. Parasit. 56 : 4 - 13.
- GRAY, A.R. (1965a) : Antigenic variation in clones of Trypanosoma brucei. I - Immunological relationships of the clones. Ann. trop. Med. Parasit. 59 : 27 - 36.
- GRAY, A.R. (1965b) : Antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei transmitted by Glossina morsitans and G. palpalis. J. gen. Microbiol. 41 : 195 - 214.
- GRAY, A.R. (1965c) : Notes on immunology. O.M.S. Document PD/68.12.
- GRAY, A.R. (1969) : The epidemiological significance of some recent findings from research on antigenic variation in trypanosomes. Bull. O.M.S. 41 : 805 - 813.
- GRAY, A.R. (1970) : Antigenic variation. in : The african Trypanosomiasis, H.W. MULLIGAN, ed., London, Allen and Unwin, pp. 113 - 116.

- GRAY, A.R. (1972) : Variable agglutinogenic antigens of Trypanosoma gambiense and their distribution among isolates of the trypanosome collected in different places in Nigeria.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 66 : 263 - 284.
- GRAY, A.R. (1975) : A pattern in the development of agglutinogenic antigens of cyclically transmitted isolated of Trypanosoma gambiense.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 69 : 131 - 138.
- GREVAL, S.D.S., SEN GUPTA, P.C. & NAPIER, L.E. (1939) : Serological reactions in kala-azar complement fixation, false Wasserman reaction and high anticomplementary titre.
Ind. J. med. Res. 27 : 181 - 190.
- HANKS, J.H. & WALLACE, R.E. (1949) : Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71 : 196 - 200.
- HAWKES, J.S. (1968) : Chemotaxonomy and serotaxonomy.
New York, Acad. Press, 299 pp.
- HAWKING, F., RAMSDEN, D.B. & WHYTECK, S. (1973) : The trypanocidal action of human serum and of baboon plasma.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 67 : 501 - 516.
- HERBIG-SANDREUTER, A. (1957) : Further studies on Trypanosoma rangeli 1920.
Acta trop. 14 : 193 - 207.
- HEYNEMAN, D. (1971) : Immunology of leishmaniasis.
Bull. O.M.S. 44 : 499 - 514.
- HOARE, C.A. (1966) : The classification of mammalian trypanosomes.
Ergebn. Mikrobiol. 39 : 43 - 57.
- HOARE, C.A. (1967) : Evolutionary trends in mammalian trypanosomes.
Adv. Parasit. 5 : 47 - 91.
- HOARE, C.A. (1970) : Systematic description of the mammalian trypanosomes of Africa.
in : H.W. Mulligan, The African trypanosomiasis, London, Allen and Unwin, 50 - 51.
- HOARE, C.A. (1972) : The Trypanosomes of Mammals.
Oxford, Blackwell Sc. Publ., 749 pp.
- HOARE, C.A. & WALLACE, F.G. (1966) : Developmental stages of trypanosomatid flagellates : a new terminology.
Nature 212 : 1385 - 1386.
- HOUBA, V. & ALLISON, A.C. (1966) : M-antiglobulins (rheumatoid-factor like globulins) and other gamma-globulins in relation to tropical parasitic infections.
Lancet 1 : 848 - 852.

