

50376
1982
21

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

50376
1982
21

N° 948

THESE

Présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de Doctorat de 3ème Cycle
en Biologie et Physiologie Animale

par

SIMONE FREDERIQUE BRENIERE

**«INFECTION HUMAINE PAR TRYPANOSOMA CRUZI
(MALADIE DE CHAGAS) EN BOLIVIE A DIFFERENTES
ALTITUDES : REPOSE IMMUNE HUMORALE»**

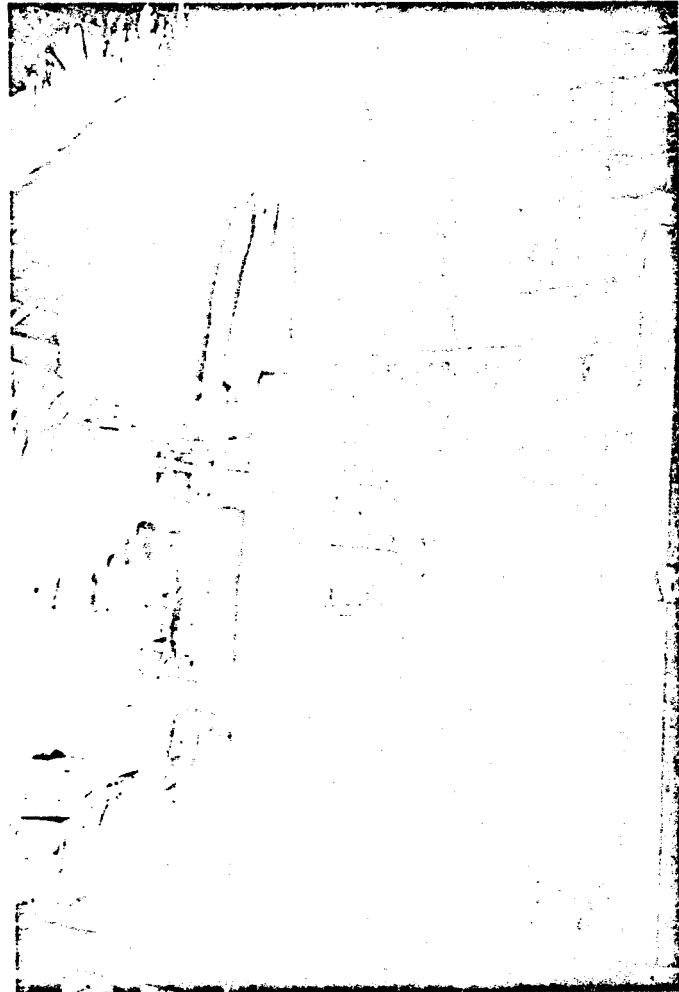


Jury :

Président : M. E. VIVIER
Rapporteur : M. Y. CARLIER
Examineurs : M. A. CAPRON
M. A. DHAINAUT
M. D. AFCHAIN

Le petit Thésar

Etudiants Services 34, rue Serpente - 75006 Paris



AUX PERSONNES ATTEINTES DE LA MALADIE DE CHAGAS

REMERCIEMENTS

Au Professeur Emile VIVIER,

Qui a accepté de diriger cette thèse et qui m'a toujours
secondée dans mes démarches avec la plus grande amabilité.

Au Professeur André CAPRON,

Pour m'avoir permis de rédiger cette thèse dans les meilleures conditions et pour m'avoir accueillie avec la plus grande gentillesse au sein de son équipe de recherche, ce qui m'a considérablement facilité l'achèvement de ce travail.

Je tiens aussi à remercier le Professeur André CAPRON pour l'année 1978 - 1979 que j'ai passée dans son laboratoire ; j'ai pu à son contact acquérir de nouvelles connaissances et approfondir ma formation scientifique, grâce à laquelle il m'a été possible de réaliser par la suite, en Bolivie, les recherches ici présentées.

A mon ami, le Professeur Yves CARLIER,

Qui a, grâce à son dynamisme et à ses compétences scientifiques, mis en place et développé le programme de coopération franco-bolivien sur la maladie de Chagas.

