

50376  
1981  
104

N° d'ordre : 921

50376  
1981  
104

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

---

**THÈSE**

présentée à l'Université de Lille I

pour obtenir le titre de Docteur de 3<sup>e</sup> CYCLE

EN BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALE

par

Ana Maria RODRIGUEZ de ROJAS

*CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNE A  
TRYPANOSOMA CRUZI CHEZ LE RAT FISCHER*



Présentée le 13 Octobre 1981, devant la Commission d'Examen

JURY : Président : M. E. VIVIER  
Rapporteur : M. A. CAPRON  
Examineurs , M. A. DHAINAUT  
M. H. BAZIN

Ce travail a été réalisé grâce à l'équipe de Chercheurs du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction éclairée et constante de Monsieur le Professeur André CAPRON.

Monsieur le Professeur A. CAPRON,  
Monsieur D. AFCHAIN, Docteur Es-Sciences,

Permettez-moi de vous exprimer ici mes sentiments de gratitude et mon profond respect.

A tout le Personnel du Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,

Qu'ils soient vivement remerciés et acceptent ma très sincère reconnaissance.

## TABLE DES MATIERES

-----

	Page
INTRODUCTION.....	1
<u>CHAPITRE I</u> : RELATIONS HOTE-PARASITE.....	4
1.1. Immunité naturelle à <u>T. cruzi</u> .....	4
1.1.1. Facteurs liés à l'hôte.....	4
- Espèce.....	4
- Lignée de l'hôte.....	7
- Sexe.....	8
- Age.....	8
1.1.2. Facteurs liés au parasite.....	9
- Souche.....	9
- Entretien <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u> .....	17
- Quantité de parasites inoculés.....	18
1.2. Modèles expérimentaux chez l'animal.....	19
- Cobaye.....	19
- Chinchilla.....	20
- Singe.....	20
- Lapin.....	21
- Chien.....	21
- Souris.....	22
- Rat.....	22

	Page
1.3. Réponse immune.....	24
1.3.1. Immunité humorale.....	24
- Immunoglobulines.....	25
- Rôle des anticorps dans la résistance de l'hôte.....	27
- Rôle du complément.....	32
1.3.2. Immunité à médiation cellulaire.....	38
- Manifestations de l'hypersensibilité retardée <u>in vivo</u> .....	38
- Manifestations de l'hypersensibilité retardée <u>in vitro</u> .....	39
a) Migration des macrophages et des lymphocytes.....	40
b) Transformation blastique.....	40
- Transfert des cellules sensibilisées.....	41
- Déficits lymphocytaires.....	42
1.4. Essais de protection contre <u>T. cruzi</u> .....	43

## CHAPITRE II : MATERIEL et METHODES

2.1. Modèle animal.....	46
- Rats Fischer mâles et femelles.....	46
- Rats Fischer mâles et femelles traités par du sérum anti- $\mu$ .....	46
- Rats "NUDE" femelles.....	46
2.2. Entretien des différentes formes de la souche Tehuantepec de <u>T. cruzi</u> .....	46
- Forme épimastigote de culture à 28°C.....	47
- Forme trypomastigote de culture à 37°C.....	47
- Forme trypomastigote sanguicole.....	47

	Page
2.3. Méthode de comptage des parasites.....	47
- Formes de culture à 28°C et 37°C.....	47
- Formes sanguicoles.....	48
2.4. Typage de la souche Tehuantepec de <u>T. cruzi</u> .....	48
- Isolement des trypomastigotes de rat.....	48
- Lyse des trypomastigotes sanguicoles.....	49
2.5. Essais de protection contre l'infection par <u>T. cruzi</u> chez des rats Fischer mâles.....	49
2.5.1. Protection active avec des formes épimastigotes.....	49
- Schéma de protection.....	50
- Prélèvements sanguins.....	50
2.5.2. Transfert passif d'anticorps.....	52
2.5.3. Transfert passif de cellules sensibilisées.....	52
- Récupération des cellules de la rate.....	52
- Récupération des cellules péritonéales.....	53
- Transfert de cellules sensibilisées.....	53
2.6. Utilisation de rats déficients en lymphocytes B ou T.....	53
- Sérum anti- $\mu$ de lapin.....	53
- Traitement par du sérum anti- $\mu$ des rats nouveaux-nés.....	54
- Infection par <u>T. cruzi</u> .....	54
- Prélèvements sanguins.....	56

	Page
2.7. Paramètres de l'immunité humorale.....	56
- Dosage des IgM et des IgG2a.....	56
- Dosage de l'activité du complément.....	57
- Dosage par hémagglutination des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> .....	59
- Dosage des anticorps lytiques anti- <u>T. cruzi</u> .....	61

### CHAPITRE 3 : RESULTATS

3.1. Comportement du rat Fischer mâle et femelle vis-à-vis de la souche Tehuantepec de <u>T. cruzi</u> .....	63
3.2. Essai de protection contre l'infection.....	65
3.2.1. Protection active avec des formes épimastigotes.....	65
- Parasitémie.....	65
- Mortalité.....	67
3.2.2. Etude immunologique humorale chez les rats immuns.....	67
- Evolution des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> .....	69
. Dosage par hémagglutination passive.....	69
. Dosage des anticorps lytiques.....	71
- Evolution des IgM et des IgG2a.....	71
3.2.3. Protection passive.....	75
3.2.3.1. Transfert d'anticorps.....	75
3.2.3.2. Transfert des cellules sensibilisées....	77

	Page
3.3. Rôle des lymphocytes B.....	79
- Evolution des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> hémagglutinants.....	79
- Evolution des IgM et IgG2a.....	79
- Taux du complément.....	82
- Parasitémie.....	82
- Mortalité.....	85
3.4. Rôle des lymphocytes T.....	86
- Evolution des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> hémagglutinants.....	86
- Evolution des IgM et des IgG2a.....	86
- Taux du complément.....	86
- Parasitémie.....	89
- Mortalité.....	89
3.5. Typage de la souche Tehuantepec de <u>T. cruzi</u> .....	89

#### CHAPITRE 4 : DISCUSSION et CONCLUSION

4.1. Essais de protection contre l'infection....	94
4.1.1. Protection active avec des formes épimastigotes.....	94
4.1.2. Protection passive par transfert de sérum ou de cellules de rats en phase chronique de l'infection.....	99
4.2. Rôle des lymphocytes.....	103
4.2.1. Lymphocytes B.....	103
4.2.2. Lymphocytes T.....	105
CONCLUSION.....	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	116

## RESUME

-:-:-

Nous avons constaté que le rat Fischer mâle immunisé avec deux doses d'épimastigotes de culture à 28°C peut être protégé vis-à-vis de la phase aiguë et non de la phase chronique de l'infection. En effet, une infection sous-patente a été observée chez les rats n'ayant reçu que des épimastigotes.

L'étude immunologique humorale du sérum des rats en phase chronique (rats immuns), nous a permis d'établir une possible corrélation entre la parasitémie sous-patente et les phénomènes d'expression antigénique et d'immunosuppression. D'autre part, les résultats négatifs obtenus par le transfert passif de ce sérum chez des receveurs sains, semblent être liés : 1 - à l'hôte le rat par sa capacité de métaboliser rapidement les anticorps ; 2 - à la souche Tehuantepec de T. cruzi utilisée ; celle-ci correspondrait, d'après nos résultats à la souche du type CL, qui peut échapper à la réponse immune de l'hôte grâce au phénomène de modulation antigénique ; et 3 - à la présence éventuelle de facteurs suppressifs dans le sérum.

L'étude réalisée au cours de l'infection des rats en état de déficit lymphocytaire et leurs témoins indique une concordance remarquable entre les quatre paramètres (parasitémie, anticorps anti-T. cruzi, IgM et IgG2a, complément). Ces résultats impliquent les lymphocytes B dans la production d'anticorps actifs dans l'immunité, les lymphocytes T jouent le rôle de cellules auxiliaires, quant au complément il pourrait vraisemblablement contrôler la parasitémie.

## INTRODUCTION

--:--:--:--:--:--:--

La trypanosomiase américaine ou maladie de Chagas affectait à l'origine des animaux et était transmise par des triatomes sylvatiques. L'invasion des habitations par les triatomes infestés par T. cruzi s'est effectuée lorsque l'équilibre écologique de ce milieu a été perturbé par la présence de l'homme. Ainsi, la maladie a d'abord gagné le milieu rural en infectant l'homme et les animaux domestiques par l'intermédiaire de vecteurs domiciliaires. Puis, il est probable que la trypanosomiase américaine se soit transformée progressivement en une maladie urbaine en raison de l'émigration de personnes malades depuis les zones endémiques vers la ville ou encore par transfusion sanguine ou par infection transplacentaire. Cette grande chaîne épidémiologique a permis ainsi à T. cruzi (agent de la maladie de Chagas) d'étendre son cycle évolutif.

Chez le vecteur, ce parasite se multiplie sous la forme non infectante épimastigote qui migre jusqu'au rectum où elle se transforme en trypomastigote métacyclique. Ces trypomastigotes sont des formes infectieuses qui sont transmises à l'homme et aux animaux par les déjections du triatome.

Chez l'hôte vertébré, le trypanosomatidae se développe sous la forme trypomastigote dans le sang circulant. Sous cette forme, le parasite est exposé aux éléments effecteurs de la réponse immune, tandis que la forme intracellulaire obligatoire ou amastigote assure la survie des parasites ; sous cette dernière forme, le parasite se multiplie et se différencie de nouveau en trypomastigote.

L'infection due à T. cruzi est caractérisée par une phase aiguë avec des trypanostigotes circulants et par une phase chronique sous-patente avec un contrôle rigide de la parasitémie. Pendant cette phase chronique, il n'existe pas d'exacerbation spontanée de la parasitémie et des réinfections ne sont pas à l'origine d'une nouvelle infection aiguë.

Ces évidences suggèrent que :

- l'hôte infecté réagit à l'invasion parasitaire en développant une réponse immune qui met en cause des anticorps humoraux, des cellules sensibilisées et l'interaction d'anticorps avec différents types cellulaires. Mais, les mécanismes qui permettent d'expliquer la résistance du parasite et le contrôle de la parasitémie pendant la phase chronique ne sont pas suffisamment connus ;
- l'utilisation de méthodes immunologiques peut être envisagée pour prévenir l'infection. Cependant, les travaux de nombreux auteurs concernant l'étude de la réponse immune de l'hôte vis-à-vis de Trypanosoma cruzi sont difficilement généralisables en raison des différences parmi les souches du parasite et la variation de susceptibilité des diverses espèces de mammifère.

Nous avons montré dans des expériences précédentes que la lignée consanguine de Rat Fischer (F344) mâle est très susceptible à l'infection par la souche Tehuantepec de T. cruzi. Néanmoins, la mise au point d'un test d'immunisation (à l'aide des formes épimastigotes de culture à 28°C) nous a permis de protéger cette lignée de rats contre la phase aiguë de l'infection (RODRIGUEZ, 1980).

Le présent travail continue ces expériences préliminaires sous deux axes. Le premier temps a consisté à vérifier l'existence d'une protection vis-à-vis de la phase aiguë chez le rat Fischer mâle après l'immunisation par des formes épimastigotes et à rechercher l'effet protecteur du sérum de ces rats immuns par transfert passif. Préalablement, une étude immunologique humorale a permis de préciser les différents paramètres humoraux de cette protection. Puis nous avons envisagé le rôle des cellules B et T dans la maladie de Chagas ; ainsi une étude au cours de l'infection des rats en état de déficit lymphocytaire a été réalisée, en prenant comme paramètres l'évolution de la parasitémie, des anticorps anti-T. cruzi, des IgM, des IgG2a et de la consommation du complément.

Avant d'aborder l'exposé de ces travaux, il est important toutefois de rappeler quelques données générales concernant les relations hôte-parasite dans l'infection par T. cruzi : l'immunité naturelle, les modèles expérimentaux chez l'animal et la réponse immune.

CHAPITRE I : RELATION HOTE - PARASITE

-----

1.1. IMMUNITE NATURELLE A T. CRUZI

L'existence d'une immunité naturelle contre l'infection à T. cruzi a été mise en évidence chez les animaux à sang froid et les oiseaux. Par contre, plusieurs ordres de mammifères, y compris l'homme, ont une faible immunité naturelle contre l'infection. C'est pour cela que les mammifères sont considérés comme les hôtes typiques de T. cruzi. Mais il existe une grande variation dans la susceptibilité à l'infection dépendant de facteurs liés à l'hôte et au parasite.

1.1.1. Facteurs liés à l'hôte

- Espèce

Les travaux de DIAS (1933) nous informent que les reptiles et les amphibiens ne sont pas infectés par des trypanostigotes sanguicoles provenant de mammifères infectés. En trois heures, tous les trypanostigotes disparaissent du site d'inoculation et ne se retrouvent pas dans le sang. En plus, sept jours après l'infection, les tissus de ces animaux ne présentent pas de formes amastigotes. DIAS observe aussi une phagocytose des trypanostigotes chez le reptile Ameiva surinamensis. Plus tard, RUBIO (1956) relate que le principal mécanisme de défense naturelle contre les trypanostigotes infectieux est probablement la phagocytose par les macrophages. Ainsi, lorsque les trypanostigotes sont inoculés à des oiseaux, des grenouilles ou des crapauds, quelques parasites réussissent à

gagner le sang mais sont phagocytés par les macrophages. RUBIO (1956) a aussi signalé que le sérum d'oiseaux, de grenouille et de crapaud contient des substances lytiques qui réagissent contre les formes trypomastigotes de T. cruzi. Le mécanisme qui permet d'expliquer cet effet a été étudié avec du sérum de poulet par KIERSZENBAUM et al. (1976). Il montre que la résistance du poulet à l'infection par T. cruzi et la capacité de leur sérum à lyser les formes trypomastigotes dépendent du système du complément. Les parasites injectés à des poulets privés de complément peuvent être détectés dans le sang au moins pendant 24 heures alors que chez les animaux normaux, ils disparaissent en une minute. La boursectomie hormonale ou l'administration de corticostéroïdes ne rend pas le poulet susceptible à T. cruzi ; les anticorps ne jouent aucun rôle dans cette lyse qui dépend du complément puisque les poulets agammaglobulinémiques sont aussi capables de détruire les parasites. En plus, la lyse in vitro des trypomastigotes par le sérum normal est due à l'activation du complément par la voie alterne, car la lyse se déclenche en l'absence d'ions calcium, mais nécessite la présence d'ions magnésium.

D'autres études sur l'immunité naturelle des oiseaux contre T. cruzi ont été réalisées chez l'embryon de poulet mais les résultats sont contradictoires. PIPKING (1960) rapporte que l'infection expérimentale d'embryon de poulet est à l'origine d'un parasitisme transitoire dans le sang, dans quelques organes et dans la membrane corioallantoïde. CONEJOS (1947) trouve une parasitémie transitoire chez des oiseaux issus d'embryons inoculés avec T. cruzi. Par contre, cette observation ne fut pas confirmée par NERY-GUIMARES et LAGE (1972). Ces derniers auteurs montrent

qu'environ 50 % des oeufs incubés normaux ou soumis à une boursectomie hormonale présentent des flagellés du 4ème au 12ème jour de l'inoculation, alors qu'après l'éclosion, les oiseaux ne présentent pas de trypanostigote circulant. Ces observations peuvent s'expliquer par un taux beaucoup plus bas de complément chez les embryons de poulet, taux qui augmente tout à coup après l'éclosion (KIERSZENBAUM et al., 1976).

L'observation des infections naturelles chez l'homme, chez le réservoir de virus et chez les animaux expérimentalement infectés, démontre une grande variation de susceptibilité vis-à-vis de la maladie, même à l'intérieur d'une même espèce. Ainsi, l'opposum et le tatou par exemple, présentent une infection non mortelle avec une parasitémie très faible et aucune altération tissulaire décelable. Par ailleurs, dans le cas des animaux domestiques (chien, chat) et des animaux infectés expérimentalement (souris consanguines, par exemple) le contraire est observé : la parasitémie est élevée et il existe une altération tissulaire (voir GOBLE, 1970). Ainsi, dans les exemples suivants, on pourra constater des situations différentes :

. le cours de l'infection chez les singes Cebus après inoculations répétées avec différentes doses de parasites fut étudié par TORRES et TABARES (1958). Ces inoculations furent faites par différentes voies. Les animaux meurent entre 95 et 243 jours après l'infection en présentant une myocardite chronique diffuse avec des variations individuelles importantes, tandis que le singe Rhesus développe une infection non fatale accompagnée d'une lymphocytose, d'une anémie et d'une augmentation progressive des taux d'IgM (MARSDEN et al., 1970).

. les animaux domestiques comme le chien et le chat, et même l'homme, meurent rarement au cours de la phase aiguë (DIAS, 1956). Les jeunes chiens infectés par une souche virulente de T. cruzi peuvent développer parfois la phase aiguë de la maladie et succomber, ou par contre survivre et développer une cardiopathie semblable à la cardiopathie chagasique humaine (ANSELMINI et al., 1966). Il fut également démontré l'existence de lésions du myocarde, des muscles squelettiques et du système nerveux chez le chien en phase aiguë de la maladie (KRAMER, 1972).

. le cobaye présente une myocardite chronique diffuse et la présence d'antigènes parasitaires est intimement liée à l'histopathologie de la maladie (FRANCO, 1972). Dans le même modèle, LIMA (1977) en étudiant le système de conduction par coupes sériees a essayé d'établir une corrélation entre les lésions tissulaires et les altérations électrocardiographiques.

. Enfin, l'infection expérimentale de différentes lignées de souris et de rats peut aboutir soit au développement d'une phase aiguë mortelle avec une haute parasitémie, soit à l'apparition des symptômes de la phase chronique de la maladie (PIZZI et al., 1949 ; HAUSCHKA et al., 1950 ; BRENER, 1971 ; TRISCHMANN et al., 1978 ; RIVERA-VANDERPAS et al., 1980).

#### - Lignée de l'hôte

Différentes souches consanguines de souris ont une résistance naturelle variable à T. cruzi (HAUSCHKA, 1947 ; PIZZI et al., 1949). Les souris consanguines sont plus susceptibles au parasite que les souris conventionnelles (GOBLE, 1951). Des études plus récentes avec des souches consanguines de souris montrent que le

principal déterminant génétique de résistance n'est pas associé au complexe majeur H-2 d'histocompatibilité chez la souris (TRISCHMANN et al., 1978). De même, le complexe majeur d'histocompatibilité ne semble pas jouer de rôle important dans l'infection par T. cruzi chez le rat (RIVERA-VANDERPAS et al., 1980).

- Sexe

Les rapports cliniques indiquent que la maladie de Chagas a davantage d'incidence et est plus sévère chez l'homme que chez la femme. Ces résultats peuvent s'expliquer par des contacts plus fréquents avec le secteur de l'infection pour la population mâle. Des études expérimentales ont de plus démontré une susceptibilité accrue chez le mâle lorsque la parasitémie est appréciée par le degré d'invasion du parasite dans les tissus et son temps de survie (HAUSCHKA, 1947). Ces observations ont été confirmées postérieurement par GALLIARD et al. (1962).

- Age

Dès les premières expériences, il a été signalé l'apparition d'infections nettement plus sévères chez les jeunes enfants (CHAGAS, 1909), chez la souris, le rat et les jeunes lapins (NIMI, 1935). Quelques années plus tard, l'influence de l'âge sur la résistance à T. cruzi a été constatée. Les souris de moins de 10 semaines montrent une susceptibilité maximale à l'infection. D'autres études chez le rat définissent l'influence de l'âge sur le développement de la réponse immune et montrent chez plusieurs groupes d'animaux d'âge différent, des changements significatifs dans l'apparition de la production des anticorps en tant que preuve d'une protection (KOLODNY, 1940).

### 1.1.2. Facteurs liés au parasite

L'infection de l'hôte vertébré est clairement influencée par la souche de T. cruzi. Les populations de T. cruzi qui circulent dans la nature en parasitant l'homme, le réservoir domestique et sylvatique, ainsi que les vecteurs renferment probablement un mélange de populations hétérogènes en raison du passage naturel et continu des parasites entre les différents hôtes. Néanmoins, malgré ces conditions, la souche manifeste fréquemment des traits caractéristiques qui permettent son individualisation ; c'est pour cela que probablement des facteurs sélectifs de l'hôte dont les parasites ont été isolés peuvent fournir un certain degré d'homogénéité à la population (BRENER, 1973 ; BRENER, 1979).

#### - Souche

L'étude des différentes populations de T. cruzi implique d'établir des corrélations entre les données suivantes : le comportement de la souche lors des infections expérimentales, les implications cliniques et épidémiologiques, celles-ci permettant de comprendre le rôle possible du parasite dans la pathogénie de la maladie.

Les souches peuvent être individualisées en commençant par l'étude du comportement et du cours de l'infection chez l'hôte, puis par une analyse moléculaire des composants ou des produits métaboliques du parasite.

#### - Classement suivant le comportement

Il a déjà été démontré que des souches différentes de T. cruzi inoculées à des animaux de laboratoire, présentent des caractéristiques différentes. Les paramètres considérés sont la morphologie des parasites dans le sang périphérique, l'évolution

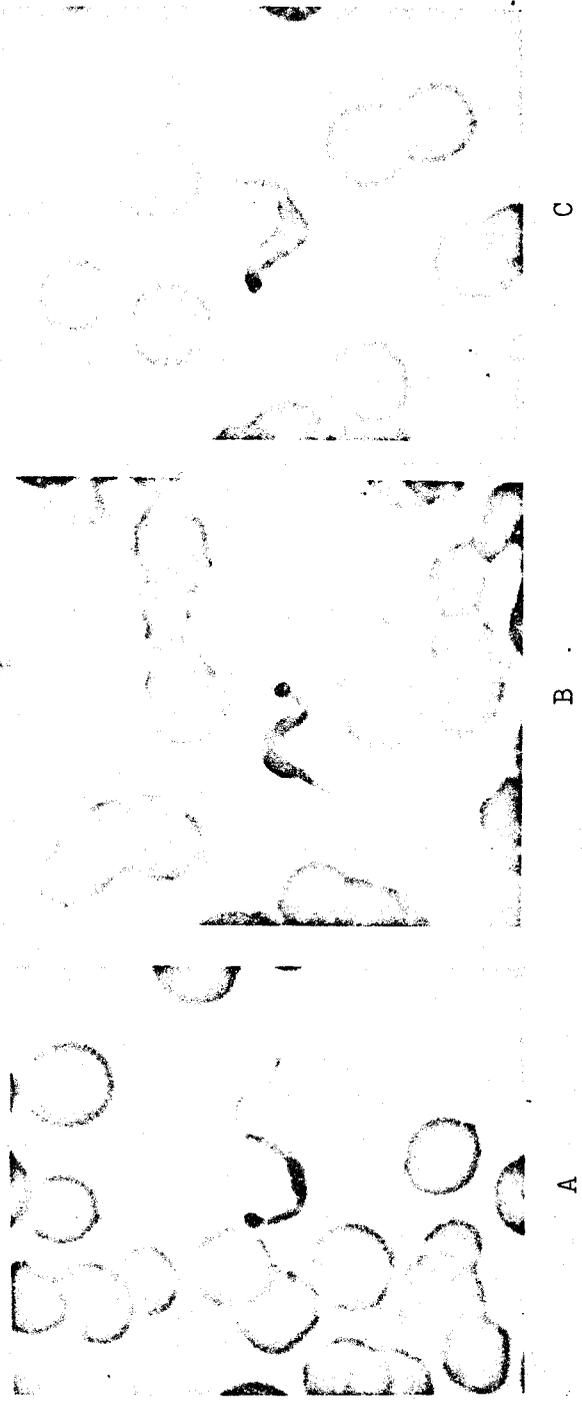
de l'infection chez l'hôte, les courbes de parasitémie, l'affinité pour certains tissus et les lésions histopathologiques chez l'animal expérimental. Pris dans leur ensemble, plusieurs de ces paramètres permettent d'établir des souches types de T. cruzi.

Selon la morphologie que présentent les trypanostigotes dans le sang circulant de l'hôte, BRENER et CHIARI (1963), BRENER (1973) décrivent trois formes de trypanostigotes (Fig. 1), à savoir :

- la forme fine qui présente un noyau allongé, un kinétoplaste sub-terminal et un flagelle libre, long (souche Y, par exemple)
- la forme longue qui présente un noyau ovale, un kinétoplaste sub-terminal et un flagelle libre, long
- la forme trapue qui présente un noyau en position postérieure, un kinétoplaste terminal et un cytoplasme fortement vacuolisé (souche CL, par exemple).

Les formes fines de quelques populations de parasites prédominent pendant tout le cours de l'infection expérimentale, tandis que dans d'autres populations de T. cruzi les formes fines constituent la majorité aux premiers jours de l'infection, mais elles sont progressivement remplacées par des formes trapues qui arrivent à constituer plus de 90 % de la population de parasites (BRENER et CHIARI, 1963 ; BRENER, 1965) (Tableau I).

Cette différence dans la distribution des formes trypanostigotes pendant le développement de l'infection permet d'étudier les possibles différences physiologiques entre les parasites (Tableau I). En effet, lorsque les trypanostigotes sanguicoles sont inoculés par voie intraveineuse à des souris normales, les formes fines disparaissent rapidement de la circulation pour accomplir leur cycle cellulaire ; par contre, les formes trapues restent quelques jours dans le sang sans être prises par les cellules de



**FIGURE 1** : Classement selon la morphologie des formes trypanothigotes dans le sang circulant de l'hôte (BRENER et CHIARI, 1963 ; BRENER, 1973).

- A forme fine (Souche Y)
- B forme longue
- C forme trapue (Souche CL)



l'hôte. Chez les animaux immunisés qui survivent spontanément à la phase aiguë, les formes fines introduites par voie intraveineuse sont rapidement détruites, tandis que les formes trapues se montrent beaucoup plus résistantes et restent dans la circulation pendant un temps prolongé (BRENER, 1969). Plus tard, ces observations furent confirmées par HOWELLS et CHIARI (1975) qui obtiennent des populations pratiquement pures de formes trapues, 24 heures à 48 heures après l'inoculation des parasites par voie intraveineuse chez des souris normales. Ces formes trapues sont moins infectantes que la population normale des trypanostigotes de la même souche, qui d'ailleurs produisent un haut degré d'infectivité chez les triatomés.

L'affinité que certaines souches ont pour des tissus déterminés, a permis de les classer en souches myotropes (ANDRADE et ANDRADE, 1966 ; BICE et ZELEDON, 1970) ou en souches réticulotropes (TALIAFERRO et PIZZI, 1955). MELO et BRENER (1978) décrivent le comportement des souches Y et CL, en se basant sur la distribution quantitative des parasites chez l'animal infecté (Tableau I). Ainsi, la souche Y (macrophagotrophique) a une préférence pour le parasitisme des macrophages de la rate, du foie et de la moëlle osseuse. Cette souche appartient aux souches réticulotrophiques déjà étudiées par TALIAFERRO et PIZZI (1955). Enfin, la souche CL présente un parasitisme faible des macrophages, mais a une préférence pour le tissu musculaire.

ANDRADE (1979) établit trois types de souches parmi différentes souches de T. cruzi étudiées en se basant sur le profil morphologique, sur la parasitémie et sur la distribution des parasites dans les tissus : (Tableau II)

TABLEAU I

QUELQUES CARACTERISTIQUES DES FORMES TRYPOMASTIGOTES SANGUICOLES  
DE DEUX SOUCHES TYPE DE T. CRUZI

CARACTERISTIQUES	SOUCHE TYPE	
	Y	CL
Profil morphologique (Brener et Chiari, 1963 ; Brener, 1973)	Fine	Trapue
Distribution des formes pendant le cours de l'infec- tion aiguë (Brener et Chiari, 1963 ; Brener, 1965)	Prédominant du début à la fin de l'infection	Prédominant à la fin de l'infection
Différences physiologiques*	Chez souris normales	Disparaissent rapidement de la circulation
	Chez souris ayant survécu à une phase aiguë	Rapidement détruites
Distribution des parasites chez l'animal infecté (Melo et Brener, 1978)	Macrophages de la rate, du foie, de la moëlle osseuse	Restent quelques jours dans le sang
		Plus résistantes
Distribution des parasites chez l'animal infecté (Melo et Brener, 1978)	Macrophages de la rate, du foie, de la moëlle osseuse	Tissu musculaire

\* Etablies par inoculation intraveineuse (Brener, 1969 ; Howells et Chiari, 1975)

<sup>1</sup> Cette caractéristique appartient aux souches réticulotrophiques étudiées par Taliaferro et Pizzi (1955)



- type I : qui présente une rapide multiplication, des hautes parasitémies très prématurées avec une grande mortalité des souris ; environ 10 jours après l'infection, des formes fines sont prédominantes et on observe un réticulotropisme dans la phase initiale de l'infection (souches Y et péruvienne) ;
- type II : qui présente une multiplication lente, des pics irréguliers de parasitémie entre le 12ème et 20ème jours après l'infection, une prédominance de formes trapues pendant l'infection, un nombre très faible de formes fines dans la phase initiale ; ce type a une prédominance myotrophique (souche Sao FELIPE) ;
- type III : qui présente une multiplication très lente, des pics élevés de parasitémie entre le 20ème et 30ème jours après l'infection, un faible pourcentage de mortalité et une prédominance des formes trapues du parasite pendant l'infection avec un parasitisme au niveau de muscles squelettiques (souche colombienne).
- Classement par analyse biochimique

Les études chimiothérapeutiques montrent aussi des différences de susceptibilité entre les souches de T. cruzi. BRENER et al. (1976) montrent que les souches de type Y sont beaucoup plus résistantes au traitement par le nitrofurane et par un dérivé nitroimidazole que les souches type CL.

L'hétérogénéité antigénique des populations de T. cruzi peut permettre aussi sa différenciation ; ainsi trois groupes parmi 36 souches furent décrits par NUSSENZWEIG et al. (1962 ; 1963) :

TABLEAU II

CARACTERISTIQUES DES TROIS SOUCHES TYPES CLASSEES PAR ANDRADE (1979)

	SOUCHES TYPES		
	I	II	III
Profil morphologique	Fines	Fines dans la phase initiale	Trapues
Multiplication	Rapide	Lente	Très lente
Parasitémie	Haute	Irrégulière	Pics élevés
Distribution des parasites chez l'animal infecté	Réticulo-endothéliale	Muscle cardiaque	Muscle squelettique
Exemples	Péruvienne Y	Sao Felipe	Colombienne



- Groupe A : formé par des souches qui peuvent absorber complètement les agglutinines du sérum anti-A ;
- Groupe B : formé par des souches qui peuvent absorber une partie des agglutinines du sérum anti-A ;
- Groupe C : formé par des souches différentes des groupes A et B, mais qui probablement sont plus proches du groupe A.

Ces trois groupes immunologiques ne furent ni clairement associés avec la pathogénicité de l'hôte, ni avec la distribution géographique (NUSSENZWEIG et GOBLE, 1966). Les tests de protection (NUSSENZWEIG et al., 1963) n'ont pas permis non plus d'aboutir à cette classification.

KRETTLI et BRENER (1976) réalisent un test d'agglutination des formes sanguicoles et classent les souches en trois types :

- des souches dont les parasites sont remarquablement agglutinés et lysés par des anti sérums homologues et hétérologues (souches Y et Berenice) ;
- des souches dont les trypomastigotes ne sont pas agglutinés (CL, J) ;
- des populations de parasites partiellement agglutinés (FL).