- HOUBA, V., BROWN, K.N. & ALLISON, A.C. (1969) : Heterophile antibodies, M-antiglobulins and immunoglobulins in experimental trypanosomiasis. *Clin. exp. Immunol.* 4 : 113 - 123.
- HUMPHRIES, K.C. (1970) : Isoelectric focusing of Trypanosoma brucei subgroup antigens in polyacrylamide gel thin layers. A method for resolving and characterising protein-carbohydrate complexes of an enzymic and immunological nature. *J. Chromatog.* 49 : 503 - 510.
- INOKI, S., OSAKI, H. & NAKABAYASHI, T. (1956) : Studies on the immunological variation in Trypanosoma gambiense. *Med. J. Osaka Univ.* 7 : 165 - 173.
- JADIN, J.M. (1971) : Cytologie et cytophysiologie des Trypanosomidae. *Acta zool. path. antverpiensia* 53 : 1 - 168.
- JADIN, J.B. & LE RAY, D. (1969) : Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 49 : 331 - 340.
- JADIN, J.B. & PIERREUX, G. (1960) : Un milieu de culture pour Trypanosomides. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 40 : 903 - 906.
- JOHNSON, P. & NEAL, R.A. & GALL, D. (1963) : Protective effect of killed trypanosome vaccines with incorporated adjuvants. *Nature* 200 : 83.
- KANEDA, Y. (1973) : Protection effects of disintegrated culture form of Trypanosoma cruzi on the mortality of mice after challenge. *Jap. J. Parasit.* 22 : 146 - 153.
- KETTERIDGE, D. (1970) : The presence of host-serum components on the surface of rodent-adapted Trypanosoma vivax. *J. Protozool.* 17, suppl.: 24.
- KETTERIDGE, D. (1971) : Host antigens adsorbed by rodent-adapted T. vivax. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 65 : 260.
- KETTERIDGE, D. (1972) : Trypanosoma vivax : surface interrelationships between host and parasite. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 66 : 324.
- KILGOUR, V. & GODFREY, D.G. (1973) : Species-characteristic isoenzymes of two aminotransferases in trypanosomes. *Nature new Biol.* 244 : 69 - 70.
- KLOETZEL, J., CAMARGO, M.B. & GIOVANNINI, V.L. (1975) : Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *J. Protozool.* 22 : 259 - 261.
- KORACH, S. & BENEX, J. (1966) : A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. I - Isolation, physical and chemical data. *Exp. Parasit.* 19 : 193 - 199.

- KROLL, J. (1969) : Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immunoelectrophoresis patterns. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 24 : 55 - 60.
- LAINSON, R. & SHAW, J.J. (1971) : Taxonomy of the New World Leishmania species. *in* : Fallis, A.M., ed. Ecology and physiology of parasites : a symposium held at University of Toronto. University of Toronto Press, Toronto. p. 21.
- LANGRETH, S.G. & BALBER, A.E. (1975) : Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of Trypanosoma brucei. *J. Protozool.* 22 : 40 - 53.
- LANHAM, S.M. (1968) : Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature* 218 : 1273 - 1274.
- LANHAM, S.M. & GODFREY, D.G. (1970) : Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasit.* 28 : 521 - 534.
- LANHAM, S.M. & TAYLOR, A.E.R. (1972) : Some properties of the immunogens (protective antigens) of a single variant of Trypanosoma brucei brucei. *J. gen. Microbiol.* 72 : 101 - 116.
- LAURELL, C.B. (1965) : Antigen - antibody crossed electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 10 : 358 - 361.
- LAURELL, C.B. (1966) : Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.* 15 : 45 - 52.
- LE PAGE, R.W.F. (1968) : Further studies on the variable antigens of Trypanosoma brucei. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 62 : 131.
- LE RAY, D. (1969) : Analyse immunoélectrophorétique des formes de culture de Trypanosoma brucei. *C. R. Soc. Biol.* 163 : 2783 - 2787.
- LE RAY, D. (1972) : Parentés immunostructurelles de Trypanosoma (Trypanozoon) brucei et de Trypanosoma (Nannomonas) congolense. *J. Protozool.* 19, suppl., 72.
- LE RAY, D. (1975) : Structures antigéniques de Trypanosoma brucei (Protozoa, Kinetoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 55 : 129 - 311.
- LE RAY, D., AFCHAIN, D., JADIN, J.B., CAPRON, A. & FAMEREE, L. (1971) : Interrelations immuno-taxonomiques de T. brucei, T. rhodesiense et T. gambiense. *Ann. Parasit. (Paris)* 46 : 523 - 532.
- LE RAY, D., VAN MEIRVENNE, N. & JADIN, J.B. (1973a) : Immuno-electrophoretic characterization of common and variable antigens of Trypanosoma brucei. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 67 : 273 - 274.