Les lourdes tâches administratives imposées par son poste de co-directeur de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude ne l'ont jamais détourné de sa mission de directeur scientifique. Ses qualités d'analyse, ses connaissances en matière d'immunologie, ainsi que son esprit fertile, m'ont apporté un soutien permanent.

A tous mes collègues boliviens et français de l'Institut Bolivien de
Biologie d'Altitude de La Paz,

Pour leur constante amitié et leur collaboration efficace.

Je tiens à remercier tout spécialement Roxana Carasco, Hortensia Miguez et Clara Camacho, pour leur participation active à ce programme de recherche, et leur aide indispensable dans la création du laboratoire d'immunologie parasitaire, qui, en l'espace d'une année, a permis de commencer des études sur la réponse immune humorale de patients atteints de la maladie de Chagas.

Je remercie également le Docteur Gerardo Antezana, cardiologue de l'Institut, qui a toujours témoigné le plus grand intérêt aux personnes souffrant de la maladie de Chagas et a collaboré à ce programme de recherche avec une grande efficacité.

Je n'oublie pas non plus le Docteur Martine Bailly, qui quitta La Paz après une année de travail en commun et nous laissa le souvenir de son enthousiasme et de sa sincère amitié.

Le Docteur Michel Tibayrenc qui, par sa bonne humeur, la rigueur de son esprit scientifique, sa ténacité, a su rendre chaleureuse l'ambiance de travail du laboratoire d'Immunologie Parasitaire.

Jean-Loup Lemesre, auprès duquel j'ai toujours trouvé une disponibilité de discussion et d'échanges permanents qui m'ont aidé dans l'acheminement de ce travail.

Le Docteur Etienne Ribaute, qui m'a aidée pour l'analyse statistique de tous les résultats avec la plus grande gentillesse.

Le Docteur Philippe Desjeux qui a récemment remplacé au poste de co-directeur de l'Institut le Docteur Yves Carlier, et a su assurer dès son arrivée la bonne continuité du programme initial.

Au Docteur es-sciences Daniel AFCHAIN,

Pour sa collaboration à ce travail et son aide permanente,
sa connaissance approfondie de la maladie de Chagas, son
esprit critique ont, au cours de nombreuses discussions, orienté
et éclairé la rédaction de cette thèse.

A Janine FRUIT, Docteur en Pharmacie,

Pour sa gentillesse et ses précieux conseils au
moment de l'achèvement de ce travail.

A tous les membres,

de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude de La Paz,

du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut
Pasteur de Lille

Enfin, je voudrais souligner que la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien moral et l'affection, de mes parents, de toute ma famille, de mes amis restés en France ainsi que de ceux que j'ai rencontrés en Bolivie.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	1
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DES THEMES DE RECHERCHE ENVISAGEES.....	5
I. RAPPELS PARASITOLOGIQUES	5
II. RAPPEL CLINIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS...	12
1. La phase aiguë.....	12
2. La phase chronique.....	12
III. ELEMENTS DE LA REPOSE IMMUNE HUMORALE DE L'HOTE AU COURS DE L'INFECTION PAR <u>T. CRUZI</u>	14
1. Les immunoglobulines de classe IgG, IgM, IgA.....	14
1.1. Phase aiguë.....	14
1.2. Phase chronique.....	14
1.3. Infection expérimentale.....	15
2. Immunoglobulines de classe IgE.....	15
3. Le complément.....	16
3.1. Dosage des facteurs du complément	16
3.2. Action du complément sur les différentes formes de <u>T. cruzi</u> ...	17
4. Les immuns complexes	18

	Pages
5. Les anticorps anti- <u>T. cruzi</u>	19
5.1. Cas aigus.....	20
5.2. Cas chroniques.....	21
6. Les autoanticorps circulants dans le sérum de patients infectés par <u>T. cruzi</u>	24
6.1. Rappels de l'anatomopathologie et de la physiopathologie de la maladie de Chagas.....	24
6.2. Les autoanticorps EVI (endocardium vascular-interstifium).....	26
6.2.1. Mise en évidence.....	26
6.2.2. EVI et phase aiguë.....	26
6.2.3. EVI et phase chronique.....	27
6.2.4. Spécificité des anticorps EVI.....	27
6.3. Les autoanticorps anti-nerfs.....	27
 MATÉRIEL ET MÉTHODES	 29
I. LES PATIENTS.....	29
1. Origine.....	29
2. Age moyen et sexe des populations.....	30
3. Etude clinique des patients.....	30
4. Prélèvement de sang.....	31
II. DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR <u>T. CRUZI</u>	32