D'autre part, KLOETZEL et CAMARGO (1976), avec le test d'immunofluorescence trouvent des différences antigéniques entre les épimastigotes de culture et les formes sanguicoles des souches Y et Brésil ; ces différences antigéniques correspondent aux types immunologiques A et B décrits par NUSSENZWEIG et GOBLE (1966).

BERGENDI et al. (1970) à partir d'un extrait hydrosoluble de formes de culture de T. cruzi identifient trois fractions antigéniquement réactives dont une est considérée comme similaire à celles décrites par NUSSENZWEIG et GOBLE (1966).

Par contre, des études immunostructurales portant sur différentes souches de T. cruzi d'origine variée montrent une grande homogénéité antigénique (AFCHAIN et al., 1979).

Les analyses antigéniques des souches I, II, III décrites par ANDRADE (1979) suggèrent que le degré majeur d'immunogénicité correspond à la souche II, tandis que le degré mineur correspond à la souche III.

L'évaluation des profils enzymatiques de T. cruzi par des analyses électrophorétiques a permis de classer les souches en souches sylvatiques et en souches domiciliaires (MILES et al., 1977).

Enfin, il a été observé que les caractéristiques cliniques de la maladie de Chagas varient selon la zone de distribution géographique. Ainsi, les cas aigus sont plus fréquents en Argentine que dans les autres zones endémiques, alors que les états intestinaux extrêmes sont communs au Brésil, mais très rares au Vénézuéla (O.M.S., 1974).

Après avoir vu cet ensemble de facteurs qui jouent un rôle important dans l'étude de l'immunité à T. cruzi, il est évident que la morphologie de chacune des formes sanguicoles est un marqueur représentant les différences physiologiques et les possibilités d'évolution. Mais le problème posé est de savoir comment établir une corrélation entre tous ces facteurs morphologiques, pathologiques, épidémiologiques et biochimiques.

#### - Entretien in vivo et in vitro

La virulence des souches de T. cruzi peut être affectée par leur mode d'entretien. Il a été observé que l'entretien prolongé dans un milieu de culture diminue la virulence, que l'entretien in vivo chez des animaux susceptibles peut provoquer une augmentation

de la pathogénicité. Ces observations sont conditionnées par beaucoup de facteurs, donc il n'est pas possible d'établir une règle générale. Ainsi, l'entretien prolongé in vitro peut provoquer une diminution de l'action infectieuse de la souche de T. cruzi (GOBLE, 1951 ; PIZZI et PRAGER, 1952), une augmentation de la virulence dans le cas de souches considérées comme de basse virulence ou tout simplement ne pas affecter les souches (PACKCHAVIAN et SWEETS, 1947).

Les résultats d'entretien in vivo sont également imprévisibles. Malgré l'absence de nombreuses évidences expérimentales, il semble que les souches virulentes entretenues par passage mécanique chez la souris montrent des caractéristiques inhérentes de virulence lorsqu'elles sont isolées d'humains ou de vecteurs dans les zones endémiques, tandis que les souches moins virulentes ne présentent pas des caractéristiques inhérentes de virulence lorsqu'elles sont isolées d'animaux (NORMAN et KAGAN, 1960 ; NUSSENZWEIG et al., 1963). D'autre part, il n'est pas connu que la virulence d'une souche originalement de basse virulence puisse augmenter après avoir été entretenue chez des animaux tandis que la virulence d'une souche hautement virulente peut se rétablir par passages répétés chez des animaux (GOBLE, 1951 ; PHILIPPS, 1960).

#### - Quantité de parasites inoculés

Un autre facteur qui peut aussi jouer un rôle important dans la résistance naturelle est la quantité de parasites inoculés chez l'hôte. Ainsi, tandis que quelques auteurs remarquent une corrélation complète entre le nombre de parasites inoculés et la sévérité de l'infection (DA SILVA et NUSSENZWEIG, 1953 ; HEWITT et al., 1963), d'autres trouvent une corrélation partielle (MAZZOTTI, 1940 ; PIZZI et PRAGER, 1952) et enfin certains ne

trouvent aucune corrélation (KOLODNY, 1940). Ces résultats contradictoires sont probablement dûs au type de souche utilisée. PHILIPS (1960) a démontré qu'il existe deux types d'infection expérimentale à T. cruzi et chacune dépend des caractéristiques de la souche :

- dans un type, l'intensité et le cours de l'infection sont associés avec le nombre de parasites inoculés ;
- dans l'autre type, la réduction du nombre de parasites inoculés ne modifie pas l'intensité de la réponse, même si celle-ci peut apparaître de façon retardée.

Il faut signaler que la voie utilisée pour inoculer les parasites peut influencer la sévérité de l'infection. Il fut démontré que des infections plus homogènes sont obtenues si les parasites sont inoculés par voie sous-cutanée (DA SILVA et NUSSENZWEIG, 1953 ; HEWITT et al., 1963). En particulier, l'infection par cette voie entraîne chez la souris une parasitémie qui varie en fonction de la dose d'infection.

## 1.2. MODELES EXPERIMENTAUX CHEZ L'ANIMAL

Plusieurs espèces d'animaux ont été utilisées pour les études expérimentales sur la maladie de Chagas. Parmi celles-ci on peut signaler :

### - Cobaye

Le cobaye a servi de modèle depuis les premières investigations. L'infection se développe faiblement, les parasitémies sont basses et la mortalité est retardée (MAYER et ROCHALIMA, 1954). Des études plus récentes décrivent des lésions du myocarde et du muscle squelettique avec participation de cellules du système

phagocytaire mononucléaire. Le cobaye apparaît comme un modèle intéressant pour l'étude de la réponse immunologique dans le cas de ces myocardites chagasiques (BRENER, 1979).

- Chinchilla

BAFORT et al. (1973) suggèrent que le Chinchilla lamigera peut être un excellent modèle expérimental ; cet animal est extrêmement susceptible à l'infection, on trouve un grand nombre de trypanosomes dans le sang et de nombreuses formes intracellulaires dans les organes. L'infection est fatale expérimentalement, mais elle n'est pas fulminante dans la nature.

- Singe

Les primates présentent un certain degré de résistance aux inoculations (TORRES et TABARES, 1958) et il est difficile d'évaluer le cours de l'infection. Des travaux immunologiques ultérieurs démontrent qu'il existe une phase aiguë et chronique de l'infection (GUIMARES et MIRANDA, 1961 ; MARSDEN et al., 1970, 1976 ; SEAH et al., 1974) ; les images électrocardiographiques et histopathologiques (MILES et al., 1979) ressemblent fort à celles obtenues chez les humains.

Il fut également démontré que le sérum du singe Rhésus infecté avec T. cruzi présente des auto-anticorps EVI (endocarde, veines, interstice du muscle strié), des auto-anticorps PN (nerf périphérique) (SZARFMAN et al., 1978) et des immunoglobulines réagissant avec les tissus (SZARFMAN et al., 1981), identiques à ceux décrits dans les infections humaines. Ces derniers auteurs proposent le singe Rhésus comme modèle convenable pour les études expérimentales sur la maladie de Chagas.

- Lapin

Les lapins sont des animaux très peu susceptibles à l'infection à T. cruzi et peu de chercheurs utilisent ce modèle.

TEIXEIRA et al. (1975) décrivent une myocardite chronique chez les lapins ressemblant à celle observée dans des cas humains chroniques, tandis que CHIARI et al. (1980) signalent après une période d'observation allant de 4 mois à 2 ans, l'absence de myocardite chronique évolutive et de toute autre lésion tissulaire qui puisse permettre de recommander le lapin comme un modèle expérimental.

Il faut signaler aussi que les animaux en phase chronique présentent une réaction positive de fixation du complément. Sur le plan immunologique, le lapin semble être un bon modèle expérimental comme il a été démontré par TEIXEIRA et SANTOS BUCH (1974) et SANTOS BUCH et TEIXEIRA (1974).

- Chien

Les chiens sont considérés comme l'espèce animale la plus convenable pour les études anatomopathologiques et électrocardiographiques. Les jeunes chiens infectés par une souche virulente de T. cruzi développent la phase aiguë et meurent entre 20 et 30 jours après l'infection. Mais lorsqu'ils survivent, ils développent une cardiopathie semblable à celle subie par les humains (ANSELM et al., 1966 ; PIFANO et al., 1962). De plus, il a été démontré qu'il existe une corrélation entre les résultats électrocardiographiques, histologiques et le système de conduction (ANSELM et al., 1967, 1971).

- Souris

Dans la trypanosomiase expérimentale, les souris ont été les animaux les plus utilisés. Cette espèce a servi comme modèle aussi bien dans la phase aiguë que dans la phase chronique de l'infection et même pour les études thérapeutiques expérimentales.

Les études sur la susceptibilité à T. cruzi vis-à-vis de différentes souches de souris démontrent la grande variabilité de cet hôte à l'infection (PIZZI et al., 1954). Ainsi, de nombreuses études ont montré qu'en utilisant cette espèce (ANDRADE, 1974 ; CULBERSTON et KESSLER, 1942 ; KAGAN et NORMAN, 1960 ; WATKINS, 1966) la susceptibilité est liée soit au parasite (souches, entretien in vivo et in vitro, quantité de parasites inoculés), soit à l'hôte (lignées, sexe, âge).

Les infections chroniques chez la souris s'accompagnent d'altérations macroscopiques et microscopiques au niveau du coeur (ANDRADE et ANDRADE, 1976), d'une myocardite chagasique (KUMAR et al., 1969). En plus, des altérations du système nerveux autonome ont été décrites au moyen de la microscopie optique (TAFURI et BRENER, 1967). LAGUENS et al. (1980) en suivant une étude sur le plan morphologique, électrocardiographique et immunologique chez des souris au cours de la phase chronique, concluent que la maladie chez ces animaux est assez semblable à la maladie chronique humaine.

- Rat

Chez le rat, différents aspects plus généraux concernant la maladie de Chagas ont été considérés. Ces animaux développent une infection plus faible que celle observée chez la souris infectée avec la même souche (PIZZI, 1953). Il semble que la résistance à T. cruzi dépende de l'âge des animaux (KOLODNY, 1940). PIZZI et al., 1953).

ont montré que les jeunes rats (Ratus norvegicus) développent une haute parasitémie et que les mécanismes immunologiques semblent fondamentalement humoraux avec une phagocytose secondaire. Par contre, chez les animaux plus âgés, l'augmentation de la réponse immune est expliquée principalement par la phagocytose et par la digestion de la plupart des parasites au site d'inoculation. Les rats Wistar de 25 à 50 grs infectés par la souche Y développent une infection mortelle entre 10 et 25 jours avec des lésions irrégulières du myocarde et dans quelques cas, une myocardite intensive. En utilisant la même lignée de rats et la même souche de parasite, SCORZA et SCORZA (1972) observent aussi des myocardites intensives mais les animaux survivent. D'autre part, des rats Wistar, ainsi que tous les rats R. norvegicus dans la phase chronique de la maladie présentent des lésions du système nerveux autonome (ALCANTARA et OLIVEIRA, 1964 ; ALCANTARA et al., 1965). Nos résultats établissent clairement que le rat Fischer mâle développe la phase aiguë de la maladie en succombant avec un nombre important de formes trypanosomites sanguicoles (RODRIGUEZ, 1980). Par contre, le rat Fischer femelle développe une faible parasitémie qui disparaît vers le 40ème jour après l'infection (RIVERA-VANDERPAS, 1980) ; au niveau de cette lignée de rats, il semble que la résistance soit davantage liée au sexe qu'à l'âge des animaux.

Le traitement immunosuppresseur (dose subléthale de rayons X, thymectomie, cortisone) a été utilisé pour rendre cet hôte susceptible et étudier le développement de la phase aiguë chez des rats normalement résistants (BEHBEHANI, 1971 ; COVER et GUTTERIDGE, 1978 ; ROBERSON et al., 1973 ; RUBIO, 1954). Ainsi, GUTTERIDGE et al. (1978) utilisent des rats irradiés pour obtenir des formes intracellulaires et des formes sanguicoles en quantité suffisante pour des études biochimiques.

### 1.3. REPOSE IMMUNE

Il est évident que les mécanismes immunitaires de l'hôte interviennent dans le déroulement de l'infection à T. cruzi. En effet, le nombre élevé de trypanostigotes sanguicoles circulants pendant la phase aiguë de l'infection diminue progressivement au moment de l'initiation de la phase chronique. Pendant la phase chronique, les parasites ne sont pas détectés à l'examen direct de sang, mais néanmoins, ils subsistent chez l'hôte durant toute sa vie avec l'établissement d'un équilibre entre le parasite et l'hôte ; d'ailleurs chez un hôte remarquablement susceptible, les inoculations de doses non mortelles de parasites ou de souche de basse virulence, induisent chez l'hôte une forte protection contre d'autres épreuves utilisant des doses mortelles de souches homologues ou hétérologues.

#### 1.3.1. Immunité humorale

L'immunité humorale participe dans la résistance à T. cruzi comme le démontrent les trois faits suivants : l'augmentation des immunoglobulines durant les phases d'infection ; les résultats positifs obtenus par transfert passif, et une plus grande infectivité des animaux mauvais producteurs d'anticorps (souris BIOZZI). La participation de la réponse humorale de l'hôte dans la protection semble dépendre de la forme fine ou trapue du trypanostigote sanguicole, des récepteurs d'anticorps au niveau des trypanostigotes, de la durée de l'infection et des mécanismes d'activation du complément.

### - Immunoglobulines

En ce qui concerne les études des taux d'immunoglobulines (Ig) dans le sérum humain et d'animaux en phases aiguë et chronique de l'infection par T. cruzi, les résultats sont contradictoires. Les sérums de patients au cours de la phase aiguë de l'infection (LELCHUK et al., 1970) présentent des concentrations normales d'IgG, IgM et IgA, bien que l'on observe des anticorps anti-trypanosome de nature IgM. Pourtant, VATTUONE et al. (1973) démontrent que les concentrations d'IgM et IgG sont remarquablement plus hautes dans la phase aiguë que dans la phase chronique, par rapport à des contrôles non infectés. L'étude d'une infection humaine acquise par accident dans un laboratoire montre que les taux d'IgM et IgG restent normaux 19 jours après l'infection. Ces taux augmentent remarquablement dans le sérum entre le 40ème et le 100ème jour après l'infection (HANSON, 1976). Des anticorps spécifiques IgM furent démontrés par CAMARGO et AMATO NETO (1974) sur 19 cas aigus, suite à une infection transfusionnelle sanguine ou naturelle par vecteur ; mais de tels anticorps ne sont pas détectés dans 40 cas chroniques. Quelques années plus tard, SCHMUNIS et al. (1978) décrivent des concentrations d'IgM élevées dans la phase aiguë humaine par rapport à celles observées chez des contrôles sains.

Les résultats des taux des immunoglobulines sériques chez des patients en phase chronique de la maladie montrent des valeurs normales d'IgM et IgA et une faible augmentation des IgG (LELCHUK et al., 1970). D'après VATTUONE et al. (1973), les taux d'IgG augmentent remarquablement par rapport aux groupes contrôles ; cependant, MARSDEN et al. (1970) trouvent que les taux d'IgG, d'IgM et d'IgA sont davantage similaires à ceux détectés chez les humains non infectés qui habitent dans la même zone endémique.

Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par les méthodologies différentes utilisées pour déterminer les taux des immunoglobulines et par la sélection des groupes contrôles.

Dans l'infection par T. cruzi chez la souris, les courbes d'évolution des IgG et des IgM sont assez régulières. Les perturbations des immunoglobulines portent essentiellement sur les IgG2 dont le taux très augmenté à la fin de la phase parasitémique ne diminue que très progressivement ensuite. L'élévation considérable du taux des IgG2 persiste bien après la phase de parasitémie (CARP BEN et al., 1974). En utilisant le même modèle, HANSON (1977) détermine la relation entre les protéines sériques, les taux d'IgG et IgM et la parasitémie chez des souris infectées expérimentalement par T. cruzi. Les résultats démontrent une augmentation des gammaglobulines totales entre la 2<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaine après l'infection, puis une diminution de la concentration s'approchant des valeurs normales vers la 21<sup>ème</sup> semaine. Dans cette étude, l'augmentation principale des gammaglobulines sériques coïncide avec la diminution des parasites dans le sang ; les niveaux les plus élevés de gammaglobulines se retrouvent lorsque les parasites ne sont pas observés à l'examen direct de sang. Les concentrations d'IgG et d'IgM sont aussi augmentées, l'augmentation des IgG coïncide avec l'augmentation des gammaglobulines et diminue entre la 8<sup>ème</sup> et la 15<sup>ème</sup> semaine et vers la 20<sup>ème</sup> semaine, les taux restent plus élevés que ceux des sérums normaux. Les IgM augmentent entre la 2<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine puis diminuent vers la 15<sup>ème</sup> semaine pour redevenir normaux à la 20<sup>ème</sup> semaine.

- Rôle des anticorps dans la résistance de l'hôte

Dans la maladie de Chagas, il a été démontré des anticorps circulants par les tests sérologiques tels que l'agglutination, la précipitation, l'hémagglutination, la fixation du complément, l'immunofluorescence indirecte (GOBLE, 1970).

Le rôle des anticorps circulants dans la résistance contre l'infection à T. cruzi a été le sujet de controverses (BRENER, 1980). Les premiers auteurs démontrent l'effet protecteur du sérum immun par transfert passif (CULBERSTON et KOLODNY, 1938 ; KOLODNY, 1940). Le sérum de rat prélevé lors d'une infection aiguë expérimentale à T. cruzi injecté chez des rats normaux donne une protection remarquable. Les rats qui reçoivent une seule injection de 0.5 ml de sérum immun, deux semaines après l'infection, présentent une diminution remarquable de la parasitémie et de la mortalité. Le sérum de rat donneur a un effet protecteur à peu près 35 jours après l'infection, ce qui coïncide avec l'élimination des parasites du sang périphérique du donneur. Les expériences de transfert passif de sérum furent poursuivies par KAGAN et NORMAN (1961) et SCOTT (1979) et montrent des résultats similaires chez la souris, tandis que HAUSCHKA et al. (1950) ne parviennent pas à protéger des souris normales préalablement injectées avec du sérum de souris récupéré lors de la phase aiguë, contre une infection homologue létale.

Il semble que la protection par anticorps spécifiques contre l'infection puisse être importante pour certaines souches de T. cruzi. MCHARDY (1977) démontre qu'une seule dose de sérum anti-T. cruzi de souris convalescentes, appliquée un jour après l'infection homologue (souche Y) donne une protection remarquable par rapport aux contrôles ayant reçu du sérum normal. Par contre, le même sérum anti-T. cruzi

de souris convalescentes est significativement moins efficace chez des souris infectées avec la souche Tulahuen.

D'autre part, l'effet protecteur des anticorps humoraux dépend aussi des animaux immunisés. Les sérums de souris immunisées avec des formes vivantes de culture de T. cruzi ne donnent pas de protection aux receveurs consanguins même s'ils sont injectés deux jours avant ou deux jours après l'infection d'épreuve avec la souche Tulahuen (REED, 1980). D'ailleurs, l'injection d'antisérum contre la forme de culture de T. cruzi n'affecte pas le cours de la parasitémie ni la mortalité de souris ayant une infection patente établie. VOLLER et SHAW (1965) montrent seulement une immunisation passive très légère lorsqu'ils utilisent des sérums de lapin ou de souris anti-épimastigotes ou trypanomastigotes broyés.

KIERSZENBAUM (1980) met l'accent sur le rôle défensif de l'immunité humorale dans la protection de l'hôte contre l'infection à T. cruzi ; des transferts passifs de sérum immun chez des souris athymiques un jour avant l'infection avec la souche Tulahuen retarde l'apparition des parasites et prolonge la survie par rapport aux contrôles athymiques qui reçoivent du sérum normal.

L'absence de protection dans certaines expériences peut être due à l'antisérum utilisé. Souvent, il est préparé contre la forme épimastigote ; cette forme ne se trouve pas chez l'hôte vertébré, ce qui explique le peu d'effet qu'il exerce sur les formes trypanomastigote et amastigote chez la souris (HANSON, 1976).

D'autres expériences ont démontré que les facteurs humoraux peuvent influencer le cours de l'infection à T. cruzi. Le parasite préalablement incubé avec du sérum immun, produit chez la souris des parasitémies moins sévères et des mortalités plus basses (PIZZI et al., 1954 ; PIZZI et RUBIO, 1955). Récemment, il a été démontré

clairement la participation des anticorps dans la résistance de l'hôte à T. cruzi, ce qui a permis d'éclaircir certaines controverses. KRETTLI et BRENER (1976) et KRETTLI (1978) étudient l'effet du sérum immun de souris ayant une infection chronique sur les formes sanguicoles de deux souches types de T. cruzi (souches Y et CL), ainsi que l'action protectrice de ces sérums chez l'hôte. Les formes fines (souche Y) sont fortement agglutinées in vitro par le sérum immun homologue ou par le sérum immun hétérologue anti-CL ; l'agglutination s'effectue avec du sérum immun recueilli entre la 7<sup>ème</sup> et la 22<sup>ème</sup> semaine après l'infection ; elle est négative avec du sérum recueilli 4 semaines après l'infection. Le sérum de patients en phase chronique de la maladie agglutine aussi les parasites de la souche Y, tandis que les formes trapues (souche CL) ne sont pas affectées par ces mêmes sérums. L'infectivité de la souche Y diminue remarquablement lorsque les trypomastigotes sont préincubés avec du sérum immun de souris ou de malades en phase chronique. Ces parasites ainsi traités induisent chez la souris des parasitémies beaucoup plus basses que celles observées chez des souris ayant reçu des trypomastigotes non traités. La parasitémie n'est pas affectée chez les souris inoculées avec des parasites de la souche CL préalablement incubés avec du sérum immun.

Ces résultats expérimentaux permettent de penser que le développement de la réponse immune de l'hôte dans la phase chronique de la maladie peut être en relation avec l'agglutination et la perte d'infectivité du parasite.

L'effet protecteur du sérum par transfert passif a été aussi étudié avec les souches Y et CL. Les souris qui reçoivent du sérum immun homologue ou hétérologue une heure avant l'infection d'épreuve avec la souche Y présentent une parasitémie et une mortalité

remarquablement plus basses que celles des animaux qui reçoivent du sérum normal de souris; tandis que le cours de la parasitémie et le pourcentage de mortalité ne sont pas affectés chez les animaux qui reçoivent du sérum immun et sont inoculés avec des trypomastigotes de la souche CL. Les différences entre les souches Y et CL sont probablement en relation avec les différences observées dans la distribution quantitative des parasites chez l'animal infecté (MELO et BRENER, 1978) (p. 12 ). D'ailleurs, KRETTLI et BRENER (1976) signalent que ces différences sont étroitement parallèles aux études effectuées précédemment : la forme fine des trypomastigotes sanguicoles qui prédominent dans la souche Y s'ils sont inoculés par injection intraveineuse chez la souris disparaissent rapidement de la circulation ; tandis que les formes trapues prédominantes chez la souche CL sont capables de rester quelques jours dans le sang (BRENER, 1969 ; HOWELLS et CHIARI, 1975). Les résultats discordants obtenus concernant les mécanismes humoraux de l'immunité peuvent être justifiés par les variations intra-spécifiques de T. cruzi. Cette suggestion est partiellement envisagée par MCHARDY (1977) qui pense que la variabilité de ses résultats d'immunisation passive avec des sérums de souris en convalescence et comme infection d'épreuve, les souches Y et Tulahuen ( p. 13 ) peut être causée par les différences de comportement des souches de T. cruzi.

Le rôle des anticorps dans la résistance de l'hôte fut étudié par KIERSZENBAUM et HOWARD (1976) en utilisant des souris bonnes (Ab/H) et mauvaises (Ab/L) répondeuses. Ces deux lignées de souris génétiquement sélectionnées diffèrent dans leur capacité de produire toutes les classes des immunoglobulines mais montrent des différences négligeables en ce qui concerne la réponse immune cellulaire. Les

souris mauvaises répondeuses sont davantage susceptibles à l'inoculation avec les deux souches de T. cruzi, ceci basé sur les parasitémies maximales et la survie. L'effet des anticorps par transfert passif fut déterminé chez les souris Ab/L qui reçoivent une injection de sérum immun provenant d'animaux en phase chronique ; l'infection d'épreuve fut faite avec une souche de haute virulence. La protection observée démontre que la susceptibilité plus grande des souris Ab/L est due à leur défaut dans la capacité de synthétiser des anticorps plutôt qu'à une incapacité génétique inhérente.

HANSON (1977) met en évidence l'importance des anticorps dans la résistance de l'hôte en démontrant que chez des souris infectées, l'augmentation des gammaglobulines totales et en particulier des IgG est en relation avec la diminution des formes sanguicoles et des formes intracellulaires. La concentration maximale des facteurs sériques s'établit à la 6ème semaine après l'infection. Le transfert passif de ce sérum (de la 6ème semaine) induit chez les receveurs normaux une diminution de la parasitémie et de la mortalité après l'infection. La densité des formes intracellulaires est d'autant plus faible chez les souris immunisées. Des observations plus directes de la participation des immunoglobulines IgG dans les mécanismes de résistance de l'hôte sont données par CASTELLO BRANCO (1978) grâce à des études sur le sérum immun recueilli chez des souris lors de la phase aiguë et chronique de la maladie en effectuant différents fractionnements des immunoglobulines (7S, 7S appauvries en IgG, 19S, IgG). Les tests in vivo et in vitro donnent les résultats suivants : (a) - les souris sont protégées contre une infection d'épreuve avec la souche Y, après transfert passif du sérum complet, ainsi que des fractions

7S et IgG obtenues d'animaux en phase chronique ; il n'observe pas de protection chez les souris recevant les fractions 19S et 7S appauvries en IgG ; (b) - il n'obtient pas de protection par transfert passif de sérum immun total 19S et 7S d'animaux en phase aiguë ; (c) - l'agglutination des formes sanguicoles est observée avec du sérum immun complet et avec les fractions 7S et IgG de souris en phase chronique ; la fraction 7S appauvrie en IgG n'a pas d'effet agglutinant. Ces données établissent clairement que l'IgG de souris est l'immunoglobuline induisant la résistance durant la phase chronique de la maladie expérimentale de la souris. Le fractionnement de sérum immun d'animaux en phase chronique en utilisant l'absorption avec la protéine A et un antisérum monospécifique suggère que l'effet protecteur dépend de l'IgG2a et de l'IgG2b, mais non de l'IgG1 (TAKEHARA et al., 1978).

#### - Rôle du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines sériques (C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9) qui sont activées dans certaines circonstances les unes après les autres, selon une séquence bien définie. Ces protéines sont capables de se fixer sur un grand nombre de systèmes antigène-anticorps et jouent un rôle essentiel dans les dispositifs effecteurs de l'immunité. L'activation se conçoit par deux voies. La voie classique est sous la dépendance de la fréquence d'immunocomplexes où l'anticorps possède le site de fixation du C1q (IgG1 - IgG2 - IgG3 - IgM) en présence d'ions calcium ( $Ca^{2+}$ ). La voie alterne, dite de la properdine, peut être activée par des substances immunologiques (agrégats d'immunoglobulines) ou non immunologiques (polysaccharides, venin de cobra) qui mettent en jeu les différents éléments de ce système à partir d'un facteur de départ inactif (le facteur

d'initiation) aboutissant à la formation de plusieurs convertases, l'une en particulier qui agit sur le C3 et l'autre sur le C5 ; les ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ), mais non les ions calcium ( $Ca^{2+}$ ) sont indispensables au fonctionnement de la voie alterne.

Parmi les mécanismes immuns de l'hôte contre la Trypanosomiase Américaine (Maladie de Chagas), la lyse des formes épimastigotes de culture et des formes sanguicoles de T. cruzi a été décrite comme un mécanisme dépendant du complément.

#### - Etude in vitro

Les formes épimastigotes de culture sont lysées par le sérum normal humain ou le sérum normal de cobaye (MUNIZ et BORRIELLO, 1945). La lyse immune de cette forme de culture demande la participation des anticorps et du complément qui est activé par la voie classique en ne faisant pas appel au système de la properdine. La cinétique de la réaction est similaire à celle suivie pour la lyse immune des érythrocytes sensibilisés de mouton : en effet, la concentration d'ions bivalents est nécessaire pour obtenir une lyse optimale, les composants C3 et C4 se fixent sur la membrane cellulaire entraînant des modifications ultra-structurales caractéristiques (ANZIANO et al., 1972). D'autres chercheurs considèrent que la lyse des formes épimastigotes ne demande pas la participation d'anticorps, le complément étant activé par la voie alterne. Le sérum normal humain, de rat, de lapin, de cobaye, de hamster, de poulet, de pigeon, de grenouille et de crapaud produisent une destruction rapide des épimastigotes ; seul le sérum de souris ne possède pas cette propriété (RUBIO, 1954). D'ailleurs, le processus dépend des ions  $Mg^{2+}$  et non des ions  $Ca^{2+}$  ; l'effet lytique est éliminé par chauffage du sérum à 50°C pendant 30 minutes ; la lyse est inhibée par l'élimination de la properdine et l'activité

lytique est présente dans le sérum de cobaye déficient en C4 (NOGUEIRA et al., 1975).

Les formes trypomastigotes sanguicoles sont lysées par le sérum normal de crapaud, de grenouille et de poulet (RUBIO, 1954 ; KIERSZENBAUM et al., 1976) ; le complément étant activé par la voie alterne (KIERSZENBAUM et al., 1976) ( p. 5 ). Par contre, les formes trypomastigotes sanguicoles sont considérablement résistantes à l'effet lytique du sérum normal humain, de cobaye et de souris (RUBIO, 1954 ; BUDZKO et al., 1975).

Le sérum de patients en phase chronique de la maladie de Chagas, le sérum de souris immunisées ainsi que les gammaglobulines seules correspondantes additionnées de complément actif sont capables d'induire la lyse des formes trypomastigotes. L'absence du complément ou son activation par chauffage ou par l'utilisation d'agents tels que les facteurs isolés du sérum de cobra (FVC), les endotoxines, l'EDTA (éthylèneglycol - tétraacétate) sont capables d'empêcher la lyse. La capacité lytique du sérum est rétablie par l'addition de complément actif. Ainsi, dans le sérum humain, le complément est activé par la voie classique et par la voie alterne. Dans le sérum de souris, l'activation se déroule au moins par la voie alterne (BUDZKO et al., 1975).

Des études plus récentes avec des souches différentes de T. cruzi ont démontré pour la première fois que le sérum normal humain avec sa source de complément est capable de lyser des trypomastigotes de certaines souches isolées du sang de souris en infection aiguë ; cette lyse dépend de la présence d'anticorps liés à la surface de la membrane des trypomastigotes ainsi que de la souche de T. cruzi. Les trypomastigotes de la souche Y et BERENICE sont lysés après incubation avec du complément

humain normal à 37°C, tandis que les trypomastigotes de la souche CL et GILMAR sont résistants à la lyse par du complément humain normal (KRETTLI et NUSSENZWEIG, 1977 ; KRETTLI et al., 1979). Ces résultats sont expliqués : a) par la présence d'anticorps liés à la membrane du parasite ; ceci a été montré par les techniques d'immunofluorescence et par des immunoglobulines anti-souris marquées à l'iode <sup>125</sup> ; b) par l'absence de lyse, par le complément humain, de trypomastigotes isolés de souris exposées à des irradiations léthales ; en effet, ils ne présentent pas d'immunoglobulines liées à leur membrane. Pourtant, ces parasites sont lysés par le complément humain après incubation avec du sérum de souris en phase chronique ou en phase aiguë de la maladie. c) par l'absence de lyse, par le complément humain, de trypomastigotes préalablement incubés à 37°C de façon à enlever les anticorps liés à leur surface. d) par l'absence de lyse, par le complément humain, de trypomastigotes provenant de culture in vitro de macrophages infectés.