- LE RAY, D., AFCHAIN, D., JADIN, J.B., CAPRON, A., YASAROL, S., LANOTTE, G. & FAMEREE, L. (1973b) : Diagnostic immunoélectrophorétique de la leishmaniose viscérale à l'aide d'un extrait antigénique hydrosoluble de Leishmania donovani. Résultats préliminaires. Ann. Soc. belge Méd. trop. 53 : 31 - 41.
- LE RAY, D., AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1976a) : Contribution de la connaissance des antigènes de Leishmania à l'immunologie des Trypanosomatidae. Ann. Parasit. (Paris), sous presse.
- LE RAY, D., AFCHAIN, D. & JADIN, J.B. (1976b) : Etude immunoélectrophorétique comparative du genre Leishmania. Ann. Parasit. (Paris), sous presse.
- LEVADITI, C. & MUTERMILCH, S. (1909) : Le mécanisme de la création des variétés de trypanosomes résistant aux anticorps. C.R. Soc. Biol. 67 : 49 - 51.
- LONGBOTTOM, J.L. & PEPYS, J. (1964) : Pulmonary Aspergillosis. Diagnostic and immunological significance of antigens and C substance in Aspergillus fumigatus. J. Path. Bacteriol. 88 : 141 - 147.
- LOURIE, E.M. & O'CONNOR, R.J. (1937) : A study of Trypanosoma rhodesiense relapse strains in vitro. Ann. trop. Med. Parasit. 31 : 319 - 340.
- LUMSDEN, W.H.R. (1970) : Biological aspects of trypanosomiasis research, 1965 ; a retrospect, 1969. Adv. Parasit. 8 : 227 - 249.
- LUMSDEN, W.H.R. (1974) : Leishmaniasis and Trypanosomiasis : the causative organism compared and contrasted. in : Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease, Ciba Foundation Symposium 20, Amsterdam, Elsevier, pp. 3 - 27.
- LUMSDEN, W.H.R., HERBERT, W.J. & MAC NEILLAGE, G.J.C. (1967) : Nomenclature of antigenic types of trypanosomes. Vet. Rec. 81 : 237 - 238.
- LUMSDEN, W.H.R., HERBERT, W.J. & MAC NEILLAGE, G.J.C. (1973) : Techniques with Trypanosomes. Edinburgh, Churchill Livingstone, 183 pp.
- MAC NEILLAGE, G.J.C. & HERBERT, W.J. (1968) : Infectivity and virulence of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei to mice. II - Comparison of closely related trypanosome antigenic types. J. comp. Path. 78 : 345 - 349.
- MAC NEILLAGE, G.J.C., HERBERT, W.J. & LUMSDEN, W.H.R. (1969) : Antigenic type of first relapse variants arising from a strain of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. Exp. Parasit. 25 : 1 - 7.

- MILLER, J.K. (1965) : Variation of the soluble antigens of Trypanosoma brucei.
Immunol. 9 : 521 - 528.
- MUNIZ, J. (1967) : Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogênica do S. cruzi no organismo humano.
Hospital (Rio de Janeiro) 72 : 676 - 700.
- NAIRN, R.C. (1969) : Fluorescent protein tracing.
Livingstone, Edinburgh and London, 3^{ème} ed.
- NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. (1967) : Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens.
J. Cell Biol. 33 : 307 - 318.
- NEAL, R.A. & MILES, R.A. (1970) : Indirect haemagglutination test for Chagas's disease, with a simple method for survey work.
Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 12 : 325 - 332.
- NEAL, R.A., GARNHAM, P.C.C. & COHEN, S. (1969) : Immunization against protozoal diseases.
Brit. med. Bull. 25 : 194 - 201.
- NEWION, B.A. & BURNETT, J.K. (1972) : DNA of Kinetoplastidae : a comparative study.
in : Comparative biochemistry of parasites, H. van den Bossche ed., New York, Academic Press, pp. 185 - 198.
- NJOGU, A.R. & HUMPHRYES, K.C. (1972) : The nature of the 4S antigens of the brucei subgroup trypanosomes.
Exp. Parasit. 31 : 178 - 187.
- NJOGU, A.R., ITAZI, O.K., ENYARU, J.C. & ABONGA, L. (1974) : Direct evidence that the 4S (surface) antigens are located on the outer surface of the Trypanosoma brucei subgroup cell membrane.
Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 68 : 147 - 148.
- NOWOTNY, A. (1969) : Fractionation of serum proteins by ammonium sulfate.
in : Basic exercises in immunochemistry. A laboratory manual, A. Nowotny éd., Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, p. 3 - 5.
- NUSSENZWEIG, V. (1957) : Reação de fixação do complemento para leishmaniose visceral com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Técnica, sensibilidade e especificidade.
Hospital (Rio de Janeiro) 51 : 217 - 226.
- NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F.C. (1966) : Further studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi.
Exp. Parasit. 18 : 224 - 230.
- NUSSENZWEIG, V., DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. (1963) : Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi.
Exp. Parasit. 14 : 221 - 232.