	Pages
III. PREPARATION DES ANTIGENES	32
1. Souches utilisées.....	32
2. Cultures <u>in vitro</u>	34
3. Préparation des formes épimastigotes utilisées pour la réaction d'immunofluorescence indirecte (IMF)...	34
4. Préparation d'un extrait soluble brut par éclatement sous pression.....	35
5. Extrait antigénique soluble lyophilisé.....	36
IV. ETUDES SEROLOGIQUES.....	36
1. Dosage des immunoglobulines.....	36
2. IgE spécifiques.....	37
3. Dosage des immuns complexes (I.C.).....	38
4. Dosage du C ₃ activateur, C _{3c} et du C ₄ ..	39
5. Techniques quantitatives de dosage des anticorps anti- <u>T. cruzi</u>	39
5.1. Réaction d'immunofluorescence indirecte (IMF).....	39
5.2. Réaction d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays).....	41
5.3. Réaction de fixation du complément (RFC).....	42
6. Technique qualitative de dosage des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> (précipitation en gel).....	45
6.1. L'immunoélectrophorèse (IEP).....	45
6.2. Immunodiffusion en gel et identification des anticorps anti-antigène 5 de <u>T. cruzi</u> (Ouchterlony).....	47
7. Dosage des autoanticorps (EVI).....	50

	Pages
RÉSULTATS	52
I. TAUX DES IMMUNOGLOBULINES DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION.....	52
1. Immunoglobulines de classes IgG, IgM, IgA.....	52
2. Immunoglobulines de classe IgE.....	53
II. DOSAGE DES IMMUNS COMPLEXES DANS LE SERUM DE PATIENTS EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION.....	53
III. DOSAGE DU C ₃ ACTIVATEUR, DU C _{3c} ET DU C ₄ DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION.....	54
IV. REPONSE HUMORALE ANTI- <u>T. CRUZI</u>	54
1. Mise au point et corrélation des différentes techniques, intérêt diagnostique.....	54
1.1. Détermination des titres ou valeurs significatives de la présence d'anticorps anti- <u>T. cruzi</u> pour les réactions d'IMF, d'ELISA, de RFC et d'IEP.....	54
1.1.1. Technique d'IMF.....	54
1.1.2. Technique d'ELISA.....	56
1.1.3. Technique de RFC.....	56
1.1.4. Technique d'IEP.....	57
1.2. Corrélation des techniques de dosage des anticorps anti- <u>T. cruzi</u>	58
1.2.1. Corrélation quantitative des techniques entre elles.	58
1.2.2. Corrélation selon les seuils.....	58
1.2.3. Etude de la sensibilité des techniques.....	59

	Pages
2. Etude quantitative de la réponse immune humorale chez les chagasiques en phase chronique de l'infection.....	60
2.1. Taux des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> dans le sérum de chagasiques de trois régions boliviennes différentes.....	61
2.1.1. Nombre de patients présentant une sérologie positive dans ces populations.....	61
2.1.2. Taux des anticorps.....	61
2.2. Taux des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> et xénodiagnostic.....	61
2.3. Taux des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> et altitude.....	62
2.4. Taux des anticorps anti- <u>T. cruzi</u> et pathologie.....	63
3. Etude qualitative de la réponse immune humorale anti- <u>T. cruzi</u> de chagasiques en phase chronique de l'infection.....	65
3.1. Incidence des anticorps anti- antigène 5 spécifique de <u>T. cruzi</u> (immunodiffusion en gel)..	65
3.1.1. Incidence et taux des anticorps anti- <u>T. cruzi</u>	65
3.1.2. Anticorps anti-antigène 5 et xénodiagnostic.....	65
3.1.3. Anticorps anti-antigène 5 et pathologie.....	65
3.2. Etude d'autres antigènes (immuno- électrophorèse).....	66
V. REPONSE HUMORALE AUTOIMMUNE DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION.....	71