L'activation de la voie alterne du complément est plus importante pour la lyse immune des différentes formes de T. cruzi (KRETTLI et al., 1979). La lyse est empêchée par l'épuisement du facteur B ou de la properdine du complément humain normal. Néanmoins, le fait d'observer une diminution remarquable de la lyse avec du sérum déficient en facteur C2 du complément ou en absence d'ions Ca<sup>2+</sup> suggère que cette lyse est due à la participation combinée de la voie alterne et la voie classique.

La raison pour laquelle les formes trypomastigotes de la souche CL ne sont lysées par le complément malgré la présence d'anticorps liés à leur membrane, n'est pas claire. Il est peu probable que ceci dépende de la nature des anticorps anti-CL existants ; en effet, les trypomastigotes de la souche Y recueillis de souris

irradiées mais préalablement incubés avec du sérum immun anti-CL sont lysés en présence de complément. D'autre part, les trypomastigotes de la souche CL ne sont pas fondamentalement résistants à la lyse par le complément ; elle peut être induite après incubation avec du sérum de souris chroniquement infectées. Apparemment, les parasites sont dotés d'un mécanisme d'évasion qui prévient la lyse dépendante du complément. Ce mécanisme entraînant une modulation des antigènes de la surface n'est pas clair. Il existe quelques évidences que les parasites de la souche CL éliminent plus rapidement les anticorps attachés à leur surface que les trypomastigotes de la souche Y (KRETTLI et al., 1979).

La résistance du poulet à l'infection par T. cruzi est due à l'activation de la voie alterne du complément, et le sérum de poulet injecté à des souris infectées provoque une diminution de la parasitémie (KIERSZENBAUM et al., 1976) ( p. 5 ). Ces études indiquent un rôle possible du complément dans le contrôle de la parasitémie.

- Etude in vivo

Des résultats contradictoires ont été obtenus dans les études sur le mécanisme de défense des hôtes mammifères infectés expérimentalement avec T. cruzi au sujet de la lyse immune dépendante du complément. Chez des souris infectées avec la souche Tulahuen, l'épuisement du complément avec le facteur isolé du venin de cobra (FVC, qui épuise le facteur C3 du complément) entraîne une remarquable exacerbation de la maladie, montrant une augmentation significative de la parasitémie et des mortalités prématurées en comparaison avec des souris témoins non traitées. Ceci suggère que le contrôle de la parasitémie est dû à la lyse in vivo des trypomastigotes sanguicoles (BUDZKO et al., 1975)

Cependant, KRETTLI (1978) démontre que les courbes de parasitémie et la mortalité chez la souris déficiente en C5 sont similaires à celles obtenues chez la souris ayant des taux normaux en C5. Ceci signifie que la lyse immune ne joue aucun rôle remarquable dans le contrôle de l'infection. Récemment, des résultats similaires ont été publiés par DALMASO et JARVIN (1980) ; la parasitémie de souris génétiquement déficientes en C5 est similaire ou même plus basse que chez des souris avec des taux normaux de complément ; il n'y a pas de différence dans les pourcentages de mortalité et les taux de C3 ne sont pas affectés. Ces mêmes auteurs remarquent qu'il n'y a pas de différences au cours de l'infection entre un cobaye génétiquement déficient en C4 et le témoin. La persistance d'infections sous-patentes et le pourcentage de mortalité suggèrent que la voie classique joue un faible rôle protecteur. D'ailleurs, la voie alterne reste fonctionnelle chez le cobaye déficient en C4, ainsi ces résultats n'écartent pas le rôle de la voie alterne dans la protection contre T. cruzi. Ces différences peuvent être dues au facteur C3 jouant comme un agent opsonisant en augmentant l'englobement et la destruction des parasites par le macrophage. Si ce fait se confirme, le cours de l'infection pourrait être influencé uniquement par l'épuisement du facteur C3 et non par défaut de facteur C5.

La susceptibilité des trypanomastigotes à la lyse immune du complément peut être liée aux caractéristiques signalées précédemment chez les différentes formes de trypanomastigotes des souches types de T. cruzi (morphologie, comportement de la souche lors des infections expérimentales).

### 1.3.2. Immunité à médiation cellulaire

#### - Manifestations de l'hypersensibilité retardée *in vivo*

Les manifestations de l'hypersensibilité retardée déclenchées par l'introduction de l'antigène T. cruzi, ont été étudiées chez l'homme atteint de maladie de Chagas, ainsi que chez des animaux expérimentalement infectés par T. cruzi.

Dans la maladie de Chagas, la réaction inflammatoire localisée au point d'infection (signe de Romana ou complexe-optalmo-ganglionnaires chagome ou chancre cutané) est caractérisée par l'infiltration des lymphocytes et par des lésions granulomateuses. D'ailleurs, les lésions histopathologiques trouvées chez les malades chagasiques ressemblent à celles décrites pour d'autres infections à tendance chronique donnant naissance à une hypersensibilité retardée (tuberculose, syphilis, rhumatisme articulaire aigu) (TEIXEIRA, 1979).

Malgré ces observations, il existe des différences importantes dans les résultats des tests cutanés ; ceci est probablement dû à la diversité des antigènes utilisés : homogénats de formes de culture, fractions subcellulaires, extraits de cellules infectées in vitro. Les réactions cutanées avec les antigènes préparés à partir des formes de culture de T. cruzi se sont révélées négatives chez l'homme (PESSOA et CARDOSO, 1942 ; MUNIZ et FREITAS, 1944) et chez le chien (PELLEGRINO, 1946) en phase aiguë et en phase chronique de la maladie. Cependant, des réactions cutanées positives de type retardé ont été décrites par AMATO NETO et al. (1964) chez des patients en phase chronique en utilisant une fraction soluble extraite de cellules infectées ou des trypomastigotes obtenus de culture de tissu. Une fraction insoluble préparée à partir d'une suspension de formes épimastigotes de culture détruites par

pression, donne une réaction positive chez le cobaye infecté (GONZALEZ-CAPPA et al., 1968). Chez un singe Rhésus immunisé et chez deux singes Rhésus infectés depuis trois mois, SEAH et al. (1974) observent une réaction cutanée positive de type retardé en utilisant un antigène issu de formes épimastigotes de culture. TEIXEIRA et SANTOS-BUCH (1975) étudient la réponse cutanée chez des lapins immunisés et chez des lapins en phase chronique vis-à-vis d'un homogénat et de différentes fractions préparées à partir de trypanomastigotes de culture de tissu. Les auteurs détectent des réactions de type immédiat et retardé, soit en utilisant l'homogénat, soit en utilisant les différentes fractions ; néanmoins, les antigènes particuliers provoquent des réactions de type retardé plus fortes que les réactions de type immédiat. ZELEDON et PONCE (1974) en essayant de mettre au point un test de diagnostic en utilisant des formes de culture soumises à des décongélations répétées suivies de recongélations à -70°C montrent que la fraction soluble donne une réaction positive de type immédiat en 10 à 15 min chez des patients en phase chronique, alors que l'antigène insoluble induit une faible réaction de type retardé, ce qui ne permet pas son utilisation pour le diagnostic. Chez les souris, la réponse cutanée d'hypersensibilité peut être augmentée en utilisant du Mycobacterium bovis, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), du Cyclophosphamide ou les deux, avant l'immunisation par T. cruzi (ABRAHAMSOHN et al., 1981).

#### - Manifestations de l'hypersensibilité retardée in vitro

Les tests d'hypersensibilité in vitro mettent en évidence l'existence d'une immunité à médiation cellulaire mais ne prouvent pas sa participation dans la résistance à l'infection vis-à-vis de T. cruzi. Cependant, il est évident qu'il existe une étroite

corrélation entre les résultats des tests in vitro et les mécanismes immuns de défense.

a. migration des macrophages et des lymphocytes

SEAH (1970) observe une inhibition remarquable de la migration des macrophages lorsque des cellules d'exsudat péritonéal de souris immune sont incubées avec l'antigène T. cruzi. YANOVSKY et ALBADO (1972) et LECHUCK et al. (1974) observent que la migration leucocytaire chez les patients souffrants de maladie de Chagas est inhibée vis-à-vis des antigènes spécifiques. Une corrélation intéressante fut trouvée entre le degré d'inhibition de la migration des cellules mononucléaires du sang et la nature de la fraction subcellulaire utilisée pour immuniser les lapins (TEIXEIRA et SANTOS BUCH, 1975). Le test de migration des leucocytes de sujets en phase chronique ou en phase indéterminée de la maladie fut étudié en utilisant comme antigène un extrait de formes de culture de T. cruzi ou un extrait de coeur normal de rat. Les résultats établissent que les leucocytes des patients en phase chronique de la maladie réagissent remarquablement avec les deux antigènes, tandis que la plupart des leucocytes des patients en phase indéterminée ne réagissent pas avec les antigènes de coeur et seulement 5 des 14 patients en phase indéterminée réagissent avec l'antigène T. cruzi. Ceci suggère que les malades en phase indéterminée peuvent développer la phase chronique de la maladie (TOLEDO BARROS et al., 1979).

b. Transformation lymphoblastique

En considérant que la transformation blastique des leucocytes sous l'influence de divers stimulants spécifiques représente une

évidence d'immunité à médiation cellulaire, TSCHUDI et al. (1972) étudient la transformation des lymphocytes obtenus du sang périphérique de patients en phase chronique en utilisant un antigène préparé à partir de la forme épimastigote de T. cruzi ; cinq à 30 % des lymphocytes se transforment en présence de l'antigène spécifique. Des résultats intéressants furent obtenus par TEIXEIRA et SANTOS-BUCH (1975). Ils montrent que l'incubation des lymphocytes d'un animal en phase chronique avec la forme trypomastigote de T. cruzi provoque une diminution des parasites et une transformation blastique. Ceci peut être dû à l'action cytotoxique des lymphocytes sensibilisés sur le parasite et suggère que la libération d'antigènes par le parasite est capable d'induire la transformation des lymphocytes.

#### - Transfert des cellules sensibilisées

Une autre évidence en faveur de la participation de l'immunité à médiation cellulaire dans l'infection à T. cruzi, est le transfert passif de cellules sensibilisées à des receveurs susceptibles. Le transfert de cellules lymphoïdes de la rate de rats ayant survécu à une infection aiguë par T. cruzi, entraînent une protection chez des rats receveurs (ROBERSON et HANSON, 1974). Des résultats similaires furent trouvés par SANTOS (1973) et KUHN et DURUM (1975). Les lymphocytes de la rate et des ganglions lymphatiques isolés de souris infectées, sont plus efficaces pour transférer la protection à des receveurs syngéniques que les macrophages d'exsudat péritonéal (BURGESS et HANSON, 1979).

Des études plus récentes ont essayé d'identifier le mécanisme immun impliqué dans la défense de l'hôte, en utilisant des sous-populations purifiées de cellules lymphoïdes isolées de la rate de souris immunisées. Ainsi, il a été démontré que des

souris susceptibles peuvent être protégées d'une manière plus effective avec la sous-population appauvrie en cellules T que la sous-population de cellules T elle-même (TRISCHMANN, 1980). D'autre part, REED (1980) démontre une protection partielle avec la population de lymphocytes de la rate de donneurs immuns ; cependant, la sous-population enrichie en lymphocytes T donne une protection remarquablement plus effective que la sous-population enrichie avec les lymphocytes B. Au contraire, SCOTT (1979) démontre que l'immunité dépend des cellules B et que les cellules T jouent le rôle de cellules auxiliaires.

#### - Déficits lymphocytaires

Des états de déficit immunitaire induits expérimentalement chez l'hôte, provoquent une augmentation de la sévérité de l'infection à T. cruzi. La thymectomie néonatale chez la souris (BEHBEHANI, 1971 ; SCHMUNIS et al., 1971) et même chez le rat (ROBERSON et al., 1973) ainsi que l'administration de sérum anti-thymocyte, inhibent le développement de l'immunité acquise. La thymectomie néonatale de la souris ou du rat provoque une augmentation du nombre de parasites et aussi la mort des animaux par rapport à des témoins n'ayant subi que le stress opératoire (ROBERSON et al., 1973). Pourtant, la production des anticorps n'est pas affectée ; ainsi le sérum des rats thymectomisés transmet la protection à des receveurs vis-à-vis de l'épreuve d'infection (ROBERSON et al., 1973). D'autre part, SCHMUNIS et al. (1971) observent que la production des anticorps est retardée chez les souris thymectomisées. Le sérum anti-thymocyte administré à des souris en phase aiguë, entraîne des parasitémies nettement plus élevées et augmente le nombre d'amastigotes dans les muscles cardiaques, par rapport aux contrôles n'ayant reçu que du sérum normal. Mais l'administration

de sérum anti-thymocyte à des souris ayant survécu à une phase aiguë, n'est pas capable d'induire à nouveau une parasitémie, seules des parasitémies sous-patentes sont observées (ROBERSON et al., 1973).

Un autre modèle expérimental de carence en cellules T utilisé pour ce genre d'études est la souris NUDE, qui présente une agénésie congénitale du thymus. KIERSZENBAUM et PIENKOWSKI (1979) dans le même modèle démontrent que la souris homozygote athymique congénitale (nu/nu) est plus susceptible à l'infection à T. cruzi que la souris hétérozygote avec thymus (nu/+). En plus, la transplantation néonatale de thymus chez les souris athymiques, rétablit les niveaux normaux de résistance à T. cruzi.

Ces évidences démontrent la participation de l'immunité à médiation cellulaire chez les animaux expérimentaux et chez l'homme infectés par T. cruzi.

#### 1.4. ESSAIS DE PROTECTION CONTRE T. CRUZI

Il est certain qu'une infection primaire chez des animaux induit une immunité remarquable contre la phase aiguë de la maladie de Chagas. Ces observations suggèrent la possibilité du développement de méthodes d'immunoprophylaxie contre l'infection à T. cruzi.

L'immunisation active a été réalisée avec des parasites vivants atténués, des parasites morts et avec des fractions cellulaires. Tous les animaux ainsi immunisés survivent habituellement à l'infection d'épreuve. MENEZES (1969, 1971) immunise des hôtes vertébrés avec des formes de culture d'une souche non virulence de T. cruzi ; il observe une protection partielle après épreuve avec des formes virulentes sanguicoles. FERNANDEZ et al. (1965, 1966)

montrent que les formes de culture traitées avec de l'actinomycine D gardent leur mobilité, mais leur multiplication et leur différenciation sont inhibées d'une manière irréversible. Les parasites ainsi traités ne sont pas capables d'infecter des souris et donnent seulement une protection partielle contre une épreuve virulente. Les formes de T. cruzi provenant de culture de tissu après irradiation ne sont pas capables d'infecter ni des cultures cellulaires ni des souris. Ces parasites induisent aussi une protection partielle seulement lorsqu'ils sont inoculés régulièrement chaque semaine (HANSON, 1977).

Des vaccins ont été préparés à partir de formes épimastigotes détruites par des méthodes chimiques en utilisant le merthiolate (MUNIZ et al., 1946), le formol ou le phénol (HAUSCHKA et al., 1950) ou une solution de perchlorite de sodium (KIERSZENBAUM et BUDZKO, 1975). Mais les résultats ne donnent pas une protection totale. De meilleurs résultats sont obtenus avec des vaccins préparés à partir de flagellés détruits par des méthodes physiques. Une augmentation remarquable du temps de survie est détectée chez des souris immunisées avec des formes de culture désintégrées par ultrasons (GOBLE, 1964). L'inoculation des formes de culture détruites par congélation-décongélation (Mc HARDY et ELPHICK, 1978) ou par ultrasons (NEAL et JOHNSON, 1977) induit une protection partielle représentée par une diminution de la parasitémie et de la mortalité.

Les trypanosomatidae monoxènes non pathogènes pour l'homme, présentent des antigènes communs avec T. cruzi, qui confèrent à la souris une certaine protection contre une souche létale. L'homogénat de Crithidia fasciculata donne une faible immunité contre T. cruzi (JOHNSON et al., 1963 ; PEREIRA et al., 1977). Pourtant des résultats plus intéressants sont obtenus avec des flagellés vivants d'Herpetomonas samuelpessoai. Une infection primaire

suscitée chez la souris par ce trypanosomatidae monoxène, lui confère une protection partielle contre T. cruzi (SOUZA et al., 1974).

L'existence probable d'une réaction antigénique croisée entre certains composants de T. cruzi et les cellules de tissus du coeur tend à développer des essais de fractionnement sub-cellulaire du parasite ; fractions pouvant protéger le vertébré sans donner lieu à un effet autoimmun. SEGURA et al. (1977) comparent la capacité de protection de deux fractions extraites des formes de culture de T. cruzi et démontrent que la fraction flagellaire produit une résistance plus importante chez les souris après épreuve avec des formes virulentes, par rapport à la fraction membranaire. KANEDA (1973) démontre que le pouvoir d'immunisation des homogénats des formes de culture est en relation avec la fraction ribosomale obtenue par centrifugation à 150.000 g. D'autre part, SCOTT et SNARY (1979), isolent une glycoprotéine de la surface cellulaire de T. cruzi. L'utilisation de la saponine ou de l'adjuvant complet de Freund, entraîne avec cette glycoprotéine une protection contre l'infection aiguë chez la souris ; en plus, il semble que cette glycoprotéine ne suscite pas la formation d'autoanticorps. Une fraction polyribosomale isolée des formes épimastigotes de la souche Y, induit une faible réponse anticorps mais, avec une réponse cellulaire. Cette fraction a aussi la capacité d'induire un haut degré de protection contre T. cruzi (LEON et al., 1980).

## CHAPITRE 2 : MATERIEL et METHODES

-----

### 2.1. MODELE ANIMAL

Le modèle rat a été employé pour les essais de protection contre l'infection par T. cruzi et pour les études sur les mécanismes de cette résistance.

Trois sortes de rats ont été utilisées :

- Des rats Fischer (F344) consanguins mâles de 150 à 180 g et femelles de 100 à 120 g provenant du Centre d'Elevage IFFA-Crédo L'ARBRESLE, France ;
- Des rats Fischer (F344) consanguins mâles et femelles nouveaux-nés, traités avec du sérum de lapin anti- $\mu$  afin de supprimer la synthèse des immunoglobulines ; les rats contrôles ont été traités avec du sérum normal de lapin ; tous ces rats ont été entretenus dans un isolateur plastique stérile (LA CALHENE, Paris) avant et après leur naissance ;
- Des rats nu/nu femelles âgés de 2 mois et leurs hétérozygotes nu/+ provenant du PROEFDIEREN-CENTRUM, Louvain (Belgique), entretenus dans un isolateur plastique stérile. Le rat mutant "NUDE" présente une agénésie congénitale du thymus.

### 2.2. ENTRETIEN DES DIFFERENTES FORMES DE LA SOUCHE TEHUANTEPEC DE T. CRUZI

La souche Tehuantepec de T. cruzi provient du vecteur Triatoma sp. Elle a été isolée au Mexique par E. BRUMPT (1938). Cette souche est entretenue dans notre laboratoire, sous les formes suivantes :

- Forme épimastigote de culture à 28°C. Elle est entretenue par deux repiquages hebdomadaires sur le milieu GLSH, contenant du glucose, de la lactalbumine hydrolysée, de l'extrait d'hémoglobine de boeuf et 10 % de sérum de veau ;
- Forme trypomastigote de culture à 37°. Cette forme se développe sur monocouche de fibroblastes de rat Fischer (3T3FR) avec du milieu de culture MEM contenant 5 % de sérum de veau foetal (SVF). Des formes trypomastigotes sanguicoles de rats Fischer mâles sont inoculés à des monocouches de fibroblastes; après 4 à 5 jours de culture à 37°C apparaissent dans le surnageant des formes trypomastigotes. L'entretien se fait deux fois par semaine sur cellules fibroblastiques non infectées ;
- Forme trypomastigote sanguicole. La forme sanguicole de T. cruzi est entretenue et stabilisée par passages tous les 28 à 30 jours chez le rat Fischer mâle. Les trypomastigotes sont obtenus par ponction rétro-orbitale chez des rats Fischer mâles. Le sang est prélevé sur anticoagulant (Héparine à la dose de 80 UI/ml) et dilué avec une solution d'Alsever. Un ml de cette solution contenant  $15.10^4$  trypomastigotes est inoculé aux rats par voie intrapéritonéale.

### 2.3. METHODE DE COMPTAGE DES PARASITES

#### - Formes de culture à 28°C et 37°C

Les formes épimastigotes de culture à 28°C et les formes trypomastigotes de culture à 37°C ont été évaluées par comptage à la cellule de THOMA.

- Formes sanguicoles

Les formes trypanomastigotes sanguicoles sont comptées par la méthode de PIZZI (1957) et BRENER (1961, 1962). En routine, 5 µl de sang prélevé à la queue du rat (après avoir éliminé la première goutte), sont placés directement entre lame et lamelle (22 mm x 22 mm). Mais, chez les animaux entretenus dans des conditions stériles (isolateur plastique), le sang est prélevé par ponction rétro-orbitale à l'aide d'un microcapillaire hépariné, puis 5 µl de ce prélèvement est placé entre lame et lamelle.

Le comptage s'effectue à l'objectif 40 du microscope en observant à frais les trypanomastigotes d'au moins 60 champs par examen. Les résultats sont exprimés en trypanomastigotes par millimètre cubique (mm<sup>3</sup>) de sang.

2.4. TYPAGE DE LA SOUCHE TEHUANTEPEC DE T. CRUZI

- Isolément des trypanomastigotes de rat

Les trypanomastigotes sont obtenus par ponction au niveau du sinus rétro-orbital de rats en phase aiguë de la maladie. Le sang est prélevé sur tube contenant des billes de verre, ensuite il est défibriné et centrifugé pendant 10 min à 100 g à température ambiante. Les trypanomastigotes se trouvent alors dans le surnageant, qui est centrifugé à 1000 g pendant 15 min. La couche inférieure est lavée trois fois avec du milieu MEM-SVF (1000 g - 15 min). Les parasites sont comptés dans la cellule de THOMA et la suspension ajustée à  $10 \cdot 10^6$  trypanomastigotes par ml.

### - Lyse des trypomastigotes sanguicoles

Un aliquot de 50 µl de sérum normal humain, comme source de complément (CHu) et une dilution au 1/2 de CHu sont ajoutées à deux tubes contenant 50 µl de la suspension de parasites ( $10 \cdot 10^6$  trypomastigotes par ml de milieu MEM). Pour les tubes contrôles on utilise le sérum humain décomplémenté à 56°C pendant 30 min (HuI) à la place du CHu.

Les tubes sont incubés pendant une heure à 37°C. Après l'incubation, les tubes sont placés dans la glace et les trypomastigotes sont comptés à l'aide de la cellule de THOMA ; chaque comptage se fait deux fois. Le pourcentage de lyse est calculé selon l'équation :

$$\% \text{ lyse} = 100 - \frac{A}{B} \times 100$$

A = nombre de parasites après l'incubation avec du sérum humain normal, comme source de complément (CHu)

B = nombre de parasites après l'incubation avec du sérum humain normal décomplémenté (HuI)

## 2.5. ESSAIS DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION PAR T. CRUZI CHEZ DES RATS FISCHER MALES

### 2.5.1. Protection active avec des formes épimastigotes

Nos travaux préliminaires (RODRIGUEZ, 1980) avaient montré que le rat Fischer (F344) mâle peut être protégé contre l'infection aiguë de la maladie. La protection a été induite de façon active par l'inoculation intrapéritonéale de formes épimastigotes de

culture à 28°C, l'infection d'épreuve se faisant aussi par voie intrapéritonéale avec une dose moyenne létale de trypomastigotes sanguicoles. Néanmoins, il était nécessaire de confirmer cette observation par une série plus importante et une étude immunologique humorale de cette résistance.

#### - Schéma de protection

Le schéma suivi pour la protection est celui déjà établi dans la première expérience (RODRIGUEZ, 1980) (Tableau IIIA - p. 51).

Un groupe de 21 rats Fischer mâles reçoit par voie intrapéritonéale 1 ml de solution tamponnée de Hanks-Wallace contenant  $6.10^6$  épimastigotes ayant 6 jours de culture. Quinze jours après cette première inoculation, le groupe reçoit une dose d'épimastigotes dans les mêmes conditions.

Le groupe témoin formé par 6 rats reçoit à un intervalle de 15 jours, 2 injections de 1 ml de solution de Hanks Wallace tamponnée.

L'infection d'épreuve par  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles est réalisée par voie intrapéritonéale 50 jours après la première inoculation d'immunisation ou d'injection contrôle.

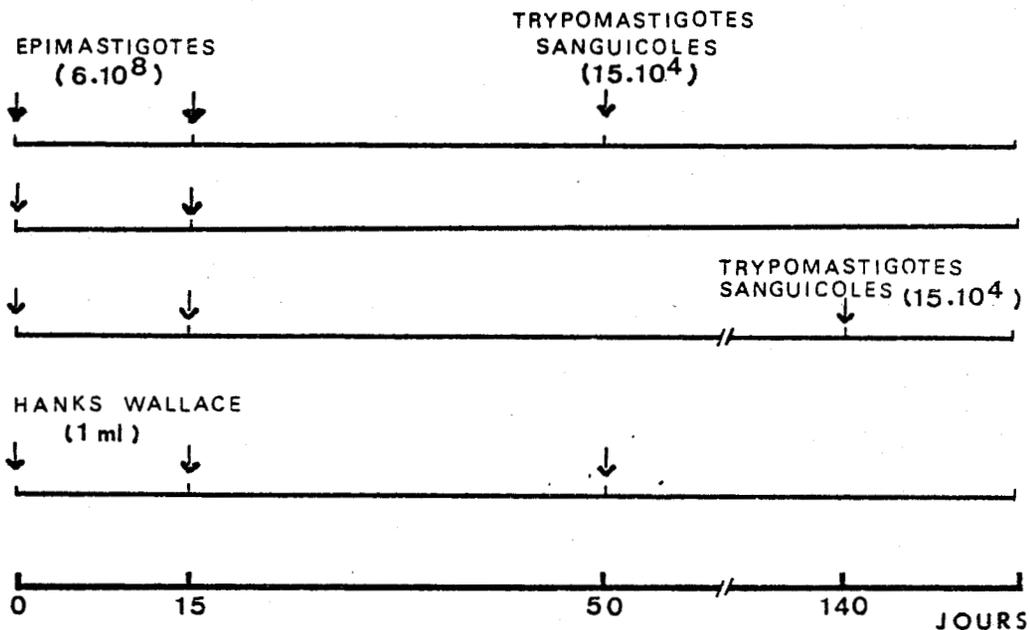
Deux autres groupes formés chacun de 5 rats sont protégés avec des épimastigotes de six jours de culture dans les mêmes conditions que précédemment : les rats d'un des deux groupes sont réinfectés avec des trypomastigotes au 140ème jour après la première inoculation tandis que l'autre groupe ne reçoit pas l'infection d'épreuve.

#### - Prélèvements sanguins

Les rats subissent une légère anesthésie à l'éther. Les prélèvements sanguins au niveau du sinus rétro-orbitale sont faits tous les 15 jours. Le sérum recueilli individuellement est utilisé

TABLEAU III ESSAIS DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION PAR T. cruzi  
CHEZ DES RATS FISCHER MALES

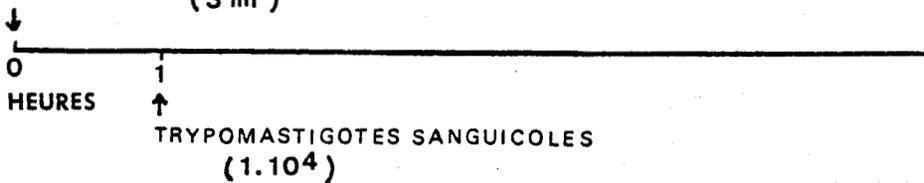
A PROTECTION ACTIVE



B PROTECTION PASSIVE

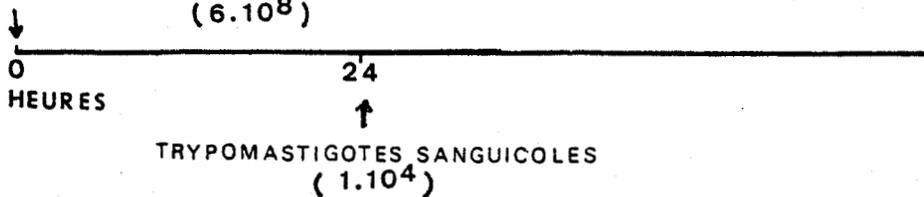
a - d'anticorps

SERUM IMMUN OU SERUM NORMAL  
(3 ml)



b - de cellules

PERITONEALES OU DE LA RATE  
( $6 \cdot 10^8$ )



pour étudier l'évolution des IgM, des IgG2a, des anticorps hémagglutinants et des anticorps lytiques. La parasitémie est contrôlée chaque semaine en utilisant du sang prélevé à la queue.

### 2.5.2. Transfert passif d'anticorps

Le sérum des rats immunisés avec des épimastigotes de culture est prélevé au 126ème jour après la première immunisation. Un pool de sérum immun a été utilisé pour le transfert.

Trois ml de sérum immun inactivé (56°C pendant 30 min) sont injectés par voie intraveineuse à des rats Fischer mâles. Une heure plus tard,  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles sont inoculés par voie intrapéritonéale (Tableau III Ba - p. 51 ).

Un groupe contrôle reçoit en même temps une quantité égale de sérum normal inactivé de rats sains une heure avant l'infection.

La parasitémie est contrôlée toutes les semaines par la méthode de routine dès le 14ème jour après l'infection.

La mortalité est surveillée régulièrement.

### 2.5.3. Transfert passif de cellules sensibilisées

Les cellules utilisées pour le transfert sont obtenues au 45ème jour de rats Fischer infectés avec  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles (Tableau III Bc - p. 51 ).

#### - Récupération des cellules de la rate

La rate est prélevée stérilement et dilacérée au moyen de pinces courbes dans du milieu MEM-SVF ; le filtrat obtenu par passage à travers de la gaze est centrifugé pendant 10 minutes à 2000 g. Les cellules sont numérotées dans une cellule de THOMA. La suspension est ajustée à une concentration de  $6.10^8$  cellules totales/ml.

- Récupération des cellules péritonéales

Les cellules sont obtenues par lavage de la cavité péritonéale de rats immuns avec 20 ml de milieu MEM-SVF contenant 25 IU par ml d'héparinate de Calcium. Les cellules péritonéales sont centrifugées à 2000 g et lavées deux fois dans le milieu MEM. La suspension est ajustée à une concentration de  $6.10^8$  cellules/ml.

- Transfert de cellules sensibilisées

Deux groupes formés chacun par six rats reçoivent par voie intrapéritonéale 2 ml de milieu MEM contenant  $6.10^8$  cellules de rate et  $6.10^8$  cellules péritonéales respectivement. Vingt quatre heures plus tard,  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles sont injectés par voie intrapéritonéale.