- OELERICH, S. (1969) : Analyse und Präparation von Antigenen aus Trypanosoma lewisi.
Z. Tropenmed. Parasit. 20 : 397 - 419.
- OELERICH, S. (1973) : Antigenanalysen und Kreuzreaktionen zwischen Leishmanien, Trypanosoma cruzi und Mycobacterium smegmatis.
Z. Tropenmed. Parasit. 24 : 296 - 304.
- OELERICH, S. & MANNWEILER, E. (1970) : Präparative Isolierung von Partialantigenen aus Trypanosoma rhodesiense und Trypanosoma gambiense.
Z. Tropenmed. Parasit. 21 : 20 - 25.
- OELERICH, S. & MANNWEILER, E. (1972) : Isolierung von stamm- und gruppenspezifischen Partialantigenen aus Trypanosomen der Bruceigruppe.
Z. Immun. - Forsch. 143 : 304 - 317.
- OELERICH, S., BUTNER, D.W. & MANNWEILER, E. (1974) : Kreuzreaktionen in der Immundiagnostik der Chagaskrankheit und der Kala Azar unter Einbeziehung von Seren Tuberkulöser und Lepröser.
Zbl. Bakt. Hyg. 226 : 283 - 290.
- O.M.S. (1969) : Etudes comparatives sur les trypanosomiasés américaine et africaine.
Sér. Rapp. techn. N°411, 42 pp.
- OUCHTERLONY, O. (1958) : Diffusion in gel methods for immunological analysis.
Progr. Allergy 5 : 1 - 78.
- UDIN, J. (1952) : Specific precipitation in gels and its application to immunochemical analysis.
Meth. med. Res. 5 : 335 - 378.
- OSTMANN, H., OELERICH, S. & LEDERER, I. (1973) : Immunologische Untersuchungen mit Trypanosoma cruzi dem Erreger des Chagaskrankheit.
Z. Tropenmed. Parasit. 24 : 72 - 80.
- RANQUE, J., QUILICI, M., DUNAN, S. & ASSADOURIAN, Y. (1969a) : Réactions d'immunoprécipitation en gélose dans les leishmanioses.
Méd. trop. 29 : 70 - 75.
- RANQUE, J., QUILICI, M., DUNAN, S. & ASSADOURIAN, Y. (1969b) : Etude de la structure antigénique de Crithidia (Strigomonas) fasciculata par les méthodes de précipitation en gélose.
Protistologica 5 : 97 - 100.
- RANQUE, P. (1973) : Etudes morphologiques et biologiques de quelques Trypanosomidés récoltés au Sénégal.
Thèse D. Sc., Aix-Marseille II, 378 pp.
- RANQUE, P., QUILICI, M. & BERANGIER, C. (1970) : Préparation massive d'antigènes de Trypanosomidés.
C. R. Soc. Biol. 164 : 2599 - 2601.