	Pages
DISCUSSION.....	73
I. TAUX DES IMMUNOGLOBULINES DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION.....	73
1. Immunoglobulines de classes IgG, IgM, IgA.....	73
2. Immunoglobulines de classe IgE.....	75
II. IMMUNS COMPLEXES	76
III. FACTEURS DU COMPLEMENT.....	77
IV. DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-T. CRUZI ET LE DIAGNOSTIC.....	78
1. Techniques quantitatives de dosage des anticorps.....	79
2. Techniques qualitatives de dosage des anticorps.....	83
V. ANALYSE QUANTITATIVE DE LA REPONSE IMMUNE HUMORALE ANTI-T. CRUZI.....	86
VI. ETUDE QUALITATIVE DE LA REPONSE HUMORALE IMMUNE HUMORALE ANTI-T. CRUZI.....	89
VII. REPONSE HUMORALE AUTOIMMUNE.....	93
CONCLUSION.....	95
REFERENCES.....	97

INTRODUCTION

Parmi les grandes maladies endémiques parasitaires, la maladie de Chagas arrive en troisième position.

Actuellement, au moins 35 millions d'individus vivent en zone endémique, 10 millions d'entre eux sont parasités et 20 % présentent une atteinte cardiaque (WHO, 1960 ; Pan American Health Organization, 1974).

La Bolivie arrive en tête des pays d'Amérique Latine au point de vue de l'endémicité (35 % de la population est infectée). C'est le pays où le nombre de triatomes infestés par maison est le plus élevé. La maladie de Chagas y sévit dans les zones tropicales et les vallées tempérées. La moitié de la population vit à plus de 3000 mètres d'altitude et se trouverait en dehors de la zone endémique (voir Discussion). Toutefois, la mobilité de la population bolivienne étant de plus en plus importante, le nombre d'habitants infectés sur l'altiplano pourrait augmenter (voir carte).