2.6. UTILISATION DE RATS DEFICIENTS EN LYMPHOCYTES B OU T

- Sérum anti- $\mu$  de lapin

Le sérum anti- $\mu$  (aimablement fourni par le Dr. H. BAZIN), fut préparé par l'immunisation de deux lapins avec des IgM monoclonales purifiées de rat (PROTEINE IR 202) (BAZIN et al., 1974) additionné d'adjuvant complet de Freund. Les protéines de myélome furent isolées du liquide d'ascite par filtration en gel sur Ac A22 et Ac A34 (IBF, France), puis soumises à une chromatographie d'échange ionique sur DEAE cellulose et à une électrophorèse de zone en gel d'agarose. La spécificité fut obtenue après absorption par du sérum de rats dépourvus de germes pathogènes et la fraction pseudoglobulinique de sérum normal de rat. Les antisérums et le sérum normal de lapin (SNL) furent absorbés avec des cellules du foie et du rein. Ce sérum anti- $\mu$  ne présente pas d'affinité pour les cellules thymiques :

de rat ; en effet, les tests d'immunofluorescence indirecte effectués avec ce sérum anti- $\mu$  vis-à-vis de cellules thymiques de rat se sont révélés négatifs. Finalement l'antisérum est dialysé contre du tampon phosphate (PBS) et stérilisé par filtration sur filtre MILLIPORE (porosité 0,22  $\mu$ ).

- Traitement par du sérum anti- $\mu$  des rats nouveaux-nés

Les rats Fischer utilisés dans cette expérience furent divisés en deux groupes (Tableau IV A - p. 55 ).

Le premier groupe formé par 6 rats femelles et deux rats mâles reçoit tous les jours par voie intrapéritonéale, 0,2 ml d'antisérum anti- $\mu$  du jour zéro au 12ème jour après la naissance. Ensuite, entre le 12ème jour et le 60ème jour, les rats reçoivent une injection de 0,3 ml d'anti- $\mu$  trois fois par semaine.

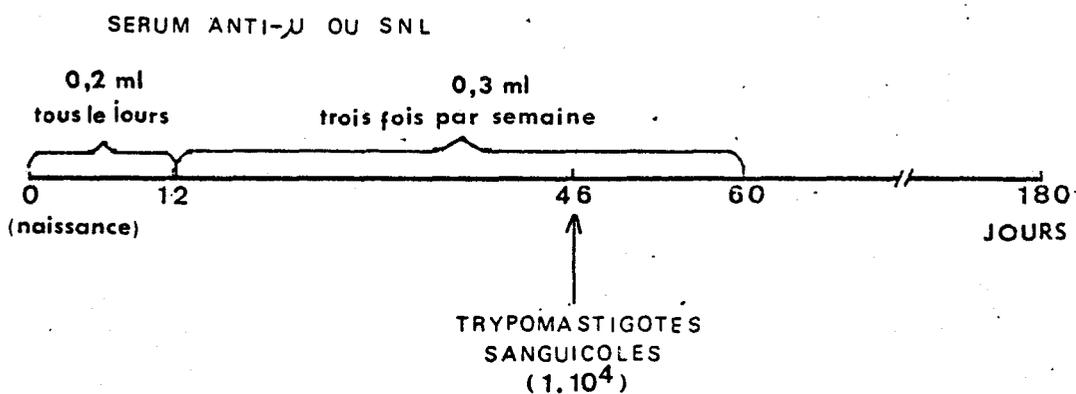
Le second groupe formé par 5 rats femelles et 4 rats mâles sont traités de la même façon que le groupe précédent, mais dans ce cas, on utilise du sérum normal de lapin (SNL) au lieu de sérum anti- $\mu$ .

- Infection par *T. cruzi*

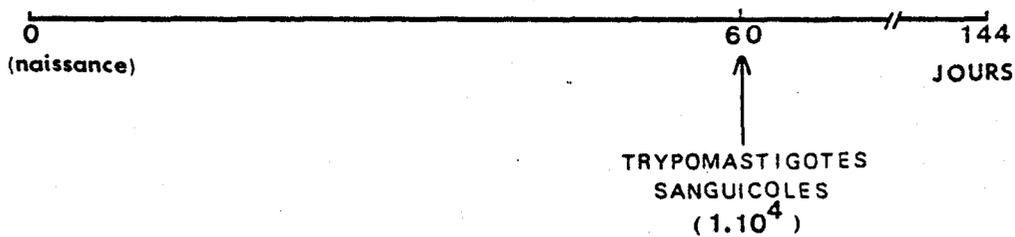
Les formes trypomastigotes sont prélevées par ponction cardiaque chez des rats au 28ème jour d'infection. Le sang mélangé à de l'héparine est dilué dans une solution d'Alsever afin d'obtenir une solution contenant  $1.10^4$  trypomastigotes par ml. Ces trypomastigotes sont injectés au groupe de rats déficients en lymphocytes B et au groupe contrôle par voie intrapéritonéale 46 jours après leur naissance.

Les rats "NUDE" reçoivent également 1 ml d'une solution d'Alsever contenant  $1.10^4$  trypomastigotes (Tableau IV B - p. 55 ).

TABLEAU IV A TRAITEMENT AVEC DU SERUM ANTI- $\mu$ , DU SNL  
ET INFECTION PAR T.cruzi CHEZ DES RATS  
NOUVEAUX-NES



B INFECTION PAR T.cruzi CHEZ DES  
RATS 'NUDE'



- Prélèvements sanguins

Les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  ou du SNL et les rats nu/nu et nu/+ sont saignés dans l'enceinte même de l'isolateur après une légère anesthésie à l'imalgène 1000 (0,01 ml par voie intramusculaire). Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau du sinus rétro-orbitale toutes les semaines afin de déterminer la parasitémie et tous les deux semaines pour les études immunologiques humorales.

2.7. PARAMETRES DE L'IMMUNITE HUMORALE

- Dosage d'IgM et IgG2a

Les concentrations d'IgM et IgG2a furent déterminées par la technique d'immunodiffusion radiale simple (MANCINI, 1965). Cette technique est couramment utilisée en routine pour le dosage des immunoglobulines et du complément.

La technique consiste à préparer une plaque d'agar dans laquelle un antiserum monospécifique a été préalablement incorporé. La solution antigénique est déposée dans un puits creusé dans le gel. L'antigène diffuse dans l'agar et donne lieu à la formation d'un halo de précipitation dont le diamètre extérieur est en relation directe avec la concentration en antigène de la solution.

Si différentes solutions antigéniques de concentrations connues sont utilisées, on obtient une courbe de référence qui exprime la surface du précipité (en ordonnée) en fonction de la concentration d'antigène correspondant (en abscisse). Cette courbe permet de calculer la concentration en antigène d'un échantillon non connu.

L'antisérum est obtenu selon la méthode de BAZIN et al. (1974) ( p. 53 ). Les standards d'IgM et IgG2a sont des protéines monoclonales LOU/C purifiées ; ces protéines ne sont pas celles utilisées pour la préparation d'antisérum anti- $\mu$ .

- Réaction d'immunodiffusion

3 g d'agar sont ajoutés à 100 ml d'une solution tamponnée de barbiturate de sodium à pH 8.6 et portés à ébullition dans un bain-marie jusqu'à dissolution de l'agar, puis placés à 60°C au bain-marie.

Pour la détermination des IgM : 0,02 ml d'antisérum anti- $\mu$  sont ajoutés à 3 ml de gélose. Pour la détermination des IgG2a : 0,2 ml d'antisérum anti-IgG2a sont ajoutés à 3 ml de gélose. Ce mélange est ensuite coulé sur lame de verre. 10  $\mu$ l des différentes solutions des sérums à tester diluées au 1/2, 1/5, 1/10 et 1/20 et 1/30 pour la détermination des IgM et des IgG2a respectivement, sont déposés par puits préalablement creusés dans le gel. Les plaques sont laissées à température ambiante pendant 48 heures avant lecture.

- Dosage de l'activité du complément

Les niveaux de C4 et les niveaux des composants de la voie alterne du complément furent déterminés par la technique de LACHMANN et HOBART (1978). Cette technique a été mise au point sur gel comme une technique d'immunodiffusion radiale simple. On incorpore des globules rouges et un réactif approprié à la gélose. On dépose une quantité fixe du sérum à tester dans un puits creusé dans le gel. La mesure de la concentration est donnée en fonction du diamètre du halo d'hémolyses après diffusion des composants dans l'agarose. Les résultats sont exprimés en pourcentage de consommation du C4

et de la voie alterne du complément par rapport aux niveaux respectifs obtenus dans des sérums normaux.

Les niveaux de C4 furent déterminés par la diffusion de 8  $\mu$ l de sérum non dilué dans l'agarose dans laquelle on a incorporé préalablement des érythrocytes de mouton et du sérum de cobaye déficient en C4 (animal entretenu à l'Institut Pasteur) dans un diluant "Fixation complement" (Oxoid, Ltd, London).

Pour la détermination de l'activité de la voie alterne du complément, on incorpore préalablement à l'agarose des érythrocytes non sensibilisés de cobaye dans un diluant contenant 10 mM d'acide éthylène glycol-Bis ( $\beta$ -Aminoethyl éther-N-N-Tetraacétique) et 7 mM de magnesium. Ce diluant permet l'activation de la voie alterne aboutissant à la lyse de érythrocytes de cobaye.

#### - Détermination des niveaux de la voie alterne (VA)

La gélose se prépare en dissolvant 2 g d'agar-agar purifié (FLUKA) dans 100 ml d'eau déminéralisée. Le mélange est porté à 85°C dans un bain-marie, en homogénéisant de temps en temps, puis placé à 45°C on ajoute 1,5 ml d'une solution de DEAE Dextran (à 10 mg/ml d'eau).

Dans un petit bécher, on mélange 5 ml de gélose, 5 ml d'une solution tamponnée d'EGTA et  $Mg^{2+}$  (à pH 6,5), puis on ajoute des hématies de cobaye à 10 % en PBS. Ce mélange est ensuite coulé sur lames de verre dégraissées. Les sérums à tester sont déposés dans les puits préalablement creusés dans le gel. On laisse une nuit à 4°C. Le lendemain, les lames sont placées à 37°C pendant 1 à 2 heures avant d'effectuer la lecture au planimètre.

- Détermination des niveaux de C4

Les globules rouges de mouton à la concentration de 10 % en solution tamponnée de véronal à pH 7,2 (préparée à partir des comprimés "Fixation Complement", CFT, qui contient les ions  $Mg^{2+}$  et les ions  $Ca^{2+}$ ) sont sensibilisés avec du sérum hémolytique décomplémenté (antisérum anti-érythrocytes de mouton) préalablement dilué en CFT pour obtenir une dose minimale d'hémolyse.

La gélose préparée de la même façon que pour la détermination de la VA est mélangée avec du sérum de cobaye déficient en C4 + CFT concentré deux fois, puis on ajoute des hématies sensibilisées à 10 % et on coule sur lame. La suite de la technique est identique à celle décrite pour la détermination de la voie alterne.

- Dosage par hémagglutination des anticorps anti-T. cruzi

La réaction d'hémagglutination utilisée en sérologie est une technique semi-quantitative ; elle a comme principe de mettre en présence des dilutions variables d'antisérum avec une concentration donnée d'hématies recouvertes d'antigène soluble ; rendant ainsi visible le phénomène spécifique de liaison antigène-anticorps.

La méthodologie consiste à traiter les hématies par la glutaraldéhyde ce qui les rend capables de réagir spontanément avec des antigènes solubles. Puis, ces globules rouges sensibilisés sont ajoutés à différentes dilution d'antisérum. Le titre d'hémagglutination est défini comme la plus forte dilution donnant une agglutination.

- Titrage de l'antigène

L'extrait antigénique hydrosoluble de T. cruzi a été obtenu à partir de suspensions de formes épimastigotes dans du NaCl 1°/∞ après congélation à - 20°C et broyages successifs 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 contre de l'eau distillée (100 volumes d'eau distillée pour un volume de la solution à dialyser) et ensuite, la fraction hydrosoluble a été lyophilisée (AFCHAIN, 1976).

A partir de 40 mg de cet extrait antigénique hydrosoluble ont été effectuées des dilutions variables du 1/25ème au 1/1600ème en tampon glycolle sous un volume de 0,5 ml. Chacune des dilutions a été utilisée pour sensibiliser les globules rouges de mouton formolés à 2.5 %.

Le titrage de l'antigène a été réalisé par l'incubation des globules rouges sensibilisés avec des différentes dilutions des antisérums positifs et négatifs, en suivant la méthodologie de la réaction d'hémagglutination.

La dilution d'antigène choisie pour déceler les anticorps des échantillons est celle dont le titre est parfaitement comparable parmi les antisérums positifs et en plus sans réaction avec les sérums négatifs.

#### - Préparation et sensibilisation des hématies

Les globules rouges de mouton (Difco) sont lavés cinq fois en tampon phosphate physiologique (PBS), à la concentration finale de 8 % en PBS et mélangés V/V avec une solution de formol à 3 %. Après une agitation de 18 heures à 37°C, ils sont centrifugés à 1500 g pendant 10 min, lavés 5 fois en tampon glycolle, puis répartis en aliquots de 2,5 ml et conservés à 4°C.

La sensibilisation des hématies est réalisée sur le culot obtenu après centrifugation d'un aliquot de 2,5 ml, en ajoutant 0,5 ml de la solution d'antigène de titre connu en tampon glycolle et 0,3 ml de glutaraldéhyde à 1 % en tampon glycolle.

- Réaction d'hémagglutination

50 µl des antisérums sont décomplémenté pendant 30 min à 56°C au bain-marie, puis s'ajoutent les hématies de mouton formolées dans le rapport 1 goutte d'antisérum décomplément par 1 goutte d'hématie 50 % afin d'éliminer les agglutinines naturelles de ces sérums. Après les avoir laissés 30 min en contact à la température du laboratoire, ils sont centrifugés à 2500 g pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et dilué dans 1 ml de tampon glycocolle contenant de l'albumine humaine à 0,2 %.

Les dilutions ont été faites de 1/2 en 1/2 sous un volume de 50 µl à partir de la dilution initiale 1/40 dans les alvéoles en U d'une plaque de microtitration (Microtitter system). Une goutte d'hématies sensibilisées est ajoutée à chaque alvéole contenant les dilutions de sérum à tester. La lecture est effectuée après 3 heures de contact à 4°C. L'absence d'hémagglutination spontanée est vérifiée en ajoutant une goutte d'hématies non sensibilisées au sérum dilué au 1/2.

- Dosage des anticorps lytiques anti-T. cruzi

Les anticorps lytiques ont été décrit récemment pour détecter la phase chronique de l'infection (KRETTLI, communication personnelle). Le principe de la technique est de mettre en évidence des anticorps lytiques, présents dans des sérums spécifiques, préalablement fixés sur la surface des trypanostigotes de culture ou des trypanostigotes d'animaux irradiés.

La méthodologie consiste à fixer sur les trypanostigotes des anticorps de sérums spécifiques, ce qui les rend susceptibles d'être lysés par le complément humain.

- Réaction de trypanolyse

L'antisérum est décomplémenté pendant 30 min à 56°C, et puis à partir de la dilution initiale 1/5, on effectue les différentes dilutions de 1/2 en 1/2 sous un volume de 0,1 ml en MEM-SVF 5 %.

La suspension des trypomastigotes de culture à 37°C sur fibroblastes (3T3.FR) est diluée pour obtenir 10 à 12.10<sup>6</sup> parasites par ml de milieu. 0,1 ml de cette suspension de parasites est ajoutée à chaque tube contenant les dilutions d'antisérum à tester. Le volume final sera de 0,2 ml par tube.

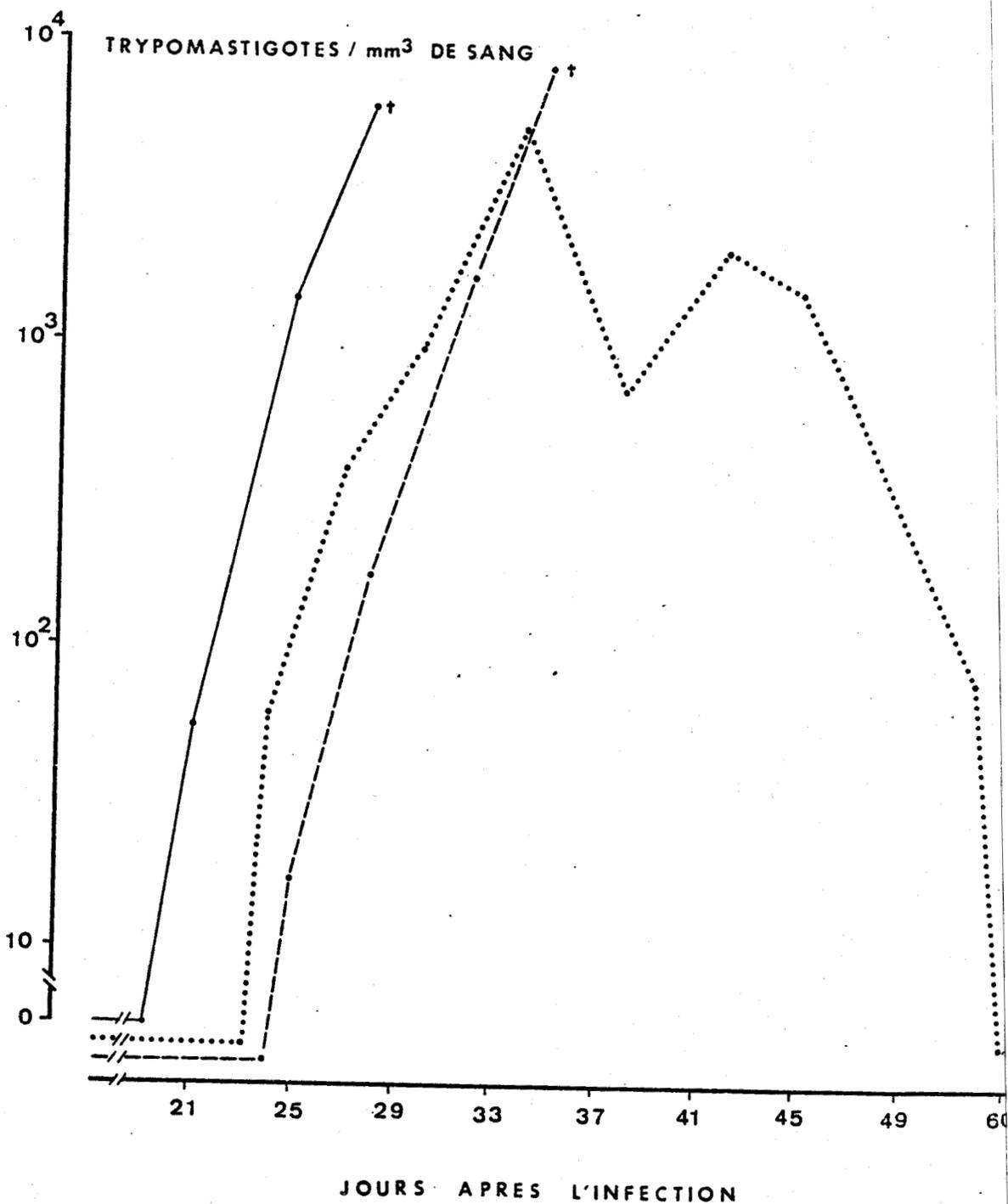
Les tubes témoins contiennent un volume égal de la suspension de parasites et 0,1 ml de sérum normal décomplémenté aux dilutions 1/5 et 1/10.

Les antisérums à tester et les contrôles contenant la suspension de parasites sont incubés pendant 30 min à 37°C au bain-marie. Ensuite, 50 µl de chacune des suspensions (trypomastigotes-antisérum, trypomastigotes-sérum normal) sont placés dans des tubes plastique contenant 50 µl de sérum normal humain, comme source de complément (CHu). Chacun de ces tubes aura son contrôle respectif contenant 50 µl de sérum normal humain décomplémenté.

Les deux séries de tubes sont incubées pendant une heure à 37°C au bain-marie. Après incubation, les tubes sont placés dans la glace.

Le pourcentage de lyse est calculé selon la technique expliquée précédemment ( p. 49 ).





**FIGURE 2 :** Parasitémie des rats Fischer mâles et femelles infectés avec des trypanosomes sanguicoles de *T. cruzi*  
Rats mâles (•—•) et rats femelles (•••••) infectés avec 15.10<sup>4</sup> trypanosomes. Rats mâles (•---•) infectés avec 1.10<sup>4</sup> trypanosomes



D'autre part, chez le rat femelle résistant à la phase aiguë de l'infection, nous avons étudié le rôle des lymphocytes B et T dans l'induction de la réponse immune contre T. cruzi, en utilisant des rats ayant une inactivation expérimentale de lymphocytes B et des rats ayant des déficits congénitaux de lymphocytes T.

### 3.2. ESSAIS DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION

#### 3.2.1. Protection active avec des formes épimastigotes

Nous avons confirmé que les rats Fischer mâle sont protégés contre la phase aiguë de l'infection lorsqu'ils reçoivent par voie intrapéritonéale  $6 \times 10^8$  épimastigotes de culture à 28°C à un intervalle de quinze jours.

Le tableau V ( ) résume les résultats obtenus dans cette nouvelle expérience et aussi ceux des études préliminaires. Vingt sur vingt et un des rats injectés avec des épimastigotes de six jours de culture survivent à l'infection d'épreuve faite au 50ème jour de l'immunisation. La protection est aussi significative chez le groupe qui reçoit l'infection d'épreuve 140 jours après la première dose immunisante (cinq sur cinq survivants).

Le temps de culture des épimastigotes semble être important pour induire une protection ; ainsi, de meilleurs résultats ont été obtenus lorsqu'on utilise des épimastigotes de 6 jours de culture plutôt que des épimastigotes de 3 jours de culture (des résultats préliminaires de protection : neuf sur douze survivants (tableau V, p.66).

#### - Parasitémie :

Les rats qui survivent ne présentent pas de parasites à l'examen direct microscopique, tandis que ceux qui succombent à l'infection d'épreuve présentent une faible parasitémie détectée vers le 35ème jour. Le groupe

**TABEAU V** : Survie et mortalité des rats Fischer mâles après l'infection d'épreuve avec une dose de  $15.10^4$  trypomastigotes (sanguicoles) de T. cruzi

Doses d'immunisation avec un intervalle de 15 jours	Temps de culture des épimastigotes (en jours)	Temps d'épreuve (jours après la protection)	Nombre de survivants <sup>(1)</sup>
Epimastigotes de culture à 28°C ( $6 \times 10^8$ parasites/ml)	3	50	9/12 (2)
	6	50	20/21
	6	140	5/5
	6	-	5/5
Milieu GLSH après 3 jours de culture (1 ml)		50	1/6 (2)
Milieu GLSH Heuf (1 ml)		50	0/6 (2)
Solution Hanks Wallace (1 ml)		50	0/6

(1) Les survivants n'ont jamais présenté de parasites à l'examen direct microscopique

(2) Résultats préliminaires



contrôle qui reçoit la solution tamponnée Hanks Wallace développe une haute parasitémie dès 21 jours après l'infection et les rats succombent. Finalement, le groupe protégé avec des épimastigotes, mais n'ayant pas reçu l'infection d'épreuve, n'a pas présenté de parasites à l'examen direct microscopique. Néanmoins, des parasites ont été détectés par culture de la rate dilacérée dans le milieu MEM à 37°C.\*

- Mortalité :

La résistance significative vis-à-vis de T. cruzi obtenue chez le rat Fischer mâle après l'injection intrapéritonéale des formes épimastigotes de culture, a été aussi mise en évidence par la diminution du pourcentage de mortalité et de la période de mortalité des animaux immunisés non survivants et des animaux témoins.

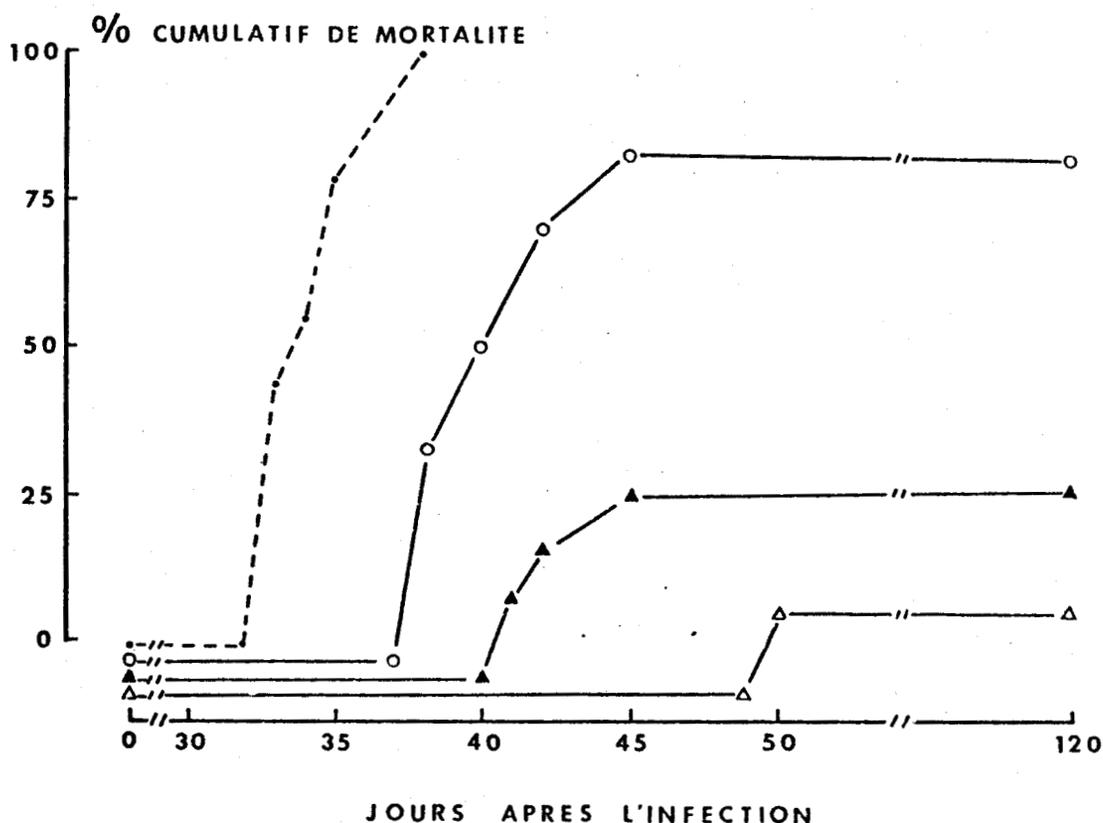
La figure 3 (p.68) résume les résultats obtenus dans cette nouvelle expérience et aussi ceux des études préliminaires. La mortalité des rats protégés non survivants (41-45 jours) et celle des rats ayant reçu du milieu ayant servi à la culture des formes épimastigotes (38-45 jours) présente un léger décalage par rapport aux animaux témoins (32-38 jours).

3.2.2. Etude immunologique humorale chez les rats immuns

L'évolution des anticorps anti-T. cruzi, des IgM, des IgG2a au cours de la protection et de l'infection d'épreuve a été étudiée chez 10 rats immunisés survivants du groupe des rats qui ont donné 20 survivants sur 21.

---

\*A partir de la rate dilacérée, les cellules blanches sont séparées et mises à fusionner avec des cellules myélomateuses de rat LOU, ceci dans une culture sur monocouche de fibroblastes plus macrophages. Quatre semaines plus tard, ont été observées des formes trypomastigotes dans le milieu.



**FIGURE 3 :** Période de mortalité des rats Fischer mâles protégés avec des formes épimastigotes de culture de *T. cruzi* puis infectés par  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de *T. cruzi* : Rats protégés avec des épimastigotes de six jours de culture ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ). Rats protégés avec des épimastigotes de trois jours de culture ( $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ ). Rats injectés avec le milieu GLSH ayant servi à la culture des formes épimastigotes ( $\circ$ — $\circ$ ). Rats témoins injectés avec le milieu GLSH neuf ou la solution de Hanks Wallace ( $\bullet$ ----- $\bullet$ ). L'infection d'épreuve a été réalisée au 50ème jour de la première injection de protection.



Chez les animaux témoins injectés avec la solution tamponnée de Hanks Wallace et chez le groupe ayant reçu les mêmes doses d'épimastigotes mais qui n'ont pas été infectés avec des trypanomastigotes, les anticorps anti-T. cruzi et les différentes immunoglobulines ont été aussi recherchés.

Les résultats de chacune des études humorales sont représentés par la moyenne du nombre de dosages dans chaque groupe de rats.

- Evolution des anticorps anti-T. cruzi

. Dosage par hémagglutination passive (Fig. 4, p. 70).

Chez les animaux immunisés ayant reçu l'infection d'épreuve ou non, une réponse primaire d'anticorps commence à s'élever entre le 15ème et le 35ème jour après l'injection des formes épimastigotes. Chez le groupe de rats non infectés donc n'ayant reçu que les formes épimastigotes, cette réponse atteint un maximum aux environs du 49ème-64ème jour ; ensuite, le taux décroît de façon significative au 73ème jour, et puis s'élève à nouveau ; au 126ème jour après la première dose immunisante, il est au 80ème. Par contre, chez le groupe de rats immunisés ayant reçu l'infection d'épreuve, une réponse secondaire caractérisée par une élévation du taux des anticorps sériques atteint un maximum (1 : 320) au 126ème jour, taux supérieur aux taux des anticorps du groupe de rats immunisés non infectés (80ème).

Chez les rats ayant reçu une solution tamponnée de Hanks Wallace les anticorps apparaissent vers le 64ème jour, le taux est le même que celui décelé chez le groupe immunisé non infecté (40ème). Cette période correspond aussi à la période de parasitémie très élevée.

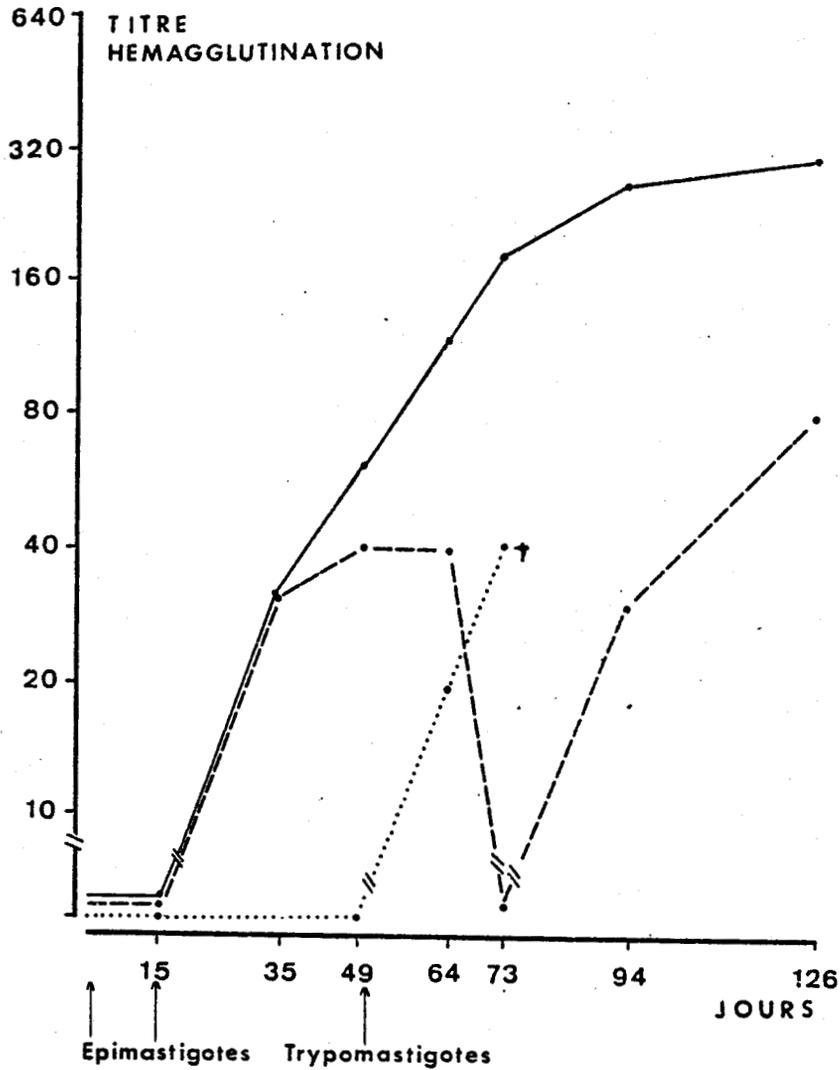


FIGURE 4 : Evolution des anticorps anti-T. cruzi décelés par la méthode d'hémagglutination passive chez les rats Fischer mâles protégés avec  $6.10^8$  épimastigotes de T. cruzi : Rats protégés ayant reçu l'infection d'épreuve au 50ème jour (•—•). Rats n'ayant reçu que des épimastigotes (•----•). Rats témoins n'ayant reçu que l'infection d'épreuve (•.....•).