- RANQUE, P., MICHELIER, A.C. & QUILICI, M. (1972) : Fractions antigéniques communes, décelées par immunoprécipitation en gélose, entre Mycobacterium phlei (Mycobacteriaceae) et Leishmania donovani (Trypanosomidae).
C.R. Soc. Biol. 166 : 1345 - 1347.
- REBEYROTTE, P., LABBE, J.P. & KOUTSOUKOS, A. (1970) : Modifications techniques de la méthode d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Application à quelques liquides biologiques.
Ann. Biol. Clin. 28 : 153 - 158.
- RESSLER, N. (1960) : Two-dimensional electrophoresis of protein antigens with an antibody containing buffer.
Clin. Chim. Acta 5 : 795 - 800.
- ROBSON, J., RICKMAN, L.R., ALLSOPP, R. & SCOTT, D. (1972) : The composition of the Trypanosoma brucei subgroup in non human reservoirs in the Lambwe Valley, Kenya, with particular reference to the distribution of T. rhodesiense.
Bull. O.M.S. 46 : 765 - 770.
- RUDZINSKA, M.A. & VICKERMAN, K. (1968) : the fine structure.
in : Infectious blood diseases of man and animals, D. Weinman and M. Ristic eds, New York, Academic Press, vol. I, pp. 287.
- RUDZINSKA, M.A., D'ALESSANDRO, P.A. & TRAGER, W. (1964) : The fine structure of Leishmania donovani and the role of the kinetoplast in the leishmania-leptomonad transformation.
J. Protozool. 11 : 166 - 191.
- SAF'JANOVA, V.M. & AVAKJAN, A.A. (1973) : Use of ferritin-labelled antibodies for differentiating Leishmania species and other Trypanosomatidae.
Bull. O.M.S. 48 : 289 - 297.
- SAWADA, T., TAKEI, K., KATAMINE, D. & YOSHIMURA, T. (1965) : Immunological studies on filariasis. III - Isolation and purification of antigen for intradermal skin test.
Japan J. Exptl. Med. 35 : 125 - 132.
- SCHEIDEGGER, J.J. (1955) : Une microméthode d'immunoélectrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7 : 103 - 110.
- SCHNEIDER, C.R. & HERTIG, M. (1966) : Immunodiffusion reactions of Panamanian Leishmania.
Exp. Parasit. 18 : 25 - 34.
- SCHNUR, L.F., ZUCKERMAN, A. & GREENBLATT, C.L. (1972) : Leishmanial serotypes as distinguished by the gel diffusion of factors excreted in vitro and in vivo.
Israël J. med. Sci. 8 : 932 - 942.
- SCHNUR, L.F., ZUCKERMAN, A. & GREENBLATT, C.L. (1973) : The relationship between the clinical types and serotypes of Leishmania.
J. Protozool. 20 : 534.

- SEAH, S. & MARSDEN, P.D. (1970) : Complement fixation test in Trypanosoma rhodesiense infection with cultured Trypanosoma cruzi as antigen. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 64 : 279 - 283.
- SEED, J.R. (1963) : The characterization of antigens isolated from Trypanosoma rhodesiense. J. Protozool. 10 : 380 - 389.
- SEED, J.R. (1964) : Antigenic similarity among culture forms of the brucei group of trypanosomes. Parasit. 54 : 593 - 596.
- SEED, J.R. (1972) : Trypanosoma gambiense and T. equiperdum : characterization of variant specific antigens. Exp. Parasit. 31 : 98 - 108.
- SEED, J.R. & GAM, A.A. (1966) : Passive immunity to experimental trypanosomiasis. J. Parasit. 52 : 1134 - 1140.
- SEED, J.R., CORNILLE, R.L., RISBY, E.L. & GAM, A.A. (1969) : The presence of agglutinating antibody in the IgM immunoglobulin fraction of rabbit antiserum during experimental African trypanosomiasis. Parasit. 59 : 283 - 292.
- SEGURA, E.L., CURA, E.N., PAULONE, I., VASQUEZ, C. & CERISOLA, J.A. (1974) : Antigenic makeup of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. J. Protozool. 21 : 571 - 574.
- SENECA, H., PEER, P. & HAMPAR, B. (1966) : Active immunization of mice with Chagastoxin. Nature 209 : 309 - 310.
- SEN GUPTA, P.C. (1969) : Immunodiagnosis of Kala-azar. Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 63 : 146.
- SIMPSON, L. (1968) : The Leishmania-Leptomonad transformation of Leishmania donovani : nutritional requirements, respiration changes and antigenic changes. J. Protozool. 15 : 201 - 207.
- SIMPSON, L. (1972) : The kinetoplast of the hemoflagellates. Int. Rev. Cytol. 32 : 139 - 207.
- SMITHERS, S.R. & TERRY, R.J. (1969) : The immunology of schistosomiasis. Adv. Parasit. 7 : 41 - 93.
- SOLTYS, M.A. (1973) : A review of studies on the immunization against protozoan diseases of animals. Z. tropenmed. Parasitol. 24 : 309 - 322.