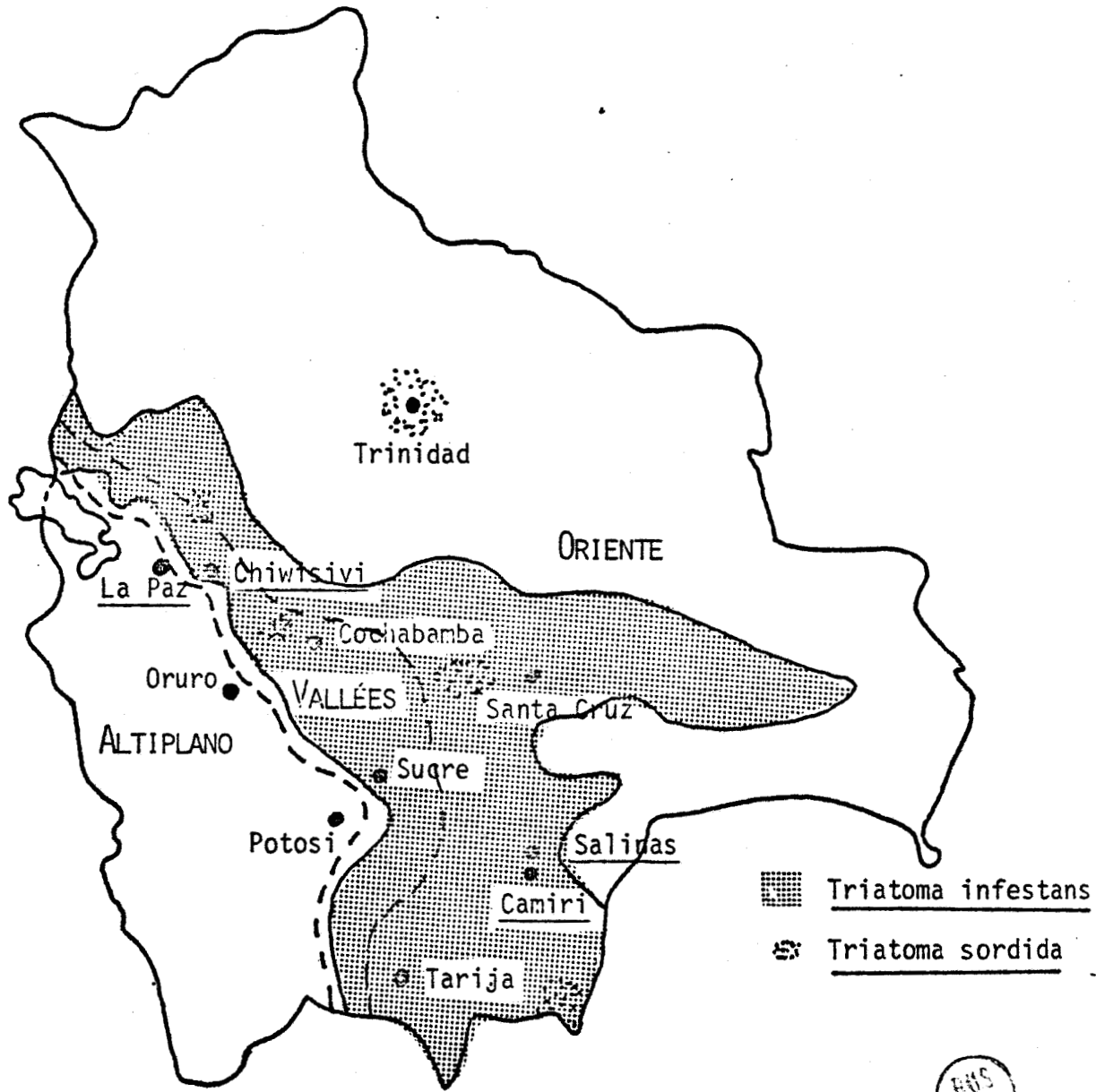
En 1909, Carlos Chagas découvre cette maladie parasitaire, dans le Minas Gerais (Brésil), chez une petite fille de deux ans à l'occasion d'une enquête épidémiologique sur le paludisme. Cette maladie dont l'agent est un protozoaire flagellé : Trypanosoma cruzi, est transmise par un insecte domestique hématophage : un réduvidé (Triatomidae). Sa découverte est peu à peu acceptée et confirmée par d'autres auteurs (Machado et Guéirrero, 1913 ; Romãna, 1935 ; Brumpt, 1939 ; Koberle, 1957).

Cette maladie évolue chez l'homme en deux phases successives accompagnées ou non d'une symptomatologie (phase aiguë, phase chronique).

La phase aiguë se caractérise par une parasitémie élevée (examen direct d'une goutte de sang positif, frottis coloré positif : quelques parasites par lame pour ces deux examens). Elle atteint spécialement les enfants

Répartition géographique en Bolivie des Réduvidae
qui transmettent la maladie de Chagas

(Mario Borda P. "Universidad Boliviana
 Mayor de san Simon Cochabamba).



Altiplano : La Paz 3500 m
 Oruro 4000 m
 Potosi 4100 m

Vallées : Cochabamba 2600 m
 Sucre 2500 m
 Chivisivi 2500 m

Oriente : Santa-Cruz 400 m
 Trinidad 200 m
 Tarija 300 m
 Camiri 800 m



dans les zones endémiques, avec une symptomatologie souvent vague et non caractéristique. Seulement 5 % des cas seraient reconnus, en particulier grâce au signe de Romana (ou complexe ophtalmo-ganglionnaire). Cette phase peut durer jusqu'à trois mois et se présente sous trois formes différentes (insuffisance cardiaque, méningo-encéphalite, oedème généralisé) (Romana, 1935 ; Laranja et al., 1948 ; Koberle, 1968 ; Chapuis, 1974, 1979 ; Davalos, et al., 1979).