### Dosage des anticorps lytiques

La figure 5 (p. 72) représente le pourcentage de lyse des trypomastigotes de culture à 37°C en utilisant la concentration au 5ème des sérums à tester.

Chez les animaux n'ayant reçu que des épimastigotes et chez le groupe contrôle, les taux d'anticorps lytiques suivent une cinétique généralement semblable à celle observée avec la technique d'hémagglutination passive.

Chez les animaux immunisés ayant reçu l'infection d'épreuve, le pourcentage de lyse atteint un maximum (80 %) le 73ème jour, ce pourcentage diminue pour atteindre un seuil inférieur au 50 % au 94ème jour, puis s'élève vers le 139ème jour, le pourcentage de lyse est de 84 %, soit un pourcentage proche du pourcentage de lyse (70 %) obtenu chez les animaux non infectés, donc n'ayant reçu que les formes épimastigotes.

### Evolution des IgM et des IgG2a

Les variations des IgM et des IgG2a sont assez semblables chez les animaux immunisés soit ayant reçu l'infection d'épreuve, soit n'ayant reçu que des épimastigotes. Les taux d'IgM (fig. 6, p.73) ne montrent aucun accroissement significatif au cours de l'expérience ; par contre, les taux d'IgG2a (fig. 7, p.74) présentent une augmentation considérable aux environs du 50-64ème jour après la première dose d'immunisation, ayant un maximum vers le 73ème jour. Puis, ces IgG2a augmentent ou diminuent légèrement pour atteindre un seuil encore important (5,5-6,5 mg/ml) au 139ème jour. Chez le groupe contrôle, une légère élévation du taux des IgG2a est observée vers le 64ème jour.

Il faut aussi signaler qu'une deuxième infection avec  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles ne fait pas varier les taux des IgM et des IgG2a et des anticorps anti-T. cruzi au 230ème jour à la fin de l'expérience.

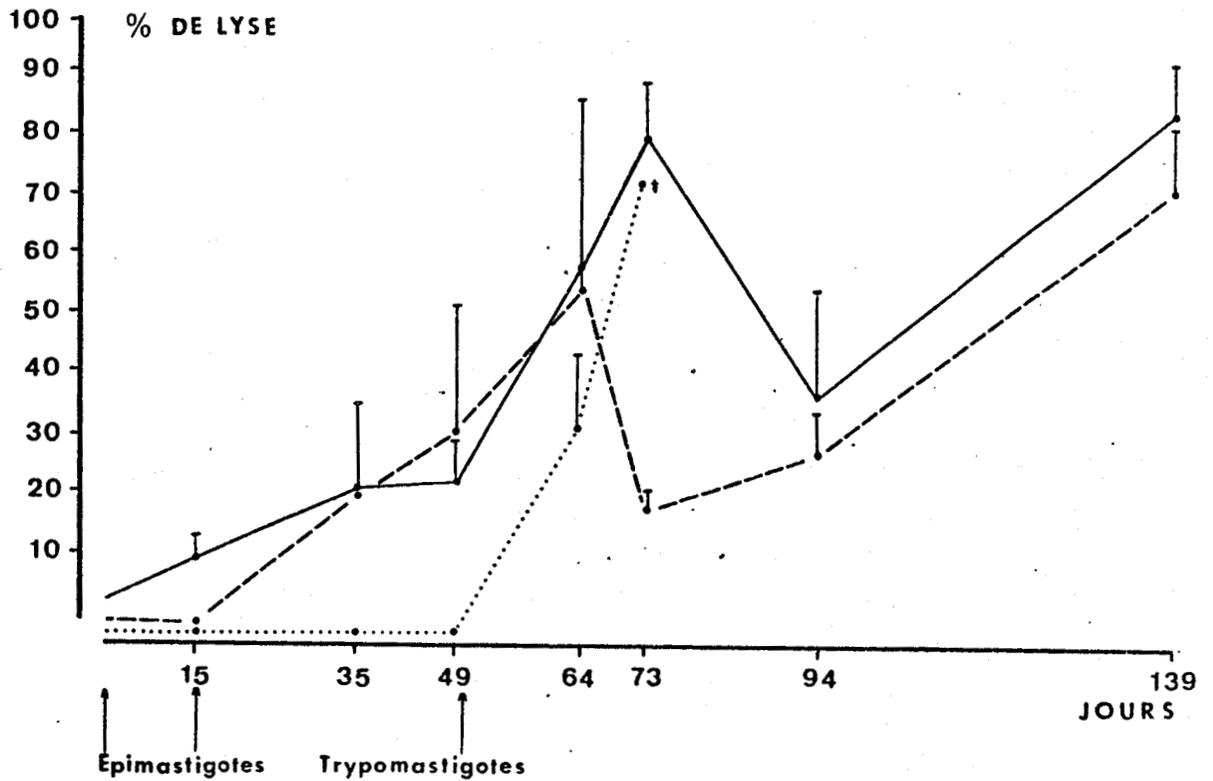


FIGURE 5 : Cinétique des anticorps lytiques chez les rats Fischer mâles protégés avec  $6.10^8$  épimastigotes de *T. cruzi* : Rats protégés ayant reçu l'infection d'épreuve au 50ème jour (—•—). Rats n'ayant reçu que des épimastigotes (---•---). témoins n'ayant reçu que l'infection d'épreuve (.....).



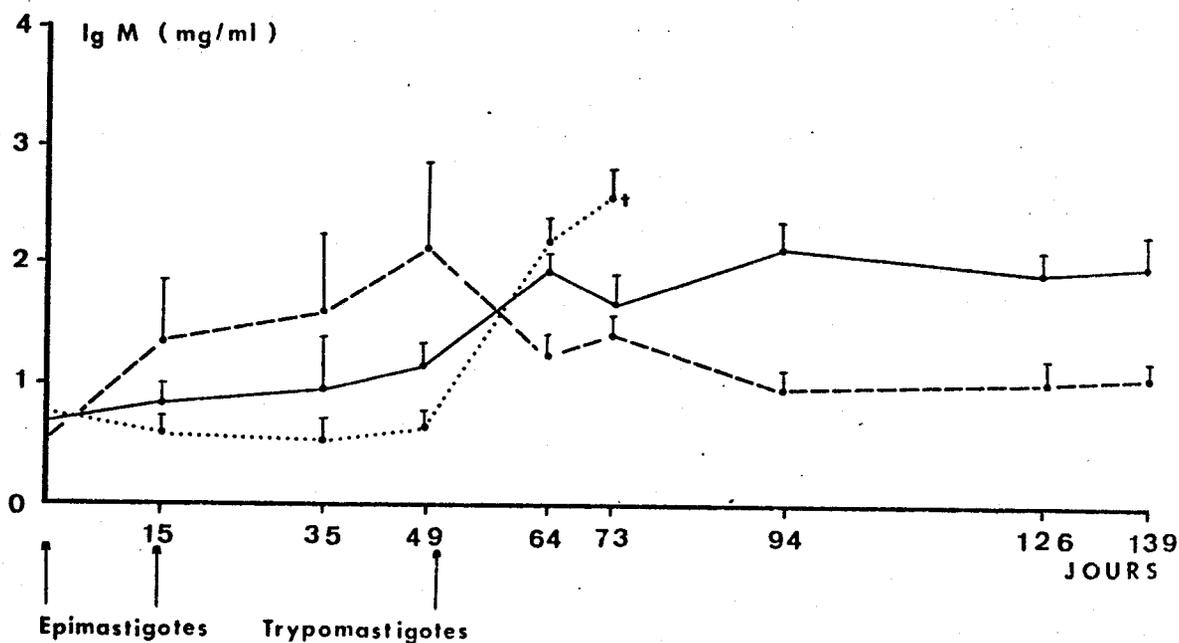


FIGURE 6 : Evolution des IgM chez les rats Fischer mâles protégés avec  $6 \cdot 10^8$  épimastigotes de T. cruzi : Rats protégés ayant reçu l'infection d'épreuve au 50ème jour (—•—•—). Rats n'ayant reçu que des épimastigotes (---•---). Rats témoins n'ayant reçu que l'infection d'épreuve (.....•.....).



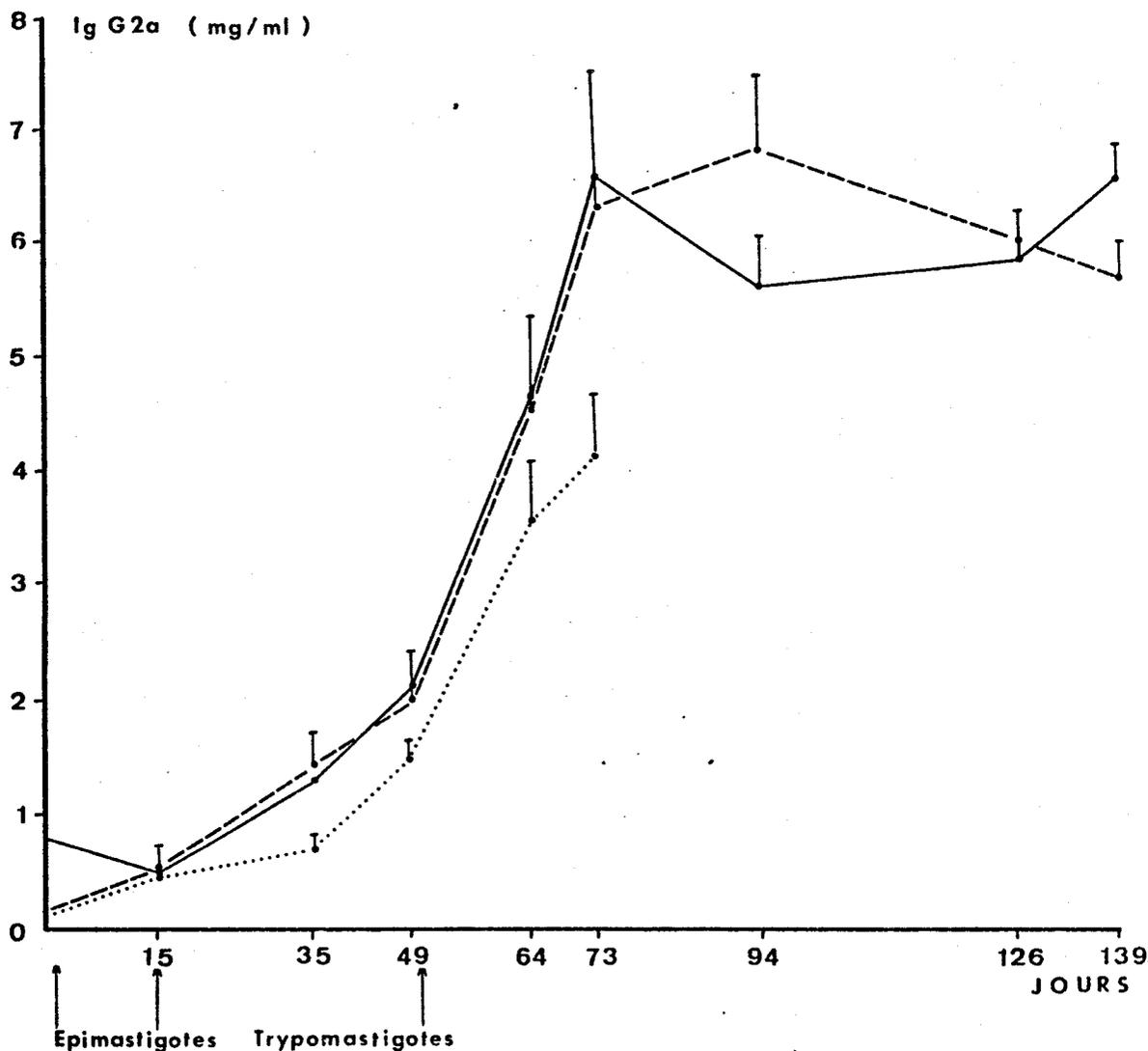


FIGURE 7 : Evolution des IgG2a chez les rats Fischer mâles protégés avec  $6 \cdot 10^8$  épimastigotes de T. cruzi : Rats protégés ayant reçu l'infection d'épreuve au 50ème jour (•—•). Rats n'ayant reçu que des épimastigotes (•- - -•). Rats témoins n'ayant reçu que l'infection d'épreuve (•.....•).



### 3.2.3. Protection passive

#### 3.2.3.1. Transfert d'anticorps

Le sérum (au 126ème jour) des rats, immunisés avec des épimastigotes de culture, utilisés pour le transfert passif a donné un titre au 320ème en hémagglutination, 80 % de lyse et 5,56 mg/ml d'IgG2a.

#### - Parasitémie :

Chez les rats ayant reçu le sérum de rats sains, les parasites sont observés vers le 21ème jour après l'infection (Fig. 8, p.76). Puis le développement de la phase aiguë est évident par l'augmentation progressive de la parasitémie. Le nombre de parasites atteint un maximum d'environ  $6.10^4$  par  $\text{mm}^3$  de sang au moment de la mort de l'animal.

Chez les rats "protégés" avec le sérum des rats immuns, il est à noter un léger décalage dans l'apparition des parasites dans le sang (vers le 28ème jour) par rapport aux contrôles ayant reçu le sérum de rats sains (vers le 21ème jour). Mais, l'évolution de la parasitémie (Fig. 8, p.76) est semblable à celle du groupe contrôle.

#### - Mortalité :

La mortalité du groupe contrôle ayant reçu le sérum de rats sains et du groupe ayant reçu le sérum de rats immuns a été observé à des périodes différentes :

- les rats du groupe contrôle sont morts entre le 31ème et le 37ème jour ;
- les rats du groupe "protégé" sont morts entre le 40ème et le 45ème jour après l'infection.

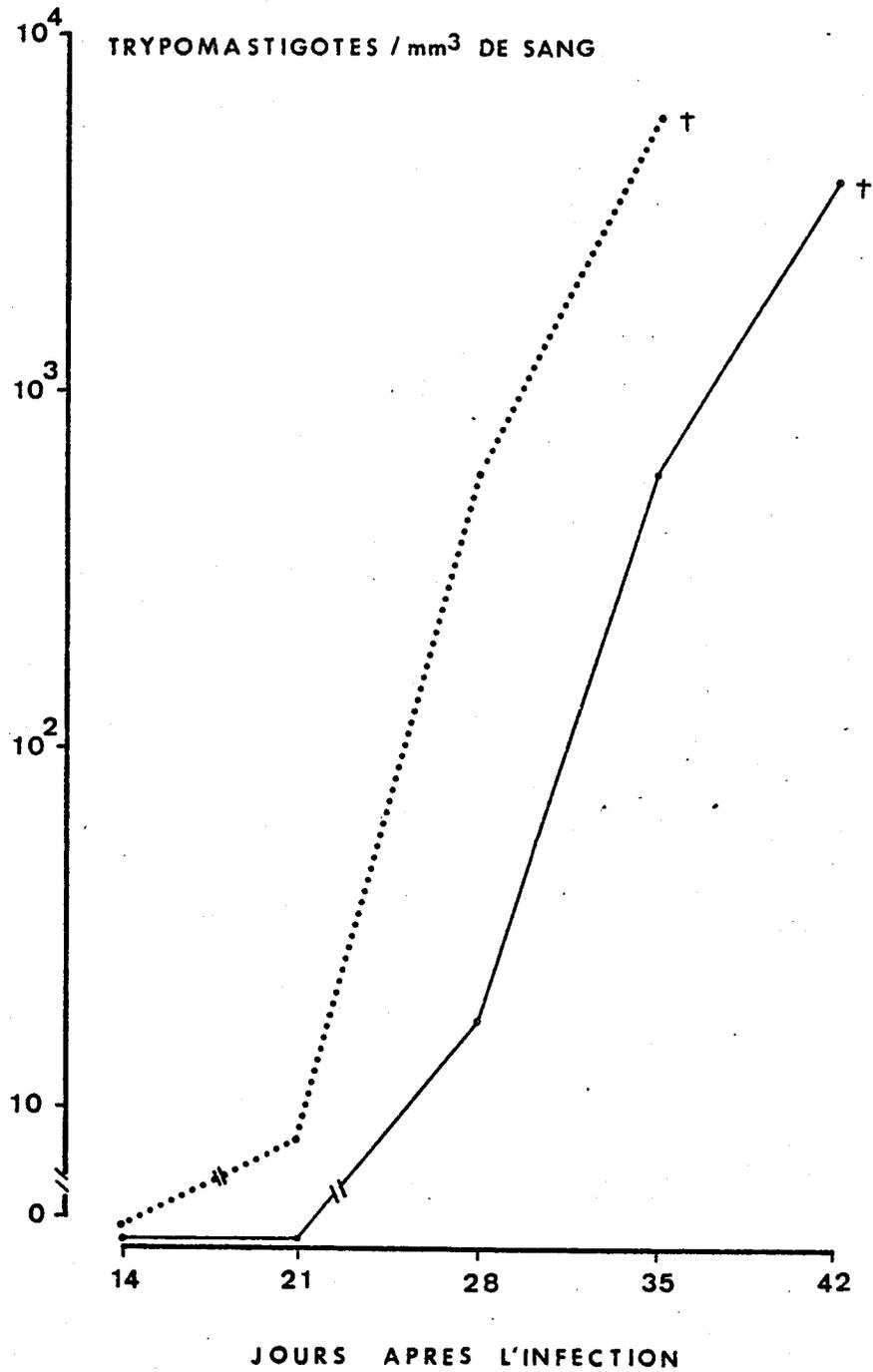


FIGURE 8 : Parasitémie des rats Fischer mâles injectés avec du sérum immun (●—●) ou du sérum normal (●.....●) 1 heure avant l'infection par  $1 \cdot 10^4$  trypomastigotes sanguicoles de T. cruzi.



Il faut aussi signaler que l'utilisation d'une dose d'infection 10 fois plus faible ( $1.10^3$  trypomastigotes sanguicoles) pour prouver l'effet protecteur du sérum immun, ne fait pas varier la sévérité de la phase aiguë de l'infection. Ainsi, la mortalité apparaît à la même période (42-43 jours après l'infection) et il est observé seulement un décalage de l'apparition des parasites (vers le 36ème jour).

### 3.2.3.2. Transfert des cellules sensibilisées

Nous avons utilisé des cellules de la rate, des cellules péritonéales et même du sérum de rats Fischer femelles infectées avec des trypomastigotes sanguicoles pour essayer d'induire une protection chez le receveur rat Fischer mâle.

#### - Parasitémie

On observe toujours le caractère progressivement ascendant des courbes de parasitémie des rats Fischer mâles infectés avec la souche Tehuantepec de T. cruzi. En effet, le groupe ayant reçu les cellules de la rate et le groupe ayant reçu les cellules péritonéales présentent un développement intense de l'infection. (Fig. 9, p.78).

Il faut aussi remarquer les délais d'apparition des trypomastigotes dans le sang : ainsi, les parasites apparaissent vers le 23ème jour après l'infection chez le groupe ayant reçu les cellules péritonéales ; tandis que chez le groupe ayant reçu les cellules de la rate les parasites apparaissent vers le 35ème jour après l'infection.

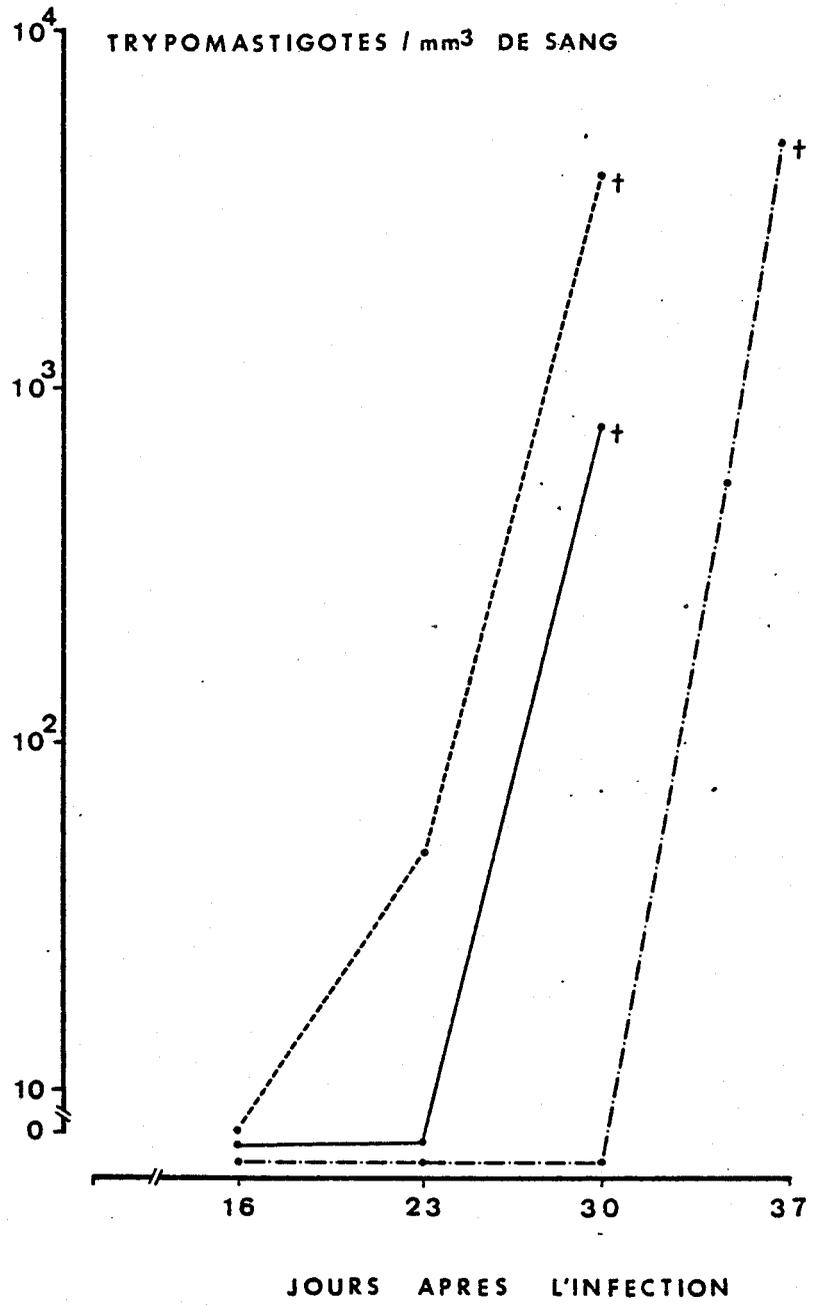


FIGURE 9 : Parasitémie des rats Fischer mâles ayant reçu des cellules péritonéales (•-----•), des cellules de la rate (•- - - - -•) ou du sérum immun (•————•) avant l'infection par  $1.10^4$  trypanostigotes sanguicoles de T. cruzi.



- Mortalité

La mort des animaux survient entre le 32-35ème jour chez le groupe inoculé avec les cellules péritonéales et entre le 37-39ème jour chez les receveurs de cellules de la rate.

Le transfert passif d'1 ml de sérum des rats femelles chez les rats mâles donne une diminution du nombre de parasites mais n'évite pas la mort des animaux.

3.3. ROLE DES LYMPHOCYTES B

- Evolution des anticorps anti-T. cruzi hémagglutinants

Chez les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  et du SNL, les anticorps anti-T. cruzi ont été décelés par la technique d'hémagglutination passive. Les deux groupes furent classés selon le sexe (Fig. 10, p.80). Les rats mâles traités avec du SNL présentent des taux significatifs d'anticorps détectés dès la 2ème semaine après l'infection. Dans cette période, un rat femelle seulement traité avec du SNL présente un titre faible d'anticorps ; cependant, tous les rats de ce groupe présentent des anticorps à partir de la 4ème semaine après l'infection, ces anticorps augmentent pour atteindre un seuil important (titre de 160ème) à la 10ème semaine à la fin de l'expérience. Par contre, chez les rats mâles et femelles du groupe traité avec du sérum anti- $\mu$  la réaction d'hémagglutination est négative (Fig. 10). (p. 80).

- Evolution des IgM et des IgG2a

Les taux des IgM et des IgG2a des sérums de rats traités avec du sérum anti- $\mu$  ou du sérum normal de lapin (SNL) sont indiqués dans le tableau VI (p. 81). Une augmentation significative de ces immunoglobulines

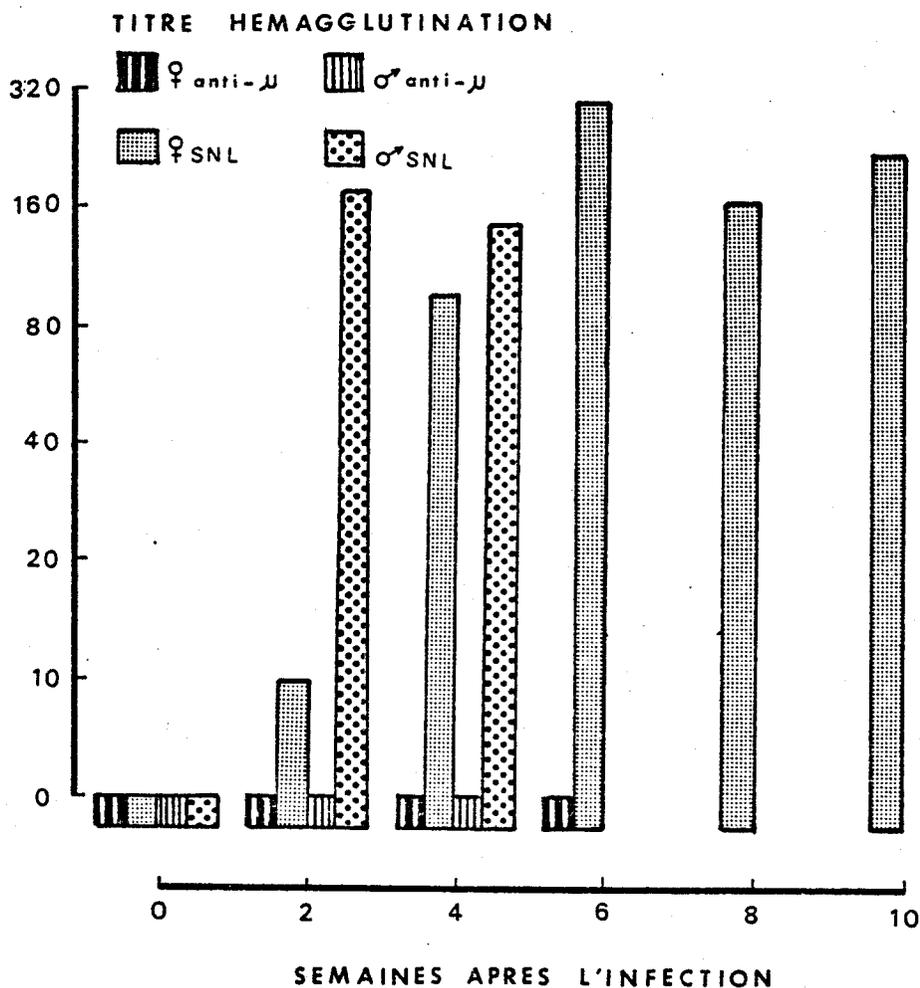


FIGURE 10 : Evolution des anticorps anti-*T. cruzi* révélés par la méthode d'hémagglutination passive chez des rats traités avec du sérum normal de lapin (SNL) ou du sérum anti- $\mu$  avant l'infection par  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de *T. cruzi*.



TABLEAU VI : Comparaison des IgM et des IgG2a chez des rats traités avec du SNL et du sérum anti- $\mu$  après l'infection avec  $1.10^4$  trypanostigotes de T. cruzi

Groupe des animaux traités	Taux des immunoglobulines (mg/ml) suivant l'infection (en semaines) (1)			p valeur (2)
	0	2	4	
IgM				
SNL	0,31 $\pm$ 0,25	2,37 $\pm$ 1,16	3,06 $\pm$ 1,14	4,22 $\pm$ 0,18
anti- $\mu$	0	0	0	0
				< 0,001
IgG2a				
SNL	0	0,44 $\pm$ 0,94	2,04 $\pm$ 0,92	3,98 $\pm$ 0,55
anti- $\mu$	0	0	0	0
				< 0,001

(1) Les résultats expriment la moyenne  $\pm$  l'écart type

(2) La valeur de P est donnée pour les rats traités avec du SNL et du sérum anti- $\mu$



est observée au cours de l'infection chez les rats traités avec du SNL, tandis que chez les rats traités avec du sérum anti- $\mu$ , aucune élévation du taux d'IgM et d'IgG2a n'a pu être observée, soit un jour avant l'infection, soit les semaines suivant l'infection par T. cruzi.

#### - Taux du complément

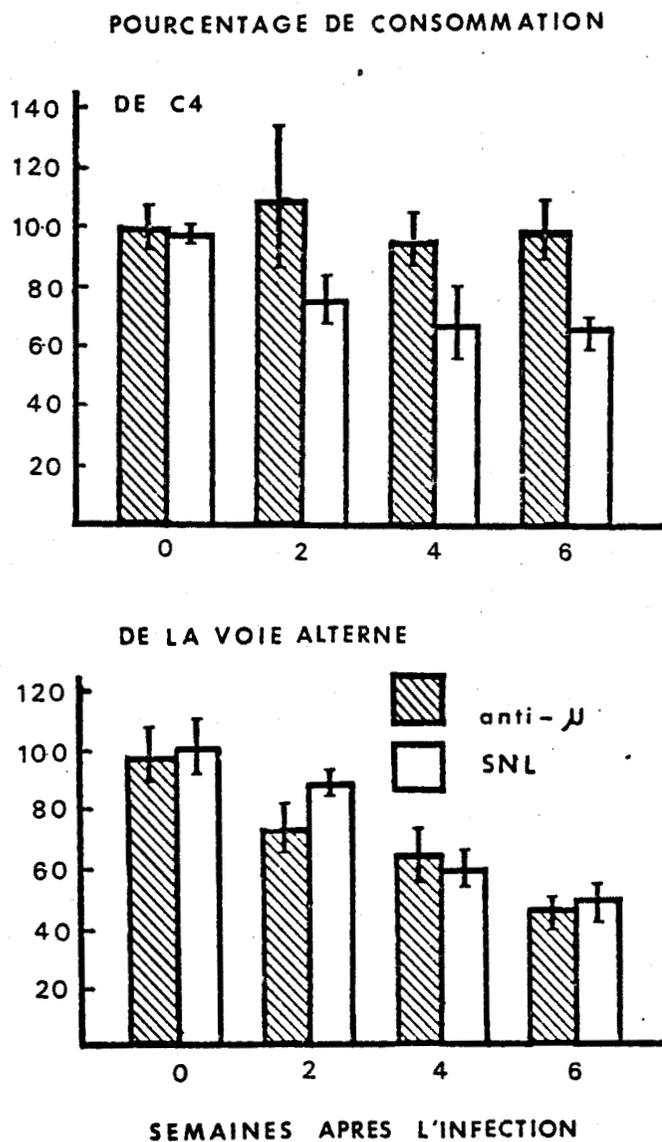
Les résultats des taux du C4 et de la voie alterne du complément sont exprimés en pourcentage de consommation de C4 et en pourcentage de consommation de la voie alterne par rapport aux taux de rats normaux non traités (Fig. 11 ; p.83). Le pourcentage de consommation de C4 et de la voie alterne du complément diminuent progressivement chez les rats traités avec du SNL. Chez des rats traités avec du sérum anti- $\mu$ , une diminution de la voie alterne est aussi observée au cours de l'infection. Par contre, il n'y a pas de variations des taux du C4 chez le groupe traité avec du sérum anti- $\mu$ .