SOLTYS, M.A. & TIZARD, I.R. (1972) : Reduction in the ability of Trypanosoma brucei to react with antibodies after long exposure to immune mechanisms in vivo.

J. Med. Microbiol. 5 : 131 - 136.

SOUZA, M.C.M. de & BARBOSA, W. (1972) : Immunological relationship between "Leptomonas" pessoai (strain principis), C. fasciculata, L. brasiliensis and T. cruzi by the agar gel diffusion technique. Previous note.

Rev. Pat. Trop. 1 : 415 - 419.

SOUZA, M.C.M. de & ROITMAN, I. (1972) : Protective effect of Leptomonas pessoai against the infection of mice by Trypanosoma cruzi.

Rev. Microb. 2 : 4 - 7.

SPLITTER, E.J., SOULSBY, E.J.L., WILLIAMS, J.F. & JESKA, E.J. (1967) : Gel diffusion and hemagglutination studies with Trypanosoma theileri.

Exp. Parasit. 20 : 160 - 166.

STEINERT, M. (1960) : Mitochondria associated with the kinetoplast of Trypanosoma mega.

J. bioph. biochem. Cytol. 8 : 542 - 546.

STEINERT, M. & NOVIKOFF, A.B. (1960) : The existence of a cytostome and the occurrence of pinocytosis in the trypanosome Trypanosoma mega.

J. bioph. biochem. Cytol. 8 : 563 - 569.

STEINERT, M., VAN ASSEL, S., BORST, P., MOL, J.N.M., KLEISEN, C.M. & NEWTON, B.A. (1973) : Specific detection of kinetoplast DNA in cytological preparations of trypanosomes by hybridization with complementary DNA. Exp. Cell Res. 76 : 175 - 185.

SVENDSEN, P.J. & AXELSEN, N.H. (1972) : A modified antigen-antibody crossed electrophoresis characterizing the specificity and titre of human precipitins against Candida albicans.

J. Immunol. Methods 1 : 169 - 176.

TAILLIEZ, R. (1970) : Isolement et étude d'un antigène spécifique de la grande douve du foie (Fasciola hepatica L.).

Biol. méd. 59 : 183 - 287.

TAKAYANAGI, T., KAMBARA, H., INOKI, S. & YOSHIKAWA, K. (1970) : (Immunological studies on trypanosomes, with special reference to the specificities of the antigens).

Jap. J. Parasit. 19 : 260 - 264 (en Japonais).

TAKAYANAGI, T., KAMBARA, H. & ENRIQUEZ, G.L. (1973a) : Studies on the agglutination antigen of Trypanosoma gambiense.

Southeast asian J. trop. Med. pub. Hlth 4 : 27 - 31.

TAKAYANAGI, T., ENRIQUEZ, G.L., KAMBARA, H. & OHNO, Y. (1973b) : An immuno-electron microscopy of the soluble antigen of Trypanosoma gambiense.

Southeast asian J. trop. Med. pub. Hlth 4 : 165 - 166.