La figure 11 (p.83) démontre aussi une consommation de la voie alterne plus importante à la 6ème semaine après l'infection par rapport à la 2ème semaine après l'infection.

#### - Parasitémie

La parasitémie a été suivie par l'examen direct microscopique chez les groupes classés selon le sexe (Fig. 12, p.84).

Chez les rats mâles traités avec du SNL, les parasites apparaissent vers la 4ème semaine après l'infection ; tandis que, chez les rats mâles traités avec du sérum anti- $\mu$ , la parasitémie apparaît plus tôt (3ème semaine, après l'infection). Puis, chez les deux groupes (traités avec du sérum anti- $\mu$  ou du SNL), la parasitémie augmente progressivement ; en particulier, avec un nombre très important de parasites ( $5.10^4$ - $10^5$  par  $\text{mm}^3$ ) au moment de la mort des animaux.



**FIGURE 11** : Evolution des taux de C4 et de la voie alterne du complément chez les rats traités avec du sérum normal de lapin (SNL) ou du sérum anti- $\mu$  avant l'infection par  $1.10^4$  trypanostigotes sanguicoles de T. cruzi.



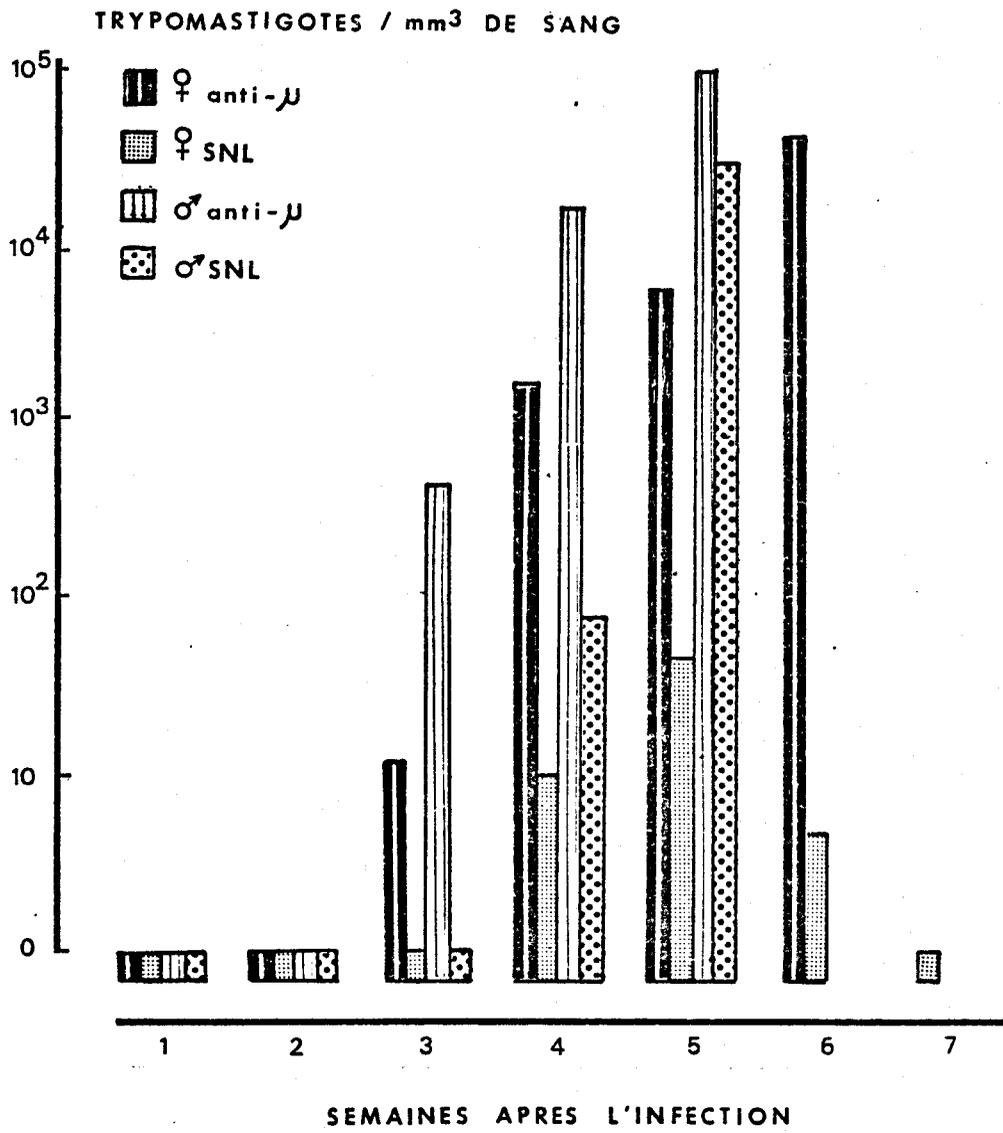


FIGURE 12 : Parasitémie des rats traités avec du sérum normal de lapin (SNL) ou du sérum anti-μ avant l'infection par  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de T. cruzi.

RUS  
LILLE

Chez les rats femelles traités avec du SNL, les parasites sont observés la 4ème semaine après l'infection (Fig. 12, p.84). Ce groupe de rats développe une phase aiguë moins sévère que les rats mâles traités avec du SNL ; ainsi, la parasitémie est faible, les parasites ne sont plus observés dans le sang vers la 7ème semaine après l'infection et tous les animaux survivent. Par contre, chez les rats femelles traités avec du sérum anti- $\mu$ , la parasitémie apparaît vers la 3ème semaine après l'infection ; ensuite la phase aiguë de la maladie se développe et les rats meurent avec un nombre de parasites (d'environ  $5.10^4/\text{mm}^3$ ) à peu près identique à ceux observés chez les rats mâles traités avec du SNL. Ainsi, les rats femelles traités avec du sérum anti- $\mu$  sont significativement plus susceptibles à la phase aiguë de l'infection que leurs contrôles traités avec du SNL.

Chez les rats mâles et femelles traités avec du sérum anti- $\mu$ , la parasitémie apparaît plus tôt (3ème semaine après l'infection) que chez les rats mâles et femelles traités avec du SNL. De plus, tous les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  développent une haute parasitémie et succombent. Dans ce cas aussi, les rats femelles qui meurent en phase aiguë, semblent être plus résistantes que les rats mâles traités avec du sérum anti- $\mu$ .

#### - Mortalité

La mort des animaux survient entre la 5ème semaine et la 8ème semaine après l'infection. La mortalité chez les rats mâles traités avec du sérum anti- $\mu$  ou avec du SNL a été observée à la même période (5ème-6ème semaine) ; chez les rats femelles traités avec du sérum anti- $\mu$ , la période de mortalité (6ème-8ème semaine) présente un léger décalage par rapport aux deux groupes précédents. Les rats femelles traités avec du SNL survivent à l'infection.

### 3.4. ROLE DES LYMPHOCYTES T

#### - Evolution des anticorps anti-T. cruzi hémagglutinants

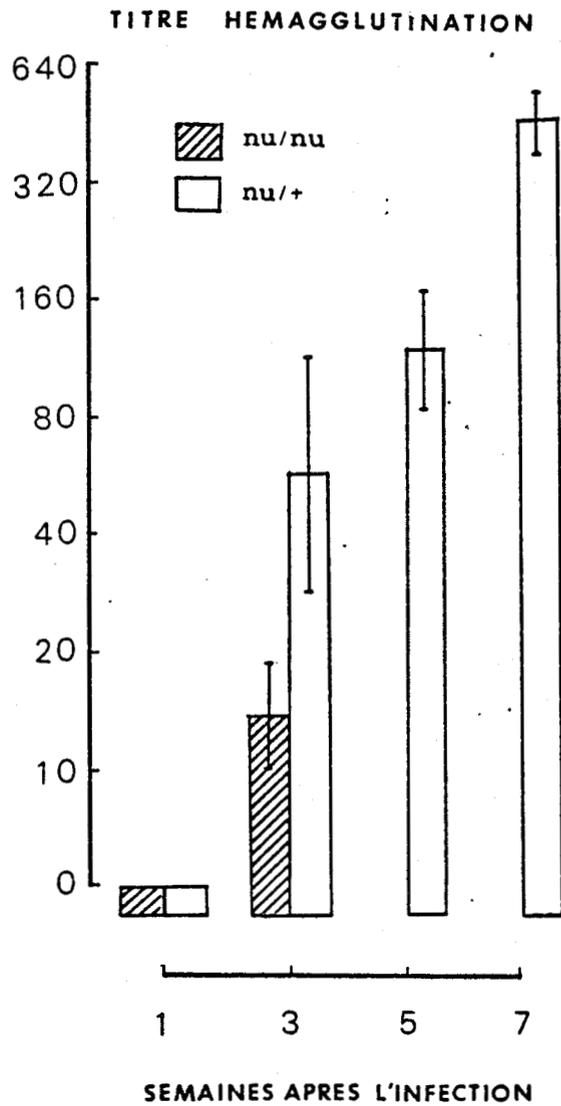
Les titres d'anticorps anti-T. cruzi décelés par la technique d'hémagglutination passive sont observés à la 3ème semaine après l'infection chez les deux groupes de rats (Nu/+ et Nu/Nu) (Fig. 13, p.87). Dans cette période, les rats Nu/Nu seulement présentent un titre faible d'anticorps. Chez les rats Nu/+, les taux d'anticorps spécifiques augmentent significativement au cours de l'infection.

#### - Evolution des IgM et des IgG2a

Les taux des IgM et des IgG2a des rats Nu/+ et Nu/Nu au cours de l'infection par T. cruzi, sont indiqués dans le tableau VII (p.88). La comparaison des valeurs des IgM entre les rats Nu/+ et Nu/Nu montre qu'à la première semaine l'écart observé n'est pas significatif ( $p = 0,08$ ), alors qu'à la 3ème semaine les rats Nu/+ présentent un taux d'IgM un peu plus élevé ( $p = 0,02$ ). Par contre, en ce qui concerne les IgG2a, aussi bien à la première semaine qu'à la 3ème semaine, les rats Nu/+ présentent toujours des valeurs supérieures avec des écarts types significatifs ( $p = 0,0295$  et  $p = 0,0195$ ).

#### - Taux du complément

La figure 14 (p.90) montre le pourcentage de consommation de C4 et le pourcentage de consommation de la voie alterne du complément observés chez les rats athymiques (Nu/Nu) et leurs contrôles (Nu/+). Les taux de C4 du complément ne sont pas modifiés chez les deux groupes



**FIGURE 13** : Evolution des anticorps anti-T. cruzi révélés par la méthode d'hémagglutination passive chez les rats nu/+ et nu/nu au cours de l'infection par  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de T. cruzi.



TABLEAU VII Comparaison des IgM et des IgG2a chez des rats Nu/+ et Nu/Nu après l'infection avec  $1.10^4$  trypanostigotes sanguicoles de T. cruzi.

Groupes des animaux	Taux des Immunoglobulines (mg/ml) les semaines suivant l'infection (1)						
	1	2	3	4	5	6	7
IgM	Nu/+	2,84 ± 1,48	0,080	4,57 ± 0,66	0,020	4,45 ± 0,60	3,57 ± 0,57
	Nu/Nu	1,83 ± 0,71		3,00 ± 1,23			
IgG2a	Nu/+	2,73 ± 1,30	0,029	3,83 ± 1,73		4,19 ± 0,77	4,08 ± 1,34
	Nu/Nu	1,55 ± 0,82		1,80 ± 1,21		0,0195	

(1) Les résultats expriment la moyenne ± l'écart type

(2) La valeur de P est donnée pour les rats Nu/+ et Nu/Nu



infectés par T. cruzi. Par contre, l'infection des deux groupes de rats est accompagnée par un décroissement significatif des taux du complément de la voie alterne. Cette diminution est observée d'abord (3ème semaine après l'infection) chez les rats Nu/Nu, tandis que chez les rats contrôles (Nu/+) elle n'est observée qu'à la 5ème semaine après l'infection.

#### - Parasitémie

Chez les rats Nu/+, on n'observe pas de parasites à l'examen microscopique pendant la durée de l'expérience (Fig. 15, p. 91). Par contre, deux sur six rats Nu/Nu possèdent des parasites dans le sang dès la première semaine après l'infection. A partir de la 2ème semaine, tous les rats Nu/Nu présentent une augmentation progressive de la parasitémie et meurent avec un nombre important de parasites (environ  $5.10^3$  par  $mm^3$ ).

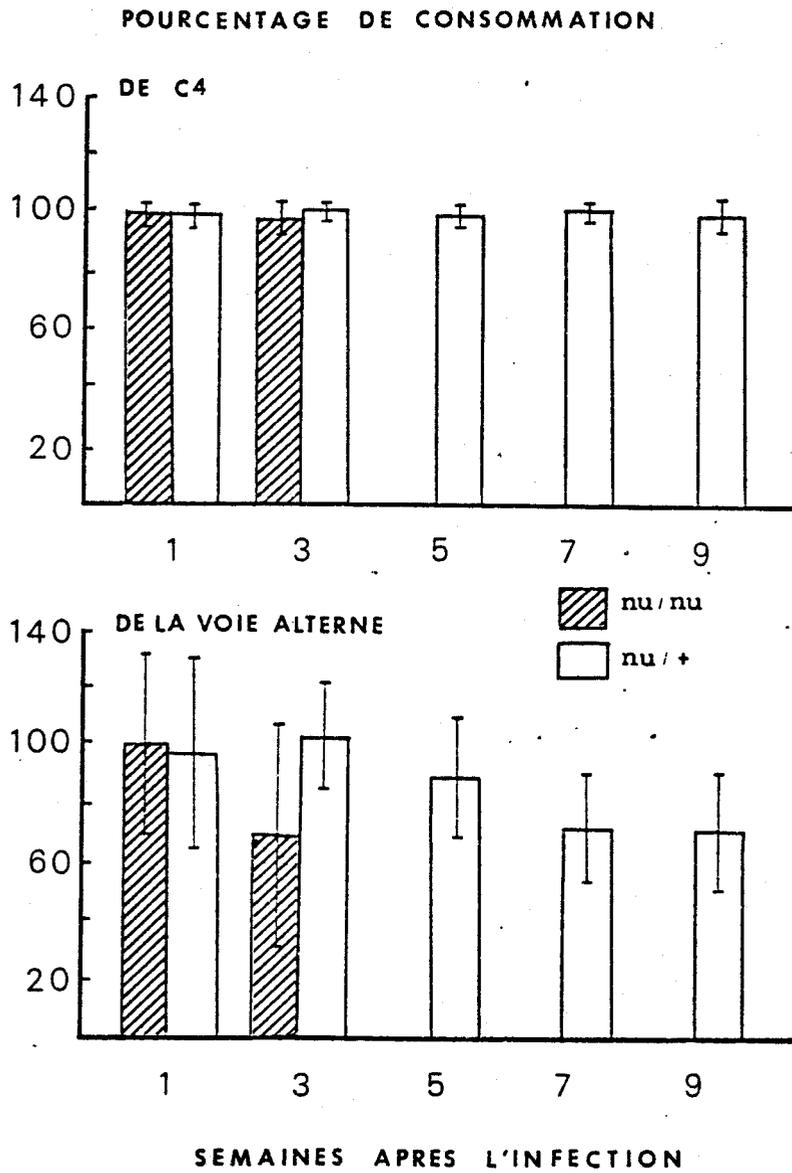
Les rats athymiques Nu/Nu sont plus susceptibles à la phase aiguë de l'infection que leur contrôle Nu/+.

#### - Mortalité

Les rats Nu/+ survivent jusqu'à la fin de l'expérience (12ème semaine), tandis que les rats Nu/Nu succombent entre la 2ème et 4ème semaine après l'infection.

### 3.5. TYPAGE DE LA SOUCHE TEHUANTEPEC DE T. CRUZI

Les trypomastigotes sanguicoles de la souche Tehuantepec de T. cruzi présentent une morphologie semblable à la forme trapue de la souche type CL (Fig. 16, p. 93) décrite par Brener (1973) (p. 11).



**FIGURE 14** : Evolution des taux de C4 et de la voie alterne du complément chez les rats nu/+ et nu/nu au cours de l'infection par  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de T. cruzi.



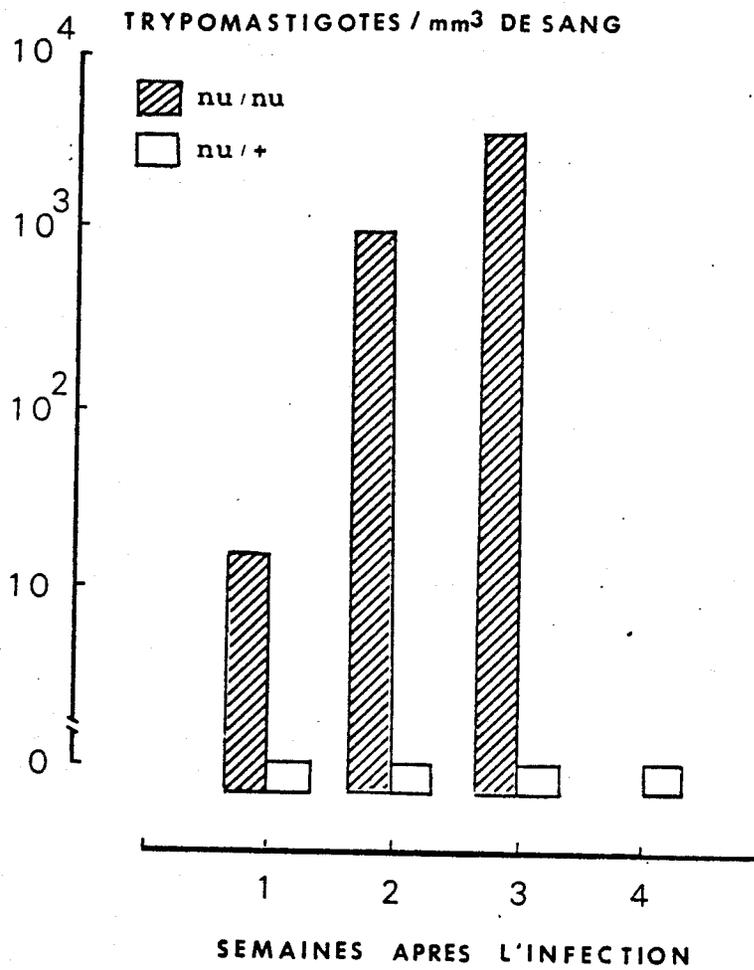


FIGURE 15 : Parasitémie des rats nu/+ et nu/nu après l'infection par  $1.10^4$  trypomastigotes sanguicoles de T. cruzi.



Une autre concordance entre cette souche Tehuantepec et la souche de forme trapue type CL est observée par l'absence de lyse par le complément humain normal des trypomastigotes, isolés de rats en phase aiguë de l'infection.

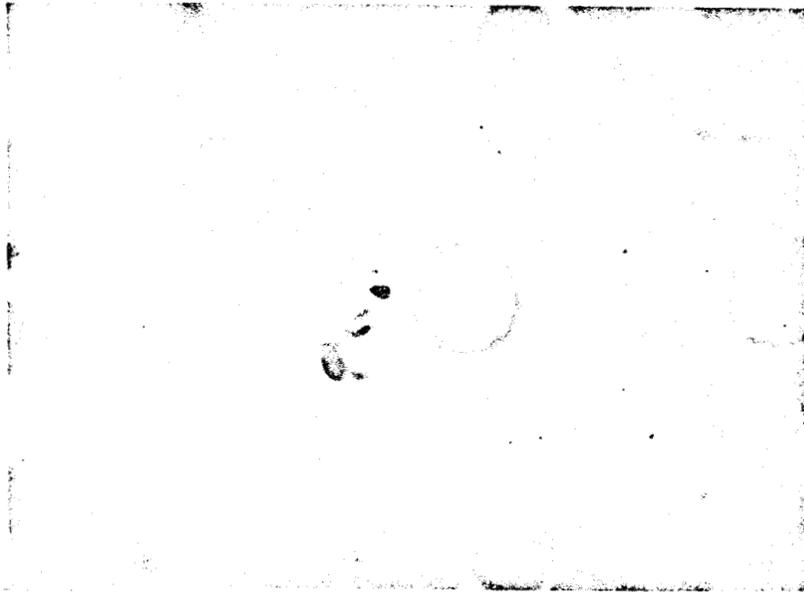


Figure 16 : Morphologie des formes trypanomastigotes sanguicoles de la souche Tehuantepec de T. cruzi.

BUS  
LILLE

## CHAPITRE 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

-----

### 4.1. ESSAIS DE PROTECTION CONTRE L'INFECTION

#### 4.1.1. Protection active avec des formes épimastigotes

L'utilisation d'un nombre de rats très important nous a donc permis de constater que le rat Fischer mâle consanguin (F344) susceptible à la maladie de Chagas, peut être protégé contre la phase aiguë de l'infection. La protection a été induite de façon active par deux inoculations intrapéritonéales de formes épimastigotes de culture ( $6.10^8$ ) à 15 jours d'intervalle. Ainsi 20 rats sur 21 ont survécu à l'infection d'épreuve effectuée 50 jours après la première dose d'immunisation (Tableau V.)

En ce qui concerne la parasitémie, un des paramètres utilisés pour mesurer l'effet protecteur, elle s'est révélée négative à l'examen direct microscopique chez les rats immunisés ayant survécu à l'infection d'épreuve et chez le groupe n'ayant reçu que des épimastigotes. Néanmoins, une parasitémie sous-patente a été mise en évidence par culture de cellules de la rate chez le groupe n'ayant reçu que des épimastigotes.

Les formes épimastigotes de culture à 28°C sont des formes non infectantes, elles sont détruites par le complément (ANZIANO et al., 1972 ; NOGUEIRA et al., 1975) ; mais, dans les cultures de ces formes se trouve un nombre insignifiant de formes infectantes trypomastigotes (0,05 %). Ainsi, il est possible de considérer que la protection chez le rat Fischer mâle contre la mort par une dose létale de trypomasti-

gotes sanguicoles de T. cruzi puisse être due au stimulus immunogénique des épimastigotes détruits ou bien à la parasitémie sous-patente en raison du nombre très bas de formes trypomastigotes existant dans les cultures d'épimastigotes et même aux deux. La protection contre l'infection par T. cruzi semble demander des organismes vivants (GOBLE, 1961). Il a été décrit que des souches non virulentes de T. cruzi (SEAH et MARSDEN, 1969), des formes épimastigotes de culture (MENEZES, 1976) ou des flagellés vivants de trypanosomatidae monoxènes (SOUZA et al., 1974) confèrent une protection chez la souris contre l'infection par une souche virulente de T. cruzi.

Une autre preuve d'immunité contre la phase aiguë a été démontrée par l'absence de parasites dans le sang circulant chez les rats immunisés survivants après avoir reçu une deuxième réinfection avec  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles. En effet, chez les animaux et même chez l'homme en phase chronique de la maladie, des réinfections ne sont pas à l'origine d'une nouvelle infection aiguë.

L'augmentation du nombre d'animaux survivants dans cette expérience (20 survivants sur 21) (Tableau V ) peut être due à un nombre différent de trypomastigotes dans les cultures d'épimastigotes de 6 jours en comparaison avec l'expérience préliminaire (9 survivants sur 12) (Tableau V ) où nous avons utilisé des épimastigotes de 3 jours de culture.

L'infection d'épreuve, effectuée 140 jours après deux immunisations par des formes de culture à 28°C, entraîne encore une très bonne survie des rats (six animaux sur six) ; ceci démontre la persistance de l'effet protecteur dû aux formes de culture à 28°C.

La mise au point de ce test d'immunité contre la phase aiguë de la maladie nous a permis d'envisager le mécanisme d'action des anticorps sériques dans la résistance acquise à T. cruzi par transfert passif de sérum. Il a été nécessaire préalablement d'étudier l'évolution des anticorps anti-T. cruzi et l'évolution des immunoglobulines.

Des anticorps hémagglutinants et lytiques anti-T. cruzi ont été mis en évidence chez les rats immunisés ayant reçu l'infection d'épreuve ou non et même dans le groupe témoins démontrant ainsi qu'il n'existe pas de corrélation entre les titres d'anticorps sériques et la protection des animaux.

Il est à noter d'abord, que les formes trypomastigotes sanguicoles chez le groupe immunisé ayant reçu l'infection d'épreuve entraîne une réponse secondaire, aussi importante pour les anticorps hémagglutinants (Fig.4 ) que pour les anticorps lytiques (Fig.5 ). Ensuite, une diminution seulement des anticorps lytiques est observée vers le 94ème jour dans ce groupe. Par contre, chez le groupe immunisé n'ayant reçu que des épimastigotes, une diminution significative des anticorps hémagglutinants (Fig.4 ) et des anticorps lytiques (Fig.5 ) est observée plus précocement vers le 73ème jour. Dans notre expérience préliminaire (RODRIGUEZ, 1980), cette même diminution assez importante avait été observée par les techniques d'hémagglutination passive et d'immunofluorescence indirecte chez les rats immunisés n'ayant pas reçu l'infection d'épreuve.

Après cette dépression (vers le 73ème jour) au niveau des anticorps, une remontée des anticorps hémagglutinants et lytiques s'observe pour les deux expériences. Il est possible qu'une corrélation existe entre cette remontée et l'infection sous-patente. En effet, chez les rats n'ayant reçu que des épimastigotes, un développement des parasites peut s'effectuer vers le 73ème jour,

développement non détectable à l'examen directe microscopique. Chez les rats protégés ayant reçu l'infection d'épreuve, cet éventuel développement de la parasitémie sous-patente serait plus tardif et pourrait être seulement en relation avec les anticorps lytiques.

D'après ces observations une question pourrait être posée : s'agit-il de deux courbes différentes ou non ? Pour répondre à la première question, les études concernant les analyses antigéniques des trypanosomatidae suggèrent la possibilité d'une spécificité antigénique pour chacun des stades évolutifs de T. cruzi (KLOETZEL et al., 1975 ; CERISOLA et al., 1971). Il a été démontré que les composants 5 (AFCHAIN et al., 1979) et cathodique majeur (MARCIPAR et al., 1981) spécifiques de Trypanosoma cruzi sont communs aux formes épimastigotes, trypomastigotes et amastigotes de la souche Tehuantepec de T. cruzi ; mais une expression antigénique différente à ces deux composants est liée à la forme amastigote (SANTIAGO et al., 1981). Ainsi, aussi bien pour le dosage des anticorps hémagglutinants que lytiques, le premier pic pourrait être dû à l'expression antigénique de la forme trypomastigote, quant au second pic il pourrait être lié à l'expression antigénique correspondant à la forme intracellulaire amastigote. Si, par contre, il s'agit d'une seule courbe, il faudrait retenir que des observations chez l'homme et des évidences expérimentales montrent l'existence de phénomènes d'immunodépression au cours des infections parasitaires (CAPRON et al., 1977). Particulièrement dans l'infection à T. cruzi, des substances suppressives ont été révélées in vivo (CUNNINGHAM et al., 1978). De plus, chez la souris infectée, les expériences in vivo rejoignent bien les résultats observés in vitro ; en effet, le test de transformation blastique démontre que pendant la phase aiguë en absence d'anticorps humoraux, apparaît vis-à-vis de l'antigène T. cruzi, un pic de stimulation des

lymphocytes, puis est observée une chute brutale de cette stimulation qui est une corrélation avec l'apparition des anticorps humoraux (BERNAL, 1978). Ainsi, la diminution des anticorps anti-T. cruzi, observée au 73ème jour dans nos expériences, pourrait être expliquée en fonction d'une possible libération de facteurs suppressifs par les parasites lors de l'infection sous-patente..

L'augmentation des IgG2a est remarquablement plus importante par rapport à celle des IgM au cours de l'infection. A la différence des observations précédentes sur les anticorps anti-T. cruzi, le taux très augmenté des IgG2a vers le 73ème jour persiste bien jusqu'au 139ème jour (Fig.7 ). La production de taux élevé d'IgG par rapport aux taux d'IgM a été observée à la fin de la phase parasitémique chez la souris infectée par T. cruzi (HANSON et al., 1977). Dans l'infection par T. cruzi, il a été signalé que l'activation des cellules B polyclonales induites par T. cruzi peut être responsable des anomalies dans la synthèse et la sécrétion des immunoglobulines au cours de l'infection humaine à T. cruzi (ORTIZ-ORTIZ et al., 1980). Dans notre expérience, on peut suggérer que les taux très élevés des IgG2a peuvent être dus à l'activation des cellules B polyclonales suscitée par les doses d'épimastigotes. Ainsi, l'évolution des IgG2a est similaire aussi bien chez les rats immunisés ayant reçu la dose d'épreuve que chez les rats n'ayant reçu que les doses d'immunisation (Fig. 7).

La réinfection par une deuxième injection de  $15.10^4$  trypomastigotes sanguicoles ne fait pas varier les taux des anticorps anti-T. cruzi, les taux des IgG2a et les taux des IgM au 230ème jour à la fin de l'expérience.

#### 4.1.2. Protection passive par transfert de sérum ou de cellules de rats en phase chronique de l'infection

Des études menées chez la souris démontrent que l'IgG est l'immunoglobuline qui induit la résistance durant la phase chronique de la maladie expérimentale (CASTELLO BRANCO, 1978). De plus, le fractionnement du sérum immun de souris en phase chronique suggère que l'immunité humorale est très probablement due à l'IgG2a et à l'IgG2b (TAKEHARA et al., 1978).

Dans notre expérience, nous n'avons obtenu aucune protection par transfert passif contre l'infection par T. cruzi chez le rat Fischer mâle. Ainsi, l'utilisation de sérum de rats immunisés ayant reçu l'infection d'épreuve, sérum présentant des titres élevés d'anticorps anti-T. cruzi et des taux d'IgG2a significatifs au 126ème jour (Fig.4, 5 ; Fig. 7 ), n'a donné qu'un léger décalage dans la mortalité (40 - 45 jour) par rapport au groupe contrôle (31 - 37 jour), quelque soit la dose de trypomastigotes sanguicoles inoculés ( $1.10^4$  ou  $1.10^3$ ) de la souche Tehuantepec de T. cruzi.

Les études sur le rôle possible in vivo des anticorps conduisent généralement à des observations contradictoires (BRENER, 1980). De plus, il est souvent admis que les anticorps lytiques (GONZALEZ-CAPPA et al., 1980) et les anticorps agglutinants (REED, 1980) n'interviennent pas directement dans la protection contre T. cruzi. Ces résultats ne nous permettent pas d'exclure l'action protectrice possible des IgG2a et des anticorps anti-T. cruzi contre l'infection. Ce manque de protection chez le rat peut être due à la capacité, chez cet hôte, de métaboliser rapidement les anticorps (CAPRON, communication personnelle). D'ailleurs, il existe de nombreuses évidences expérimentales qui démontrent la complexité des mécanismes immunitaires dans les affections parasitaires

BUS  
LILLE

(CAPRON et CAPRON, 1978). Ces mécanismes répondent à un processus par lequel le parasite est capable d'échapper à la réponse immune qu'il suscite ; un autre a pour effet d'altérer la réponse immune de l'hôte. Des différences d'expression antigénique ont été mises en évidence chez les formes sanguicoles de T. cruzi (KRETTLI et BRENER, 1976). De plus, les trypomastigotes sanguicoles de la souris en phase aiguë présentent des immunoglobulines liées à leur surface, ainsi la formation du complexe anticorps-antigène de surface conduit à un phénomène de "capping" (KLOETZEL et DEANE, 1977). Ce phénomène de modulation antigénique peut représenter un mécanisme d'évasion de T. cruzi à la réponse humorale de l'hôte (KRETTLI et al., 1979 ; GONZALEZ-CAPPA, 1980). La modulation antigénique est dépendante de la souche et de l'état du parasite (SCHMUNIS et al., 1980) et peut être responsable des différences physiologiques et du comportement caractéristiques des souches de T. cruzi au cours de l'infection (KRETTLI et al., 1979). Ces auteurs soutiennent l'hypothèse que le complexe immun situé à la surface des trypomastigotes de la souche de type CL de T. cruzi est éliminé plus efficacement que celui formé à la surface de la souche du type Y ; c'est pour cette raison que les trypomastigotes du type CL ne seraient pas lysés par le complément. Ainsi, les résultats discordants obtenus, concernant l'effet protecteur du sérum par transfert passif, peuvent être justifiés en fonction des souches utilisées pour l'infection d'épreuve. En effet, le cours de la parasitémie et le pourcentage de mortalité ne sont pas affectés chez les souris qui reçoivent du sérum immun homologue ou hétérologue et sont inoculées avec des trypomastigotes de la souche CL (formes trapues) de T. cruzi. Par contre, une bonne protection est obtenue

lorsque l'infection d'épreuve est effectuée avec la souche Y (formes fines) (KRETTLI et BRENER, 1976).

La souche Tehuantepec de T. cruzi utilisée dans ces expériences montre la même morphologie et les mêmes critères de résistance à la lyse par le complément humain que la souche de type CL. Ceci pourrait donc expliquer les résultats négatifs que nous avons obtenus lors des transferts passifs.

En dehors de ce mécanisme d'évasion concernant le parasite lui-même, l'infection par T. cruzi peut altérer la réponse humorale de l'hôte (CLINTON et al., 1975). Ainsi, les différences observées au sujet de l'effet protecteur du sérum pourraient s'expliquer par la présence d'une substance suppressive révélée chez la souris infectée, laquelle supprime la réponse humorale chez le receveur syngénique lorsque le sérum de la souris infecté est transféré passivement (CUNNINGHAM et al., 1978). D'ailleurs, dans les infections parasitaires, il a été signalé une possible relation entre l'immunosuppression et l'hyperimmunoglobulinémie. En plus, plusieurs auteurs considèrent que le phénomène d'immunosuppression est lié à l'activation de cellules B polyclonales (CAPRON et CAMUS, 1979).

En regard à nos résultats, le taux très élevé des IgG2a dans le sérum des rats protégés peut être en relation avec des facteurs suppressifs éventuellement responsables de l'absence de protection des rats Fischer mâles par transfert passif.

Les cellules lymphoïdes sensibilisées, mais non les macrophages entraînent une protection contre la phase aiguë à T. cruzi chez des receveurs susceptibles (BURGESS et HANSON, 1979). Dans notre essai, le transfert de cellules sensibilisées un jour avant l'infection provoque seulement une apparition tardive des parasites (vers le 35ème jour) chez le groupe ayant reçu les cellules de la rate par rapport au

groupe ayant reçu les cellules péritonéales (vers le 23ème jour). On peut penser que la quantité des cellules transférées ( $6.10^8$ ) n'était pas assez suffisante pour entraîner une réponse immune. Un nombre inférieur à  $10^8$  cellules immunes ne donne aucune protection significative chez la souris susceptible (NOGUEIRA et al., 1981) et cette protection passive par transfert cellulaire est indépendant de la souche Y ou CL utilisée par l'infection d'épreuve.

En conclusion, l'immunisation active avec les formes épimastigotes de culture à 28°C induit une très bonne protection contre la phase aiguë de la maladie de Chagas chez le rat Fischer mâle (F344), normalement susceptible à l'infection par T. cruzi. Cette protection par deux doses d'immunisation persiste bien, même jusqu'au 140ème jour et elle est caractérisée par l'absence de parasite à l'examen direct microscopique. Néanmoins, une infection sous-patente est observée chez le groupe n'ayant reçu que les épimastigotes de culture. De plus, cet hôte (rat Fischer mâle) en infection chronique est résistant car, une nouvelle dose d'épreuve n'entraîne jamais une phase aiguë détectable à l'examen direct microscopique.

L'étude immunologique humorale démontre la présence de taux très importants d'IgG2a et d'anticorps anti-T. cruzi dans le sérum des rats ayant reçu l'infection d'épreuve. Mais, le transfert passif de ce sérum ne donne aucune protection à des receveurs sains (rat Fischer mâle). Ceci peut s'expliquer, d'une part par la capacité du rat à métaboliser rapidement les anticorps, et d'autre part par des facteurs liés à la souche Tehuantepec de T. cruzi. Ainsi, les trypomastigotes de la souche Tehuantepec répondent aux caractéristiques de la souche du type CL (forme trapue) et peuvent échapper à la réponse immune de

l'hôte grâce au phénomène de modulation antigénique. Enfin, la présence éventuelle de facteurs suppressifs dans le sérum utilisé pour le transfert passif pourrait expliquer l'absence de transfert de l'immunité. Ainsi, les taux très élevés d'IgG2a et la diminution des anticorps anti-T. cruzi chez le rat protégé pourraient être en corrélation avec une infection sous-patente.

#### 4.2. ROLE DES LYMPHOCYTES

##### 4.2.1. Lymphocytes B

Nos résultats démontrent que les lymphocytes B sont nécessaires dans les mécanismes immunitaires de l'hôte contre la phase aiguë de la maladie de Chagas, probablement en raison de leurs implications avec les anticorps. En effet, les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  sont davantage susceptibles à l'infection par T. cruzi par rapport aux rats témoins.

L'efficacité du traitement par le sérum anti- $\mu$  pour supprimer la synthèse d'immunoglobulines a été constatée :

- a) par l'absence des IgM et des IgG2a chez les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  (Tableau VI ). Des études précédentes obtiennent des résultats similaires (BAZIN et al., 1978 ; BAZIN et al., 1980) ;
- b) par l'absence des anticorps anti-T. cruzi, comme il a été montré par la technique d'hémagglutination passive (Fig.10 ). Ceci suggère que les groupes des rats injectés avec du sérum anti- $\mu$  sont incapables de réaliser la synthèse d'anticorps ;
- c) par la stabilité des taux de C4 au cours de l'infection en comparaison avec la diminution de C4 observée chez les groupes témoins (Fig.11 ).

Ces résultats permettent de penser que la voie classique du complément a été activée par les anticorps ou par les anticorps sous la forme de complexes présents chez les rats traités avec du sérum normal de lapin (SNL). La voie alterne du complément a été consommée dans les deux groupes de rats infectés par T. cruzi (Fig. 11). Ces résultats suggèrent que la voie alterne du complément est aussi activée in vivo au cours de l'infection. L'activation de cette voie du complément n'est pas sous la dépendance d'immunoglobulines ; pourtant chez les rats traités avec du sérum anti- $\mu$  on observe une consommation significative de la voie alterne du complément. Par ailleurs, cette diminution est aussi significative chez le groupe traité avec du SNL. Ainsi, l'activation du complément pendant l'infection par T. cruzi semble se dérouler par la voie alterne et la voie classique. Néanmoins, l'activation de la voie classique seulement est sous la dépendance d'anticorps.

Il a été observé une augmentation des IgM et des IgG2a au cours de l'infection par T. cruzi chez les rats traités avec du SNL (Fig. 11) Une augmentation similaire fut observée chez la souris infectée par T. cruzi (CAPBERN et al., 1974). L'augmentation d'immunoglobulines chez les groupes traités avec du SNL est associée à l'apparition des anticorps anti-T. cruzi chez le même groupe de rats (Fig. 10). Mais, le classement selon le sexe du groupe traité avec du sérum anti- $\mu$  et du groupe traité avec du SNL a révélé des taux plus élevés d'anticorps anti-T. cruzi chez les rats mâles par rapport aux taux d'anticorps chez les rats femelles. Cependant, il n'y a aucune différence des taux des IgM et des IgG2a parmi les rats mâles et femelles.

Il convient, par ailleurs, de remarquer la différence de susceptibilité à l'infection par T. cruzi pour les rats mâles et les rats femelles (Fig. 12). Les rats mâles succombent à l'infection, tandis que les rats femelles récupèrent et survivent après la phase aiguë. On peut suggérer que les anticorps hémagglutinants ne sont pas directement impliqués dans les mécanismes immunitaires à T. cruzi

chez les rats mâles. Mais, on ne peut pas assurer le rôle de ces anticorps chez les rats femelles. D'autres facteurs, tel que ceux liés au sexe semble jouer un rôle important contre l'infection par T. cruzi. L'influence du sexe à la susceptibilité à l'infection a été observée chez la souris (McHARDY, 1978).

#### 4.2.2. Lymphocytes T

Nos résultats, concernant le rôle des lymphocytes T dans la maladie de Chagas expérimentale, démontrent que le thymus est aussi impliqué dans les mécanismes immunitaires contre l'infection par T. cruzi. Ainsi, les rats NU/NU sont susceptibles à l'infection, tandis que leurs témoins Nu/+ montrent une résistance à la phase aiguë comme en témoigne l'absence de parasites à l'examen direct microscopique.

Il convient de remarquer que la lignée de rats "NUDE" présente une profonde absence de lymphocytes dépendants du thymus. La synthèse de réagines anti-OVO-DNP (ovalbumine dinitrophenylate), employée comme modèle de réponse immunologique dépendant du thymus, a été trouvée nulle par BAZIN et al. (1980) ; alors que cette réponse est clairement appréciable chez leurs témoins (NU/+).

L'augmentation des IgM et des IgG2a chez le groupe témoin (NU/+) est similaire à celle décrite précédemment pour les rats traités avec du sérum normal de lapin (SNL). En conséquence des différences significatives des taux des IgG2a sont trouvées dès la première semaine suivant l'infection parmi les deux groupes de rats (NU/+ et NU/NU) (Fig. VII). De même, à la 3ème semaine, le titre d'hémagglutination est significativement plus élevé chez le

groupe NU/+ (Fig.13 ). Ainsi, il semble que la synthèse d'anticorps ne soit pas suffisante chez les rats NU/NU. Les rats "NUDE" présentent des taux d'IgG2a plus bas par rapport à leurs témoins NU/+ (BAZIN et al.1980), ce qui peut s'expliquer par le rôle des cellules T dans la régulation des classes et des sous-classes d'immunoglobulines (BRITTLE et PLAYFAIR, 1980). D'après ces observations, on peut suggérer que les cellules T, en jouant le rôle de cellules auxiliaires, peuvent être essentielles pour le développement de l'immunité humorale de l'hôte. Néanmoins, malgré le taux plus élevé d'anticorps anti-T. cruzi, des IgG2a et des IgM chez les rats NU/+, on ne peut pas être certain de leur rôle dans les mécanismes immunitaires.

Dans l'expérience précédente, à propos du déficit lymphocytaire B, nous avons démontré que l'activation du complément pendant l'infection par T. cruzi semble se dérouler par la voie alterne et par la voie classique. Cependant, l'activation de la voie classique seule est sous la dépendance d'anticorps. Différemment, les taux de C4 restent stables (voie classique) au cours de l'infection chez les rats NU/NU et même chez les rats témoins NU/+ (Fig.14 ). Ces résultats peuvent être dus aux taux faibles des IgG2a trouvés chez les rats "NUDE" (NU/NU). La quantité d'immunoglobuline semble insuffisante pour induire directement l'activation de la voie classique ou bien est insuffisante pour la formation des complexes immuns. Dans le cas des témoins NU/+ qui présentent des taux élevés d'immunoglobulines, il faut souligner l'absence de parasites dans le sang circulant à l'examen direct microscopique (Fig.15 ), c'est-à-dire, cette lignée de rats présente une résistance à la phase aiguë de l'infection. Ainsi, l'activation de la voie classique du complément semble se dérouler en présence d'immunoglobulines et en même temps de parasites. Nous rappelons que la consommation de C4 du complément, a eu lieu seulement chez les rats témoins

traités avec du SNL, lesquels ont présenté des taux importants d'immunoglobulines et ont développé une phase aiguë avec des parasites dans le sang (expérience précédente) (Fig.12 ). La voie alterne du complément a été consommée chez les deux groupes de rats (NU/NU et NU/+). On peut penser que des facteurs libérés par le parasites peuvent être capables d'activer la voie alterne du complément.

En conclusion, aussi bien les lymphocytes B que les lymphocytes T jouent un rôle important dans l'immunité contre T. cruzi. Ainsi, les anticorps produits par les lymphocytes B et les lymphocytes T, jouant le rôle de cellules auxiliaires, sont essentiels dans l'expression de l'immunité contre l'infection par T. cruzi. Il est probable qu'une ou d'autres fonctions spécifiques des lymphocytes T soient aussi impliquées dans la réponse immune de l'hôte à T. cruzi, mais il n'est pas possible de les déduire de nos expériences. Ces résultats sont en accord avec des études récentes qui démontrent que des états de déficit immunitaire induits expérimentalement chez l'hôte (BEHBEHANI, 1971 ; ROBERSON et al., 1973 ; SCHUMUNIS et al., 1971) ou l'utilisation de la souris carencée en cellules T (souris "NUDE") (KIERSZEMBAUM et PIENKOWSKI, 1979) rendent plus aiguë l'infection par T. cruzi.

On peut observer aussi que le complément peut être activé par la voie classique et par la voie alterne. Pourtant, il semble que la présence des anticorps et des parasites dans le sang circulant (présence d'une phase aiguë) soient nécessaires pour que la voie classique puisse être activée. Il a été observée que l'implication de la voie classique du complément peut être due à l'activation par les complexes entreposés au niveau cellulaire ou à l'activation par des complexes circulants antigène parasitaire-anticorps anti-T. cruzi.

suite à une parasitémie élevée (RIERA et al., 1980). Cependant, l'activation de la voie alterne ne dépend pas de la présence d'anticorps, mais on peut suggérer que cette voie peut être activée par des facteurs libérés par le parasite. Des études in vitro démontrent que l'activation de la voie alterne du complément est plus importante que la voie classique dans la lyse immune des formes trypomastigotes sanguicoles (KRETTLI et al., 1979). Si les résultats obtenus in vitro peuvent être appliqués in vivo, on pourrait ainsi mieux comprendre les résultats, à première vue contradictoire, que nous avons obtenus

D'autre part, la participation relative du complément dans les mécanismes de défense contre les trypanosomatidae semble être une caractéristique de l'interaction individuelle hôte-trypanosome (DALMASSO et JARVINEN, 1980).

Enfin, si l'implication des anticorps et des cellules T dans l'immunité à T. cruzi est vraisemblable, les mécanismes qui permettent d'expliquer l'évasion du parasite à cette réponse et le contrôle de la parasitémie pendant la phase chronique restent à résoudre. Probablement, le complément (KRETTLI et al., 1979 ; SANTORO et al., 1979) et des cellules effectrices (ABRAHAMSOHN et da SILVA, 1977 ; MADEIRA et al., 1979 ; SANDERSON et al., 1975) peuvent participer in vivo avec les anticorps pour aboutir à un mécanisme immunitaire vis-à-vis de T. cruzi.

## CONCLUSION

--:--:--:--:--:--

Il est bien établi que Trypanosoma cruzi présente peu de spécificités vis-à-vis des différentes espèces de mammifères ; toutefois, la susceptibilité à l'infection par ce parasite est variable suivant les hôtes (GOBLE, 1970). Parmi les diverses espèces d'animaux expérimentalement infectés, la souris a été le plus souvent utilisée en raison de sa susceptibilité à T. cruzi, de sa facilité de manipulation et de la connaissance approfondie de ses capacités immunologiques. De plus, la souris a été proposée comme modèle expérimental aussi bien de la phase aiguë que de la phase chronique de la maladie de Chagas. Par contre, peu de travaux ont été effectués sur le modèle rat qui présente une résistance relative à cette infection. Ces animaux développent une infection plus faible que celle observée chez la souris infectée avec la même souche (PIZZI et al., 1953).

Dans des travaux récents, réalisés dans notre laboratoire, les observations précédentes ont été confirmées à propos de la résistance du rat à l'infection par T. cruzi. En effet, l'étude de huit lignées différentes de rats a donc permis de les classer selon la sévérité de la phase aiguë en 3 groupes (RIVERA-VANDERPAS, 1980) :

1. - Groupe résistant n'ayant pas développé de parasitémie (August, Dark agouti, Lou/M) ;
2. - Groupe de basse susceptibilité qui a montré une faible parasitémie (Lister, Lewis, Brown norway, Wistar Ag, Fischer femelle, F344) (Ces rats pourraient présenter une chronicité pouvant

être mise en évidence par des études histopathologiques) ;

3. - un troisième groupe très susceptible formé seulement par la lignée de rat Fischer mâle (F344) qui développe la phase aiguë de la maladie en succombant (ceci démontre l'absence d'immunité naturelle) ; tandis que le rat Fischer femelle (F344) développe la phase aiguë de l'infection et récupère.

Cette différence de susceptibilité entre le rat Fischer mâle et femelle semble dépendre du sexe. Ceci a été aussi signalé chez la souris (HAUSCHKA, 1947 ; GOBLE, 1951 ; GALLIARD et al., 1962).

L'étude du comportement de l'hôte : rat Fischer mâle vis-à-vis de la souche Tehuantepec de T. cruzi a été envisagée dans ce travail (RODRIGUEZ, 1980). Ainsi, une apparition retardée des parasites et une augmentation progressive de la parasitémie jusqu'à la mort de l'animal ont été observées. La virulence de la souche ne varie pas en fonction de la dose d'inoculation. Ceci est en accord avec les travaux réalisés chez la souris où PHILLIPS (1960) a montré que la réduction de la dose d'infection ne modifie pas l'intensité de la réponse, même si elle peut apparaître de façon retardée. D'ailleurs, l'immunisation de cette lignée de rat a été induite de façon active à l'aide de formes épimastigotes de culture de T. cruzi. La particularité de cette immunisation réside dans le fait que les animaux immunisés survivants n'ont jamais présenté de parasite à l'examen direct microscopique. Par contre, chez la souris, l'immunisation par des épimastigotes de culture, donne une faible parasitémie après l'infection d'épreuve (MENEZES, 1976).

Les expériences de protection active, montrées dans ce travail, en utilisant le même schéma d'immunisation, nous a permis de constater que les rats ayant reçu deux doses d'épimastigotes, possèdent une immunité vis-à-vis de la phase aiguë de la maladie. Mais, se pose le

problème de l'acquisition de cette immunité : s'agit-il d'une véritable immunisation par les antigènes libérés lors de la lyse des épimastigotes ou d'une acquisition de cette protection en raison d'une infection sous-patente non détectable par le seul contrôle microscopique directe de la parasitémie ? En effet, chez les animaux immunisés n'ayant pas reçu l'infection d'épreuve, la culture de cellules de la rate a permis de montrer la présence de formes trypomastigotes chez ces animaux, prouvant l'existence d'une infection sous-patente. Mais, ce type de question n'est pas propre au modèle rat ; depuis longtemps dans le modèle souris, différents auteurs ont montré que l'immunisation avec des formes vivantes donne une parasitémie sous-patente. Seuls des immunisations avec des broyats ou des préparations antigéniques pourront résoudre ce problème. Les nombreux travaux, effectués chez la souris avec différentes méthodes physiques ou chimiques de préparation des antigènes pour induire une protection, ne donnent pas une immunisation totale (TEIXEIRA, 1977 ; HANSON, 1977 ; McHARDY et ELPHICK, 1980) ; quoi qu'il en soit, le rat Fischer mâle peut être proposé comme un modèle pour l'étude de la phase aiguë de l'infection par T. cruzi.

D'ailleurs, l'évolution des anticorps anti-T. cruzi, décelés par les méthodes d'hémagglutination passive et de trypanolyse chez ces animaux immunisés, permettent d'entrouvrir différentes voies d'études : - la relation entre les anticorps humoraux et l'expression antigénique du parasite ; - les éventuels phénomènes d'immunosuppression au cours de cette immunisation ou de cette infection sous-patente. Ainsi, il semble exister une corrélation entre la parasitémie sous-patente et ces deux phénomènes. Dans les expériences in vivo et in vitro chez la souris des phénomènes d'immunosuppression ont été montrés dans la maladie de Chagas, au début de la phase chronique,

au moment où les anticorps humoraux commencent à être très importants. De plus, ce phénomène d'immunosuppression pourrait être lié à l'augmentation importante des IgG2a. En effet, l'activation des cellules B polyclonales induites par T. cruzi peut être responsable des anomalies dans la synthèse et la sécrétion des immunoglobulines au cours de l'infection humaine à T. cruzi (ORTIZ-ORTIZ, 1980).

Les essais que nous avons réalisés sur l'effet protecteur du sérum de rats immuns (sérum présentant des titres élevés d'anticorps anti-T. cruzi et des taux significatifs d'IgG2a) a donné des résultats négatifs. Ceci, peut être dû à la souche Tehuantepec de T. cruzi qui correspondrait d'après nos résultats à la souche type CL décrite par BRENER (1973). Ainsi, des études de transfert passif ont démontré que le cours de la parasitémie et le pourcentage de mortalité ne sont pas affectés chez les souris recevant du sérum homologue (CL) ou hétérologue (Y) et puis inoculées avec des trypomastigotes de la souche CL ; tandis qu'une bonne protection est obtenue lorsque l'infection d'épreuve est effectuée avec la souche Y (KRETTLI et BRENER, 1976).

La mise en évidence par CUNNINGHAM et al. (1978) de facteurs suppressifs dans le sérum de souris infectées pourrait éventuellement justifier nos résultats négatifs concernant le transfert

En ce qui concerne nos expériences menées sur les animaux ayant un déficit lymphocytaire, une absence de développement de l'immunité acquise a été observée chez les rats Fischer femelles déficients en lymphocytes B et les rats NU/NU déficients en lymphocytes T. Ces deux groupes de rats présentent une haute parasitémie et succombent en phase aiguë de l'infection. Par contre, leurs témoins : - le rat

Fischer femelle traité avec du sérum normal de lapin (SNL) présente une faible parasitémie, et le rat NU/+ ne présente pas de parasitémie. Ceci montre la participation des lymphocytes B et T dans l'infection par T. cruzi. Divers traitements pour induire des états de déficit immunitaire (rayonnement X, thymectomie néonatale, sérum anti-thymocyte) chez la souris et même chez le rat (BEHBEHANI, 1971 ; SCHMUNIS et al., 1971 ; ROBERSON et al., 1973) et l'utilisation de la souris NU/NU (KIERSZENBAUM et PIENKOWSKI, 1979) provoquent une exacerbation de l'infection à T. cruzi.

Une étude humorale a été réalisée au cours de l'infection chez les rats traités avec du sérum anti- $\mu$ , les rats NU/NU et leurs témoins. Le groupe des rats traités avec du SNL et le groupe NU/+ présentent une augmentation des IgM et IgG2a. Par contre, il est observé une absence d'immunoglobulines chez le groupe traité avec du sérum anti- $\mu$ , et une différence significative des taux des IgG2a chez le groupe NU/NU par rapport au groupe NU/+. Ainsi, l'analyse de ces résultats montre que les lymphocytes B sont impliqués dans la réponse anticorps et que les lymphocytes T jouent le rôle de cellules auxiliaires. Des études de transfert de cellules sensibilisées chez la souris démontrent que l'immunité dépend des cellules B et que les cellules T jouent le rôle de cellules auxiliaires (SCOTT, 1979). D'autre part, la voie classique du complément n'est activée que chez le groupe de rats traités avec du SNL, lequel a présenté une faible parasitémie et des taux importants d'IgM et d'IgG2a. Par contre, la voie alterne est activée chez l'ensemble des quatre groupes de rats étudiés ; cette activation ne dépend pas de la présence des anticorps, mais probablement pourrait être due à des facteurs libérés par le parasite. Ainsi, la voie alterne du complément semble être plus importante que la voie classique. Des observations in vitro suggèrent que la voie alterne du complément est plus importante que la voie classique dans le contrôle de la parasitémie (KRETTLI et al., 1979).

Ces résultats démontrent clairement la participation des lymphocytes B et T et probablement du complément dans la réponse immune de l'hôte vis-à-vis de T. cruzi. Néanmoins, l'immunité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps pourrait aussi être impliqué dans un mécanisme effecteur vis-à-vis de T. cruzi (SANDERSON et al., 1975 ; KIPNIS et al., 1981).

Nous avons remarqué l'absence d'une immunité naturelle chez le rat Fischer mâle ; tandis que le rat Fischer femelle survit à une phase aiguë. D'abord, il semble que cette différence de susceptibilité à l'infection soit liée au sexe. Néanmoins, la participation de lymphocytes B dans cette survie pour les rats Fischer femelles est évidente comme le montrent les expériences chez les rats Fischer femelles traités avec du sérum anti- $\mu$ , puis infectés par T. cruzi, expériences conduisant à la mort des animaux. Ainsi, la différence de susceptibilité entre le rat Fischer mâle et femelle pourrait dépendre soit d'un facteur génétique lié au chromosome X ou un facteur hormonal, soit au mécanisme immun humoral.

D'après ces résultats, l'utilisation du Rat Fischer mâle et femelle vis-à-vis de la souche Tehuantepec de T. cruzi dans la maladie de Chagas expérimentale s'insère dans le cadre des études des relations hôte-parasite généralement menées chez la souris. Cependant, il serait intéressant de savoir si la souche type Y (forme fine) présente sur cette lignée de rat un comportement similaire à celui observé avec la souche Tehuantepec . Diverses expériences montrent que l'hétérogénéité des populations de parasites rendent difficile la compréhension de la phase initiale de la réponse immune contre T. cruzi. Alors que la stabilité hôte-parasite dans la phase chronique

est indépendante de la souche de T. cruzi. Ainsi, la lignée de rat Fischer (F344) utilisée dans notre laboratoire comme modèle d'étude de la schistosomiase et de la filariose expérimentale, peut être aussi proposée comme un modèle pour l'étude de la phase aiguë de la maladie de Chagas.



- ANDRADE, S.G. : Caracterização de cepos do Trypanosoma cruzi isoladas no reconcavo baiano (contribuição ao estudo da patologia geral da doença de chagas em nosso meio). Rev. Pat. Trop., 3 : 65-121 (1974).
- ANDRADE, S.G. : Biological characterization of strains of Trypanosoma cruzi : Anais. Cong. Int. Doença de Chagas (Rio de Janeiro) : p. N9-N13 (1974).
- ANDRADE, S.G., ANDRADE, Z.A. : Doença de chagas e alterações neuronais no plexo de averbach. Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo, 8 : 219-224 (1966).
- ANDRADE, S.G., ANDRADE, Z.A. : Aspectos anatomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18 : 268-275 (1976).
- ANSEMI, A., GURDIEL, O., SUAREZ, J.A., ANSEMI, G. : Disturbances in the AV conduction system in chagas myocarditis in the dog. Cir. Res., 20 : 56-64 (1967).
- ANSEMI, A., MOLEIRO, F., SUAREZ, R., SUAREZ, J.A., RUESTA, V. : Ventricular aneurysms in acute experimental chagas myocardopathy. Chest, 59 : 654-658 (1971).
- ANSEMI, A., PIFANO, F.C., SUAREZ, J.A., DOMINGUEZ, A., VASQUEZ, A.D., ANSEMI, G. : Experimental Schizotrypanum cruzi myocarditis. Amer. Heart J., 70 : 638-656 (1965).
- ANSEMI, A., PIFANO, F., SUAREZ, J.A., GURDIEL, O. : Myocardopathy in chagas disease. I. Comparative study of pathologic finding in chronic human and experimental chagas myocarditis. Amer. Heart J., 72 : 469-481 (1966).

- ANZIANO, D.F., DALMASSO, A.P., LELCHUK, R., VASQUEZ, C. : Role of complement in immune lysis of Trypanosoma cruzi. *Infect. Immun.*, 6 : 860-864 (1972).
- BAFORT, J.M., KAGERUKA, P., TIMPERMAN, G.T. : A new highly susceptible laboratory animal for chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 67 : 434-435 (1973).
- BAZIN, H., BECKERS, A., QUERINJEAN, P. : Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. *Eur. J. Immunol.*, 4 : 44 (1974).
- BAZIN, H., CAPRON, M., JOSEPH, M., DESSAINT, J.P., PAUWELS, R. : Effect of neonatal infection of anti- $\mu$  antibodies on immunity to schistosomes (S. mansoni) in the rat. *J. Immunol.*, 124 : 2373-2377 (1980).
- BAZIN, H., PLATTEAU, B., BECKERS, A., PAUWELS, R. : Differential effect of neonatal infections of anti- $\mu$  or anti- $\xi$  antibodies on the synthesis of IgM, IgD, IgE, IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG2c immunoglobulin classes. *J. Immunol.*, 121 : 2083-2087 (1978).
- BEHBEHANI, M.K. : Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi infections in X-irradiated and in thymectomized mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med.*, 65 : 265 (1971).
- BERGENDI, L., KNIERIM, F., APT, W. : Trypanosoma cruzi : Immunological properties of a soluble extract of culture forms. *Exp. Parasitol.*, 28 : 258-262 (1970).
- BERNAL-VASQUEZ, J. : Contribution à l'étude de l'immunodépression au cours de l'infection expérimentale à T. cruzi chez la souris. Mémoire, D.E.R.B.H., Fac. de Médecine de Lille (1978).
- BICE, D.E., ZELEDON, R. : Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi. *J. Parasitol.*, 56 : 663-670 (1970).

- BRENER, Z. : Actividade terapeutica do 5-nitrofuraldeido-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duracao prolongada na infecça experimental do camundongo pelo Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 3 : 43-49 (1961).
- BRENER, Z. : Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 4 : 389 (1962).
- BRENER, Z. : Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trop. Med. Parasit., 59 : 19-26 (1965).
- BRENER, Z. : The behaviour of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the bloodstream of normal and immune mice. Ann. Trop. Med. Paras., 63 : 215-220 (1969).
- BRENER, Z. : Life cycle of Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 13 : 171-178 (1971).
- BRENER, Z. : Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol., 27 : 347-382 (1973).
- BRENER, Z. : Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol., 18 : 247-292 (1980).
- BRENER, Z., CHIARI, E. : Observações sobre a fase chônica da doença de chagas experimental no camundongo. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 5 : 128-132 (1963).
- BRENER, Z., COSTA, C.A.G., CHIARI, C. : Differences in the susceptibility of Trypanosoma cruzi strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med Trop. Sao Paulo, 18 : 450-455 (1976).
- BRITTLE, M.P., PLAYFAIR, J.H.L. : The role of T cells in regulating immunoglobulin class and subclass. Immunology, 41 : 743-752 (1980).