- TARRANT, C.J., FIFE, E.H. & ANDERSON, R.I. (1965) : Serological characteristics and general chemical nature of the in vitro exoantigens of T. cruzi.
J. Parasit. 51 : 277 - 285.
- TAYLOR, A.E.R. & BAKER, J.R. (1968) : The cultivation of parasites in vitro.
Oxford, Blackwell Sci. Publ., 377 pp.
- THILLET, C.J. & CHANDLER, A.C. (1957) : Immunization against Trypanosoma lewisi in rats by injections of metabolic products.
Science 125 : 346 - 347.
- TILLET, W.S. & FRANCIS, T. (1930) : Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of Pneumococcus.
J. exp. Med. 52 : 561 - 571.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. & ROSS, T.G. (1971) : A method for producing specific antisera with small doses of immunogen.
J. Clin. Endocr. Metabol. 33 : 988 - 991.
- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E. & MOORS, A. (1973a) : Column separation and membrane filtration : a routine method for the detection of African trypanosomes in human blood.
Ann. Soc. belge Méd. trop. 53 : 109 - 112.
- VAN MEIRVENNE, N., LE RAY, D., JANSSENS, P.G. & MAGNUS, E. (1973b) : Immunogenic properties of common and variable antigens of T. brucei.
Trans. R. Soc. trop. Méd. Hyg. 67 : 274 - 275.
- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G. & MAGNUS, E. (1975a) : Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. I - Rationalization of the experimental approach.
Ann. Soc. belge Méd. trop. 55 : 1 - 23.
- VAN MEIRVENNE, N., JANSSENS, P.G., MAGNUS, E., LUMSDEN, W.H.R. & HERBERT, W.J. (1975b) : Antigenic variation in syringe passaged populations of Trypanosoma (Trypanozoon) brucei. II - Comparative studies on two antigenic-type collections.
Ann. Soc. belge Méd. trop. 55 : 25 - 30.
- VATTUONE, N.H. & YANOVSKY, J.F. (1971) : Trypanosoma cruzi : agglutination activity of enzyme treated epimastigotes.
Exp. Parasit. 30 : 349 - 355.
- VICKERMAN, K. (1969) : On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes.
J. Cell Sci. 5 : 163 - 194.
- VICKERMAN, K. (1972) : The host-parasite interface of parasitic protozoa. Some problems posed by ultrastructural studies.
Symposia brit. Soc. Parasit. 10 : 71 - 91.

VICKERMAN, K. & LUCKINS, A.G. (1969) : Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using ferritin conjugated antibody.

Nature 224 : 1125 - 1126.

VITETTA, E.S. & GUTTMAN, H.N. (1967) : Immunological relationship among the lower Trypanosomatidae.

J. gen. Microbiol. 48 : 45 - 52.

WALKER, P.J. (1970) : Techniques for the manipulation and maintenance of trypanosomes strains in the laboratory.

in : The African Trypanosomiasis, H.W. Mulligan ed., London, Allen and Unwin, pp. 89 - 96.

WALLACE, F.G. (1966) : The trypanosomatid parasites of insects and arachnids.

Exp. Parasit. 18 : 124 - 193.

WANE, A. (1972) : Recherches sur les antigènes solubles de Trypanosoma gambiense. Application au diagnostic immunologique de la maladie du sommeil.

Thèse Pharmacie, Dakar, 162 pp.

WATKINS, J.F. (1964) : Observations on antigenic variation in a strain of Trypanosoma brucei growing in mice.

J. Hyg. Cambridge 62 : 69 - 80.

WELLER, T.H. & COONS, A.H. (1954) : Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 86 : 789 - 794.

WEITZ, B. (1960) : The properties of some antigens of Trypanosoma brucei.

J. gen. Microbiol. 23 : 589 - 600.

WEITZ, B.G.F. (1970) : The antigens of trypanosomes.

In : The African Trypanosomiasis, H.W. Mulligan, ed., London, Allen and Unwin, pp. 109 - 113.

WILLAERT, E. (1975) : Etude immuno-taxonomique des genres Naejleria et Acanthamoeba (Protozoa : Amoebida).

Thèse Doctorat Université, Faculté des Sciences, Lille, 246 p.

WILLIAMS, C.A. & CHASE, M.W. (1971) : Methods in immunology and immunology-chemistry.

New York, Acad. Press, vol. III, 515 pp.

WILLIAMSON, J. & BROWN, K.N. (1964) : The chemical composition of trypanosomes. III - Antigenic constituents of Brucei trypanosomes.

Exp. Parasit. 15 : 44 - 68.

WILSON, A.J. & CUNNINGHAM, M.P. (1972) : Immunological aspects of bovine trypanosomiasis. I - Immune response of cattle to infection with Trypanosoma congolense and the antigenic variation of the infecting organisms.

Exp. Parasit. 32 : 165 - 173.

WOO, P.T.K. (1970) : Origin of mammalian trypanosomes which develop in the anterior-station of blood-sucking arthropods.
Nature 228 : 1059 - 1062.

WOO, P.T.K. (1974) : A review of studies on the immunization against pathogenic protozoan diseases of man.
Acta trop. 31 : 1 - 27.

YARZABAL, L., NAQUIRA, F. & LEPRESLE, T. (1976) : Analisis de extractos solubles de Paracoccidioides brasiliensis por medio de la inmunoelectroforesis bidimensional.

Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, sous presse.

YASUDA, S. & DUSANIC, D.G. (1969) : Comparative immunological studies on somatic antigens and secretion-excretion products of bloodstream and culture forms of Trypanosoma lewisi. I - Protective immunity and the agglutinin response.

J. infect. Dis. 119 : 562 - 568.

ZUCKERMAN, A., SCHNUR, L.F., GREENBLATT, C.L. & MONTIGLIO, B. (1973) : Excreted factors (E.F.) in the serotyping of leishmanial strains.
Progress in Protozoology, fourth int. Congress in Protozoology, ed. P. de Puytorac et J. Grain, Clermont-Ferrand, p. 455.

ADDENDUM

Depuis la rédaction de ce travail, il est important de signaler la parution d'une excellente revue générale sur l'immunologie des Leishmania publiée par ZUCKERMAN, A. ("Parasitological review. Current status of the immunology of blood and tissue Protozoa. I. Leishmania. Exp. Parasit., 1975, 38, 370-400").

A propos de la trypanosomiase américaine à T. cruzi, un travail de ALVES, M.J.M. et COLLI, W. ("Glycoproteins from Trypanosoma cruzi : partial purification by gel chromatography. FEBS Letters, 52, 188-190") a permis la purification partielle de trois glycoprotéines par chromatographie sur gel (Bio-Gel P. 150) en présence de 0,1 % de Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS). Pour ces auteurs, l'observation d'une agglutination des formes épimastigotes de culture, en présence de concanavoline A, est un argument en faveur de l'éventuelle localisation d'une ou de plusieurs glycoprotéines à la surface membranaire des formes de culture.

Or les constituants membranaires semblent jouer un rôle important dans l'immunogénicité des formes de culture. En effet, nous avons montré que le composant spécifique n° 5 se localise à la surface des formes épimastigotes et SEGURA et al. ont démontré l'importance de la fraction membranaire et flagellaire dans la protection expérimentale de la souris (SEGURA, E.L., PAULONE, I., CERISOLA, J. et CONZALEZ-CAPPA, S.M. : Experimental Chagas' disease : protective activity in relation with subcellular fractions of the parasite. J. Parasitol., 1976, 62, 131-133). Aussi ces récentes expérimentations nous inciteront à envisager dans l'avenir l'éventuelle nature glycoprotéinique du composant 5 de T. cruzi et sa comparaison avec des antigènes partiellement purifiés par d'autres auteurs.

Enfin à propos du composant variable de T. b. brucei, un travail récent de CROSS a permis de confirmer sa localisation sur le manteau cellulaire des formes trypomastigotes sanguicoles (CROSS, G.A.M.: Identification, purification and properties of clone-specific glycoprotein antigens constituting the surface coat of Trypanosoma brucei. Parasit., 1975, 71, 393-417).

Cet auteur a obtenu à l'état pur le composant variable par des techniques biochimiques classiques (chromatographie sur Séphadex G 25, DEAE-Cellulose puis isoélectrofocalisation) et a montré sa nature glycoprotéinique. Il s'agirait d'une simple chaîne polypeptidique ayant apparemment un poids moléculaire de 65 000 et contenant environ 600 amino-acides et 20 résidus monosaccharidiques. Ces derniers résultats sont en contradiction avec l'ensemble des travaux biochimiques précédents et avec nos déductions prudentes sur l'hétérogénéité immunochimique du composant variable. Pour CROSS, l'hétérogénéité, décrite précédemment, pourrait provenir d'une dénaturation protéolytique lors de la préparation des extraits antigéniques. Néanmoins l'auteur reste prudent et souligne la nécessité d'une confirmation au sujet de l'homogénéité biochimique du composant variable.

De ce travail strictement biochimique, comparé à notre purification uniquement immunochimique, il ressort qu'il sera indispensable dans l'avenir d'associer des critères biochimiques tels l'électrophorèse en gel de polyacrylamide ou l'isoélectrofocalisation à des contrôles immunochimiques par immunisation expérimentale à l'aide de l'extrait purifié.