- BUDZKO, D.B., PIZZIMENTI, M.C., KIERSZENBAUM, F. : Effects of complements depletion in experimental chagas'disease : immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect. Immun., 21 : 86-90 (1975).
- BURGESS, D.E., HANSON, W.L. : Adoptive transfer of protection against Trypanosoma cruzi with lymphocytes and macrophages. Infect. Immun., 25 : 838-843 (1979).
- CAMARGO, M.E., AMATO NETO, V. : Anti-T. cruzi antibodies as serological evidence of recent infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 16 : 200-202 (1974).
- CAPBERN, A., MATTERN, P., PAUTRIZEL, R. : Etude comparative du taux des protéines sériques au cours de trypanosomoses à Trypanosoma gambiense et à Trypanosoma cruzi chez la souris; Exp. Parasitol., 35 : 86-91 (1974).
- CAPRON, A., CAMUS, D. : Immunoregulation by parasite extracts. Springer Semin. Immunopathol., 2 : 69-77 (1979).
- CAPRON, A., CAMUS, D., DESSAINT, J.P., LE BOUBENEC-FISCHER, E. : Alterations de la réponse immune au cours des infections parasitaires. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 128C : 541-556 (1977).
- CAPRON, A., CAPRON, M. : Immunité dans les maladies parasitaires. INSERM, 79 : 105-114 (1978).
- CASTELO BRANCO, A.Z.C.L. : Proteção mediada por imunoglobulina G em camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 16 : 200-202 (1978).
- CHAGAS, C. : Nova tripanosomiase humana estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Osw. cruz, 1 : 159-218 (1909).<sup>(2)</sup>

- CHIARI, E., TAFURI, W.L., BAMBIRRA, E.A., RIBEIRO, T.O., CASTRO, L.P., SALGADO, J.A., AMARAL DE PADUA, R.A. : The rabbit as a laboratory animal for studies on chagas'disease. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 22 : 207-208 (1980).
- CERISOLA, J.A., ALVAREZ, M., BOCK, M., WEGNER, D. : A comparison of a new antigen from amastigotes of Trypanosoma cruzi and an antigen from epimastigotes for the diagnosis of chagas'disease by the indirect immunofluorescence test. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 13 : 162-166 (1971).
- CLINTON, B.A., ORTIZ-ORTIZ, L., GARCIA, W., MARTINEZ, T., CAPIN, R. : Trypanosoma cruzi : Early immune responses in infected mice. Exp. Parasitol., 37 : 417-425 (1975).
- CONEJOS, M. : Cultivo de Schizotrypanum cruzi en embryon de pollo. Ann. Inst. Med. Reg. Tucuman, 2 : 175-183 (1947)<sup>(1)</sup>
- COVER, B., GUTTERIDGE, W.E., WHARTON, F.P. : The course of infection of Trypanosoma cruzi in  $\gamma$ -irradiated rats. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72 : 596-601 (1978).
- CULBERSTON, J.T., KESSLER, W.R. : Age resistance of mice to Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 28 : 155-158 (1942).
- CULBERSTON, J.T., KOLODNY, M.H. : Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 24 : 83-90 (1938).
- CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E., ROWLAND, E.C. : Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice. Inf. Immun., 22 : 155-160 (1978).
- DALMASSO, A.P., JARVINEN, J.A. : Experimental chagas'disease in complement-deficient mice and guinea pigs. Inf. Immun., 28 : 434-440 (1980).

- DA SILVA, L.H.P., NUSSENZWEIG, V. : Sobre una cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol. S. Paulo, 20 : 191-207 (1953).
- DIAS, E. : Immunité naturelle des animaux à sang froid vis-à-vis de l'infection par le Trypanosoma cruzi. C.R. Soc. Biol. (Paris), 112 : 1474-1475 (1933).<sup>(3)</sup>
- DIAS, E. : Chagas-krankheit. Chagas'disease. In : Rodenwaldt's Welt-Seuchen Atlas, 2 : 135-140 (1956).<sup>(2)</sup>
- FERNANDES, J.F., HALSMAN, M., CASTELLANI, O. : Effect of actinomycin D on the infectivity of Trypanosoma cruzi. Nature (London), 207 : 1004-1005 (1965).
- FERNANDES, J.F., HALSMAN, H., CASTELLANI, O. : Effect of mitomycin C, Actinomycin D and pyrimidine analogs on the growth rate, protein and nucleic acid synthesis and on the viability of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol., 18 : 203-210 (1966).
- FRANCO, M.F. : Cardite experimental do cobaio pela cepa  $\gamma$  do Trypanosoma cruzi. Correlação entre a histopatologia e a presença de antígenos parasitários identificados por imunofluorescência indirecta. Tese Botucatu, Sao Paulo (1972).<sup>(1)</sup>
- GALLIARD, H., LAPIERRE, J., COSTE, M. : Contribution à l'étude d'une souche pathogène de Trypanosoma cruzi (souche Tulahuen, Chile). Effets de la splénectomie, des traitements par la cortisone et l'hormone somatotrope. Ann. Parasit. Hum. Comp., 37 : 495-503 (1962).
- GOBLE, F.C. : Studies on experimental chagas disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. J. Parasitol., 37 : 408-414 (1951).

- GOBLE, F.C. : Observations on experimental Chagas'disease in dogs  
Am. J.Trop. Med. Hyg., 1 : 189-204 (1952).
- GOBLE, F.C. : Observations on cross immunity in experimental chagas  
disease in dogs. An. Congr. Int. Doença de Chagas, 2 : 603-611  
(1961).
- GOBLE, F.C. : Vaccination against experimental chagas'disease with  
homogenates of culture forms of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol.,  
50 : 19 (1964).
- GOBLE, F.C. : South American Trypanosomes. in : Immunity to parasitic  
animals, vol. 2, Jackson, Herman, Singer. Appleton-century-crofts  
(1970).
- GONZALEZ-CAPPA, S.M., KLOETZEL, J., KATZIN, A.M., DOS SANTOS, R.R. :  
Trypanosoma cruzi : Activity of immune sera on surface antigens.  
Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 22 : 275-280 (1980).
- GONZALEZ-CAPPA, S.M., SCHMUNIS, G.A., TRAVERSA, O.C., YANOVSKI, J.F.,  
PARODI, A.S. : Complement-fixation tests, skin tests, and experi-  
mental immunization with antigens of Trypanosoma cruzi prepared  
under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg., 17 : 709-715 (1968).
- GUIMARAES, J.P., MIRANDA, D. : Megaesofago em macaco rhesus com 10  
anos de infecção chagásica. Anais Cong. Int. Doença de Chagas  
(Rio de Janeiro), 2 : 657-671 (1961).
- GUTTERIDGE, W.F., COVER, B., GABORAK, M. : Isolation of blood and  
intracellular forms of Trypanosoma cruzi from rats and other  
rodents and preliminary studies of their metabolism. Parasitology,  
76 : 159-176 (1978).

- HANSON, W.L. : Immunology of american trypanosomiasis (Chagas'disease).  
Imm. Paras. Inf., 17 : 222-234 (1976).
- HANSON, W.L. : Immune response and mechanisms of resistance in  
Trypanosoma cruzi. Pan. Amer. Health Org., 347 : 22-34 (1977).
- HAUSCHKA, T.S. : Sex of host as a factor in Chagas disease. J. Parasit.,  
33 : 399-404 (1947).
- HAUSCHKA, T.S., GOODWIN; M.B., PALMQUIST, J., BROWN, E. : Immunological  
relation ship between seven strains of Trypanosoma cruzi and its  
application in the diagnosis of chagas'disease. Amer. J. Trop. Med.,  
30 : 1-16 (1950).
- HEWITT, R., ENTWISTLE, J., GILL, E. : Quantitative determinations of  
critical mortality periods in untreated and treated infections with  
the B strain of Trypanosoma cruzi in mice. J. Parasit., 49 : 22-30 (1963)
- HOWELLS, R.E., CHIARI, C.A. : Observations on two strains of Trypano-  
soma cruzi in laboratory mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., 69 :  
435-438 (1975).
- JOHNSON, P., NEAL, R.A., GALL, D. : Protective effect of killed trypano-  
somes vaccines with incorporated adjuvants. Nature (London),  
200 : 83 (1963).
- KAGAN, I.G., NORMAN, L. : Immunologic studies on Trypanosoma cruzi.  
I. Susceptibility of CFW stock mice for the "Tulahuen" strain  
of T. cruzi. J. Inf. Dis., 107 : 165-167 (1960).
- KAGAN, I.G., NORMAN, L. : Immunogic studies on Trypanosoma cruzi.  
III. Duration of acquired immunity in mice initially infected  
with a north american strain of T. cruzi. J. Infect. Dis., 108 :  
213-217 (1961).

- KANEDA, Y. : Protective effect of disintegrated culture forms of Trypanosoma cruzi on the mortality of mice after challenge. Japan. J. Parasitol., 3 : 146-153 (1973).
- KIERSZENBAUM, F. : Protection of congenitally athymic mice against Trypanosoma cruzi infection by passive antibody transfer. J. Parasitol., 66 : 673-675 (1980).
- KIERSZENBAUM, F., BUDZKO, D.B. : Immunization against experimental chagas'disease by using culture forms of Trypanosoma cruzi killed with a solution of sodium prechlorate. Inf. Imm., 12 : 461-465 (1975).
- KIERSZENBAUM, F., IVANYI, J., BUDZKO, D.B. : Mechanisms of natural resistance trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. Immunology, 30 : 1-6 (1976).
- KIERSZENBAUM, F., PIEWKOWSKI, M.M. : Thymus-dependent control of host defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Inf. Imm., 24 : 117-120 (1979).
- KIPNIS, T.L., JAMES, S.L., SHER, A., DAVID, J.R. : Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 30 : 47-53 (1981).
- KLOETZEL, J., CAMARGO, M. : Immunological typing of Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18 : 142 (1976).
- KLOETZEL, J., CAMARGO, M.E., GIOVANNINIS, V.L. : Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of T. cruzi. J. Protozool., 22 : 259-261 (1975).
- KLOETZEL, J., DEANE, M.P. : Presence of immunoglobuline on the surface of bloodstream T. cruzi. Capping during diferentiation in culture. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 19 : 397-402 (1977).

- KOLODNY, M.H. : Studies on age resistance against trypanosome infections. VII. The influence of age upon the immunological response of rats to infection with Trypanosoma cruzi. Amer. J. Hyg., 31 : 1-8 (1940).
- KRAMER, A.W. : Experimental chagas'disease in purebred beagle dog acutely infected with Trypanosoma cruzi (B strain). Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 14 : 291-300 (1972).
- KRETTLI, A.U., Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguineos de camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Thesis, Univ. of Minas Gerais, 111pp (1978)<sup>(3)</sup>
- KRETTLI, A.U., BRENER, Z. : Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol., 116 : 755-760 (1976).
- KRETTLI, A.U., CARRINGTON, P.W., NUSSENZWEIG, R.S. : Membrane bound antibodies of bloodstream Trypanosoma cruzi in mice : strain differences in susceptibility to complement mediated-lysis. Clin. Exp. Immunol., 3 : 1-8 (1979).
- KRETTLI, A.U., NUSSENZWEIG, R.S. : Presence of immunoglobulins on the surface of circulating trypomastigotes of T. cruzi resulting in activation of the alternative pathway of complement and lysis. Pan Amer. Health Org., 347 : 71-73 (1977).
- KUHN, R.E., DURUH, S.K. : The onset of immune protection in acute experimental chagas'disease in C<sub>3</sub>H(HE) mice. Int. J. Parasitol., 5 : 241-244 (1975).
- KUMAR, R., KLINE, I.K., ABELMANN, W.H. : Experimental Trypanosoma cruzi myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. Am. J. Path., 57 : 31-48 (1969).

- LACHMANN, P.J., HOBART, M.J. : Complement technology. In : D.M. Weir (ed), Handbook of Exp. Immunol., 3rd Blackwell Scientific Publications, Oxford, 5A1-5A23 (1978).
- LAGUENS, R.P., CABEZA, M.P., BASOMBRIO, M.A., CHAMBO, G.J., COSSIO, P.M., ARANA, R.M., GELPI, R. : Infeccion cronica del ratón con Trypanosoma cruzi. Modelo experimental de enfermedad de chagas. Medicina (Buenos Aires) 40 : 33-39 (1980).
- LELCHUK, R., DALMASSO, A.P., INGLESINI, C.L., ALVAREZ, M., CERISOLA, J.A. : Immunoglobulin studies in serum of patients with american trypanosomiasis (Chagas disease). Clin. Exp. Immunol., 6 : 547-555 (1970).
- LELCHUK, R., PATRUCCO, A., MANNI, J.A. : Studies of cellular immunity in chagas'disease. Effect of glutaraldehyde-treated specific antigen on inhibition of leukocyte migration. J. Immunol., 112 : 1578-1581 (1974).
- LEON, L.L., LEON, W., CHAVES, L., COSTA, S.C.G., QUEIROZ CRUZ, H., BRASCHER, H.M., OLIVEIRA-LIMA, A. : Immunization of mice with Trypanosoma cruzi polyribosomes. Inf. Imm., 27 : 38-43 (1980).
- LIMA PEREIRA, F.E. : Imunodepressao durante a fase aguda da infeccao de camundongos albinos pelo Trypanosoma cruzi cepa ( $\gamma$ ). Ciência e cultura, 28 : 528 (1977).
- MADEIRA, E.D., ANDRADE, A.F.B., BUNN-MORENO, M.M., BARCINSKI, M. : Antibody-dependent cellular cytotoxicity of Trypanosoma cruzi : characterization of the effector cell from normal human blood. Inf. Imm., 25 : 34-38 (1979).

- MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. : Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.*, 2 : 235-254 (1965).
- MARCIPAR, A.J., LENTWOJT, E., SEGARD, E., AFCHAIN, D., FRUIT, J., CAPRON, A. : PNA affinity chromatography of Trypanosoma cruzi glycoproteins. *Par. Immunol.* (soumis à publication) (1981).
- MARSDEN, P.D., VOLLER, A., SEAH, S.K.K., HAWKEY, C., GREEN, D. : Behaviour of a peru strain of Trypanosoma cruzi in Rhesus monkeys. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 4 : 177-182 (1970).
- MAYER, M., ROCHA LIMA, H. : El comportamiento del Schizotrypanum cruzi en animales homeotermicos y artropodos. *Arch. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med.*, 2 : 10-49 (1954).
- MAZZOTI, L. : Variations in virulence for mice and guinea pigs in strains of Trypanosoma cruzi, chagas from different species of bugs (Triatomidae) from different localities in Mexico. *Am. J. Hyg.*, 31 : 67-81 (1940).
- MCHARDY, N. : Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. *Tropenmed. Paras.*, 28 : 195-201 (1977).
- MCHARDY, N. : Effect of sex of mice in relation to their response to immunization with vaccines prepared from Trypanosoma cruzi. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 72 : 202-202 (1978).
- MCHARDY, N., ELPHICK, J.P. : Immunization of mice against infection with trypanosoma cruzi. Cross-immunization between five strains of the parasite using freeze-thawed vaccines containing epimastigotes of up to five strains. *Int. J. Parasitol.*, 8 : 25-31 (1978).

- McHARDY, N., ELPHICK, J.P. : Persistence of parasitemia in vaccinated mice challenged with very low numbers of Trypanosoma cruzi.  
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74 : 670 (1980).
- MELO, R.C., BRENER, Z. : Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol., 64 : 475-482 (1978).
- MEIRELLES, M.N.L., ARAUJO-JORGE, T.C., SOUZA, W. : Interaction of epimastigote and trypomastigote forms of Trypanosoma cruzi with chicken macrophages in vitro. Parasitol., 81 : 373-381 (1980).
- MENEZES, H. : Active immunization of dogs with a non-virulent strain of T. cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 21 : 258-263 (1969).
- MENEZES, H. : Aplicação da vacina viva avirulenta de Trypanosoma cruzi em seres humanos (nota previa). Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 13 : 144-154 (1971).
- MENEZES, H. : The protective effect of the epimastigote forms of the PF strain of Trypanosoma cruzi against a virulent homologous infection. Tropenmed. Parasit., 27 : 418-421 (1976).
- MEYER, H., DE SOUZA, W. : Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. J. Protozool., 23 : 385-390 (1976).
- MEYER, H., DE OLIVEIRA, M.X. : Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue culture : A 4-year study. J. Parasitol., 39 : 91 (1948).
- MILES, M.A., MARDSEN, P.D., PETTIT, L.E., DRAPER, C.C., WATSON, S., SEAH, S.K.K. : Experimental Trypanosoma cruzi infection in Rhesus monkeys. III. Electrocardiographic and histopathological finding. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 73 : 528-532 (1979).

- MILES, M.A., TOYE, S.C., GODFREY, D.G. : The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of T. cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 71 : 217-225 (1977).
- MUNIZ, J., BORRIELLO, A. : Estudo sobre a ação lítica de diferentes soros sobre as formas de cultura e sanguícolas do Schizotrypanum cruzi. Rev. Bras. Biol., 5 : 563-567 (1945).<sup>(3)</sup>
- MUNIZ, J., DE FREITAS, : Contribuição para a diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacarídeos de precipitação de fixação de complemento e de hipersensibilidade os testes de floculação. Rev. Bras. Biol., 4 : 421-438 (1944).<sup>(3)</sup>
- MUNIZ, J., NOBREGA, G., CUHNA, M. : Ensaios de vacinação preventiva e curativa nas infecções pelo Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 44 : 529-541 (1946).<sup>(3)</sup>
- NEAL, R.A., JOHNSON, P. : Immunisation against Trypanosoma cruzi using killed antigens and with saponin or adjuvant. Acta Trop., 34 : 87-96 (1977).
- NERY-GUIMARAES, F., LAGE, H.A. : A refratariedade das aves ao Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. II. Refratariedade das galinhas desde o nascimento: persistência da refratariedade após bursectomia ; infecções em ovos embrionados. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 70 : 97-107 (1972).
- NIMI, S. : Studies on experimental Chagas. Jap. J. Exp. Med., 13 : 543-564 (1935).
- NOGUEIRA, N., BIANCO, C., COHN, Z. : Studies of the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. J. Exp. Med., 142 : 224-229 (1975).

- NOGUEIRA, N., ELLIS, J., CHAPLAN, S., COHN, Z. : Trypanosoma cruzi :  
In vivo and in vitro correlation between T-cell activation and  
susceptibility in inbred strains of mice. Exp. Parasitol., 51 :  
325-334 (1981).
- NUSSENZWEIG, J., DEANE, L.M., KLOETZEL, J. : Diversidade na consti-  
tuição antigênica de amostras de Trypanosoma cruzi isolados do  
homen e de gambas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 4 : 409-410  
(1962).
- NUSSENZWEIG, V., DEANE, L.M., KLOETZEL, J. : Differences in antigenic  
constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol., 14 :  
221-232 (1963).
- NUSSENZWEIG, V., GOBLE, F.C. : Further studies on the antigenic  
constitution of strains of Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.  
Exp. Parasitol., 18 : 224-228 (1966).
- O.M.S. : Immunology of Chagas' disease. Bull. W.H.O., 50 : 459-472  
(1974).
- ORTIZ-ORTIZ, L., PARKS, D.E., RODRIGUEZ, M., WEIGLE, W.A. : Polyclonal  
B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection.  
J. Immunol., 124 : 121 (1980).
- PACKCHANIAN, A., SWEETS, A. : Infectivity of Trypanosoma cruzi after  
cultivation for 13 years in vitro without animal passage. Proc.  
Soc. Exp. Biol. Med., 64 : 169 (1947).
- PELLEGRINO, J. : A reação intradérmica com antígeno do Schizotrypanum  
cruzi na doença de chagas experimental do cão. Rev. Bras. Biol.,  
6 : 443-450 (1946).<sup>(2)</sup>
- PHILLIPS, N.R. : Experimental studies on the quantitative transmission  
of Trypanosoma cruzi : Considerations regarding standardization  
of material. An. Trop. Med. Parasitol., 54 : 60-70 (1960).

- PEREIRA, N.M., SOUZA, W., MACHADO, R.D., CASTRO, F.D. : Isolation and properties of flagella of Trypanosomatids. J. Protozool., 24 : 511-514 (1977).
- PESSOA, S.B., CARDOSA (A.F.) : Nota sôbre a imunologia cruzada na leishmaniose e na molestia de chagas. Hospital (Rio de Janeiro), 21 : 187-193 (1942)<sup>(2)</sup>
- PIFANO, F.C., ANSEMI, A., ALEMAN, C., SUAREZ, J.A., VASQUES, A.D. : Miocardiopathia chagastica experimental. Valoracion del metodo de investigacion experimental para el estudio de las propiedades fundamentales del corazon del perro con infeccion chagastico aguda y cronica. Arch. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med., 4 : 37-62 (1962).
- PIPKIN, A.C. : Avian embryos and tissue culture in the study of parasitic protozoa. II. Protozoa other than Plasmodium. Exp. Parasitol., 9 : 167-203 (1960).
- PIZZI, T.P. : Sobre el problema de las formas delgadas del Trypanosoma cruzi. Bol. Inf. Parasit. Chile, 8 : 26-30 (1953).
- PIZZI, T. : Immunologia de la enfermedad de chagas. Univ. de Chile, 183pp (1957)<sup>(2)(3)</sup>
- PIZZI, T., AGOSIN, M., CHRISTEN, R., HOECKER, G., NEGhme, A. : Estudios sobre inmunobiologia de las enfermedades parasitarias. I. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de las lauchas a la infeccion experimental por Trypanosoma cruzi. Bol. Inform. Parasit. Chile, 4 : 48-49 (1949)<sup>(2)</sup>
- PIZZI, T.P., PRAGER, R.S. : Inmunidad a la sobreinfeccion inducida mediante cultivos de Trypanosoma cruzi de virulencia atenuada. Bol. Inform. Parasit. Chilenas, 7 : 20-21 (1952).

- PIZZI, T.P., RUBIO, M. : Aspectos celulares de la inmunidad en la enfermedad de Chagas. Bol. Chileno Parasitol., 9 : 35-47 (1955).<sup>(1)(2)</sup>
- PIZZI, T.P., RUBIO, D.M., KNIERIM, T.F. : Contribucion al conocimiento de los mecanismos inmunitarios en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. Bol. Inst. Parasit. Chile, 8 : 66-72 (1953).<sup>(2)</sup>
- PIZZI, T.P., RUBIO, M., KNIERIM, F. : Inmunologia de la enfermedad de chagas. Bol. Chileno Parasitol., 9 : 35-47 (1954).<sup>(2)</sup>
- REED, S.G. : Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. Inf. Imm., 28 : 404-410 (1980).
- RIERA, N.E., MALBRAN, A., RITACCO, V., COSSIO, P.M., ARANA, R.M., DE BRACO, M.M. : El sistema complemento en la enfermedad de Chagas cronica. Medicina (Buenos Aires), 40 : 125-132 (1980).
- RIVERA-VANDERPAS, M.T. : Contribution à l'étude du contrôle génétique de la susceptibilité du rat à l'infection par T. cruzi. Mémoire, D.E.A., Lille (1980).
- ROBERSON, E.L., HANSON, W.L. : Transfer of immunity to Trypanosoma cruzi. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 68 : 338 (1974).
- ROBERSON, E.L., HANSON, W.L., CHAPMAN, W.L. : Trypanosoma cruzi : Effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp. Parasitol., 34 : 168-173 (1973).
- RODRIGUEZ, A.M. : Le rat Fischer mâle : modèle d'étude de l'immunité dans la trypanosomiase expérimentale à T. cruzi. Mémoire, D.E.A. Lille (1980).
- ROMAÑA, C., MAYER, H. : Estudos de ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi em cultura de tecidos de embriao de Galinha. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 37 : 19-27 (1942).<sup>(2)</sup>

- RUBIO, M. : Estudio de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de Trypanosoma cruzi. Accion de la cortisona en la capacidad de invasion y mutiplicacion del parasito. Biologica (Santiago), 20 : 89-125 (1954)<sup>(1)</sup>
- RUBIO, M. : Estudio de la enfermedad de chagas experimental del batracio. I. Factores que intervienen en la inmunidad natural. Bol. Chile Parasit., 11 : 28-32 (1956)<sup>(3)</sup>
- SANDERSON, C.J., CLARK, I.A., TAYLOR, G.A. : Different effector cell-types in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. Nature (London), 253 : 376-377 (1975).
- SANTIAGO, A.R., AFCHAIN, D., YARZABAL, L.A., CAPRON, A. : Specific antigens of Trypanosoma cruzi amastigote and trypomastigote forms. II. Use of sera from patients with Chagás'disease. Soumis à publication (1981).
- SANTORO, F., BERNAL, J., CAPRON, A. : Complement activation by parasite. A review. Acta Trop., 36 : 5-17 (1979).
- SANTOS, R.R. : Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da doença de chagas experimental. Rev. Path. Trop., 2 : 433-463 (1973).
- SANTOS-BUCH, C., TEIXEIRA, A.C.L. : The immunology of experimental chagas'disease. III. Rejection of allogenic heart cells in vivo. J. Exp. Med., 140 : 38-52 (1974).
- SCHMUNIS, G.A., GONZALEZ-CAPPA, S.M., TRAVERSA, O.C., YANOVSKY, J.F. : The effect of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 65 : 89-99 (1971).
- SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., COARASA, L., VAINSTOK, C. : Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of Trypanosoma cruzi by human anti-Trypanosoma cruzi antibodies. Inf. Imm., 20 : 567-569 (1978).

- SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., DESOUZA, W., LANGEMBACH, T. : Trypanosoma cruzi : antibody induced mobility of surface antigens. *Exp. Parasitol.*, 50 : 90-102 (1980).
- SCORZA, C., SCORZA, J.V. : Acute myocarditis in rats inoculated with Trypanosoma cruzi : study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after inoculation. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 14 : 171-177 (1972).
- SCOTT, M.T., SNARY, D. : Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. *Nature*, 282 : 73-74 (1974).
- SCOTT, M.T., SNARY, D. : Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. *Nature*, 282 : 73-74 (1979).
- SEAH, S. : Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. *Nature*, 225 : 1256 (1970).
- SEAH, S., MARSDEN, P.D. : The protection of mice against a virulent strain of Trypanosoma cruzi by previous inoculation with an avirulent strain. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 63 : 211-214 (1969).
- SEAH, S.K.K., MARSDEN, P.D., VOLLER, A., PETTIT, L.E. : Experimental Trypanosoma cruzi infection in Rhesus monkeys : The Acute phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68 : 63-69 (1974).
- SEGURA, E.L., VASQUEZ, C., BRONSINA, A., CAMPOS, J.M., CERISOLA, J.E., GONZALES-CAPPA, S.M. : Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. II. Flagellar and membrane fraction. *J. Protozool.*, 24 : 540-543 (1977).

- SOUZA, M.O., REIS, A.P., DIAS da SILVA, W., BRENER, Z. : Mechanisms of acquired immunity induced by Leptomonas pessoai against Trypanosoma cruzi in mice. J. Protozool., 21 : 579-584 (1974).
- SZARFMAN, A., GENECHT, D., DRAPER, C.C., MARSDEN, P.D. : Tissue-reacting immunoglobulins in Rhesus monkeys infected with Trypanosoma cruzi : a follow-up study. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 75 : 114-116 (1981).
- SZARFMAN, A., LARANJA, F.S., DE SOUZA, W., GALUAO QUINTAO, L., GERECHT, D., SCHMUNIS, G.A. : Tissue reacting antibodies in a Rhesus monkey with a long-term Trypanosoma cruzi infection. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 27 : 832-834 ((1978).
- TAFURI, W.L. : Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human american trypanosomiasis. Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat., 354 : 136-149 (1971)<sup>(1)</sup>
- TAFURI, W.L. : Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19 : 405-417 (1970)<sup>(1)</sup>
- TAFURI, W.L., BRENER, Z. : Lesoes do plexo de meissnen e de auerbach no intestino do camundongo albino na fase crônica da Trypanosoma cruzi experimental. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 9 : 149-154 (1967)<sup>(1)</sup>
- TAKEHARA, H.A., PERINI, A., SILVA, M.H., MOTA, I. : Imunidade humoral na doença de chagas experimental. Proceedings meeting on "Basic Research in Chagas'disease", Caxambu, Brazil (1978)<sup>(3)</sup>
- TALIAFERRO, W.H., PIZZI, T. : Connective tissue reactions in normal and immunized mice to reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Infec. Dis., 96 : 199-227 (1955).

- TEIXEIRA, A.R.L. : Immunoprophylaxis against Chagas'disease. In "Miller L.H. et al. (ed), Immunity to Blood Parasites of Animals and man (New York) : 243-280 (1977).
- TEIXEIRA, A.R.L. : Chagas'disease : Trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. Bull. O.M.S., 57 : 697-710 (1979).
- TEIXEIRA, A.R.L., SANTOS-BUCH, C.A. : The immunology of experimental Chagas'disease. I. Preparation of Trypanosoma cruzi antigens and humoral antibody responses to these antigens. J. Immunol., 113 : 859-869 (1974).
- TEIXEIRA, A.R.L., SANTOS-BUCH, C.A. : The immunology of experimental chagas'disease. II. Delayed Hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology, 28 : 401-410 (1975).
- TEIXEIRA, A.R.L., TEIXEIRA, M.L., SANTOS-BUCH, C.A. : The immunology of experimental chagas'disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic chagas'disease in man. Am. J. path., 80 : 163-180 (1975).
- TOLEDO BARROS, M.A.M., AMATO NETO, V., MENDES, E., MOTA, I. : In vitro cellular immunity in chagas'disease. Clin. Exp. Immunol., 38 : 376-380 (1979).
- TORRES, C.M., TAVARES, B.M. : Miocardite no macaco cebus apos inocula-  
ções repetidas com Schizotrypanum cruzi. Mem. Inst. Oswaldo Cruz,  
56 : 85-152 (1958)<sup>(1)</sup>
- TRISCHMANN, T.M. : Trypanosoma cruzi : ability of T-cell enriched and -depleted lymphocyte populations to passively protect mice. Exp. Parasit., 49 : 225-232 (1980).

- TRISCHMANN, T., TANOWITZ, H., WITTEN, M., BLOOM, B. : Trypanosoma cruzi : role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Exp. Parasit., 45 : 160-168 (1978).
- TSCHUDI, E.I., ANZIANO, D.F., DALMASO, A.P. : Lymphocyte transformation in Chagas'disease. Inf. Imm., 6 : 905-908 (1972).
- VATTUONE, N.M., SZARFMAN, A., GONZALEZ-CAPPA, S.M. : Antibody-response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas'disease). Am. J. Trop. Med. Hyg., 76 : 45-47 (1973).
- VOLLER, A., SHAW, J.J. : Immunological observations on an antiserum to Trypanosoma cruzi. Z. Tropenmed. Parasitol., 16 : 181-187 (1965).
- WARREN, L.G. : Biochemical studies on chicken macrophages infected in vitro with Trypanosoma cruzi. Exp. Parasit., 7 : 82-91 (1958).
- WATKINS, R. : Comparison of infections produced by two strains of Trypanosoma cruzi in mice. J. Parasitol., 52 : 958-961 (1966).
- YANOVSKY, J.F., ALBADO, E. : Humoral and cellular responses to Trypanosoma cruzi infection. J. Imm., 109 : 1159-1161 (1972).
- ZELEDON, R., PONCE, C. : A skin test for the diagnosis of chagas' disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 68 : 414-415 (1974).

BIBLIOGRAPHIE CITEE PAR :

- (1) BRENER, Z., ANDRADE, Z. : Trypanosoma cruzi e doença de chagas. Guanabara koogan S.A. Rio de Janeiro (1979).
- (2) GOBLE, F. : South American Trypanosomes. Immunity to Parasitic Animals, 2 (1970).
- (3) BRENER, Z. : Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv. Parasitol., 18 (1980).