La phase chronique se caractérise par une parasitémie absente ou très faible (xénodiagnostic positif dans 40 à 50 % des cas, examen direct du sang négatif). Elle peut rester asymptomatique toute la vie ou entraîner les lésions suivantes :

- au niveau cardiaque : troubles de la conduction (risque de mort subite), insuffisance cardiaque progressive ;
- au niveau digestif : méga-organes dont les plus fréquents sont les méga-oesophages et les méga-colons.

L'aspect difficilement curable des atteintes chroniques en regard du niveau économique de l'Amérique du Sud, et en particulier de la Bolivie, justifie l'importance d'une prophylaxie. Il n'existe pas de drogues efficaces pour la guérison de la maladie. Les drogues trypanocides actuellement commercialisées (Rochagan, Lampit) ne sont actives que dans un certain nombre de cas aigus (environ 50 %). La prophylaxie la meilleure passerait par l'amélioration du niveau de vie, une modification de l'habitat et une meilleure hygiène générale. Mais les conditions d'un effort national à long terme pour aboutir à ces résultats ne sont pas encore réalisées. La prophylaxie d'avenir semble donc être la vaccination.

L'étude des mécanismes immunologiques qui régissent la relation hôte-parasite est particulièrement importante dans l'espoir de développer des méthodes de prévention immunologique efficaces contre les affections parasitaires. L'un des premiers objectifs de ces études est une meilleure compréhension de la réponse de l'hôte à l'infection. La réponse de l'hôte vis-à-vis du parasite peut être soit bénéfique pour l'hôte et aboutir à la destruction complète ou partielle du parasite, soit dans certains cas, cette réponse peut être responsable de processus pathologiques. C'est le cas des phénomènes autoimmuns connus au cours de la maladie de Chagas qui sont de plus en plus impliqués dans la pathologie cardiaque et digestive au moins chez les sujets en phase chronique de l'infection. Les mécanismes effecteurs sont habituellement divisés en deux catégories, les réponses à médiation humorale et les réponses à médiation cellulaire. Cette séparation est cependant artificielle car ces deux types de réponse présentent un tronc commun qui réside dans le rôle d'information et de coopération des cellules lymphocytaires T et d'autre part, il existe des mécanismes effecteurs impliquant des anticorps et des cellules (macrophages, cellules K, éosinophiles, mastocytes).

L'importance de la réponse humorale spécifique dans le contrôle de l'infection chagasique n'est maintenant plus controversée (Kierszenbaum et al., 1976 ; Krettli et al., 1976 ; Mc Hardy et al., 1980). Des anticorps cytotoxiques des formes trypomastigotes ont été mis en évidence et seraient capables de contrôler en partie la parasitémie. L'autre aspect de l'étude de la réponse immune humorale est celui des anticorps autoimmuns dont le rôle est encore mal connu alors que leur incidence au cours de l'infection humaine est importante.

Le but de notre travail consiste donc à étudier globalement la réponse immune humorale chez l'adulte lors d'une infection par T. cruzi.

Dans une première partie, après un bref rappel parasitologique et clinique, nous présentons une révision bibliographique de la réponse immune humorale lors d'infections expérimentales ou humaines par T. cruzi en développant plus particulièrement les données actuelles de l'infection humaine. Après un chapitre consacré au matériel et à la méthodologie employés nous présenterons les résultats de nos expériences personnelles en Bolivie concernant :

1) les éléments de la réponse immune humorale (immunoglobulines, complément, immuns complexes)

2) la réponse humorale spécifique de T. cruzi (les anticorps) ; analyse quantitative et qualitative

3) la réponse humorale autoimmune, étude d'un des éléments de cette réponse: les anticorps autoimmuns EVI (endocardium vascular interstitium)

Ces facteurs seront dans la plupart des cas étudiés sur différentes populations et l'analyse faite en fonction des différents éléments : endémicité, écologie (classe sociale, altitude), pathologie, parasitologie.

Enfin, la discussion confrontera nos résultats à ceux d'autres auteurs et nous permettra, d'une part de mettre en évidence la partie originale de cette réponse humorale dans les populations boliviennes sélectionnées, et d'autre part de discuter des techniques de diagnostic immunologique et de proposer quelques améliorations.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DES THÈMES
DE RECHERCHE ENVISAGÉS

I. RAPPELS PARASITOLOGIQUES

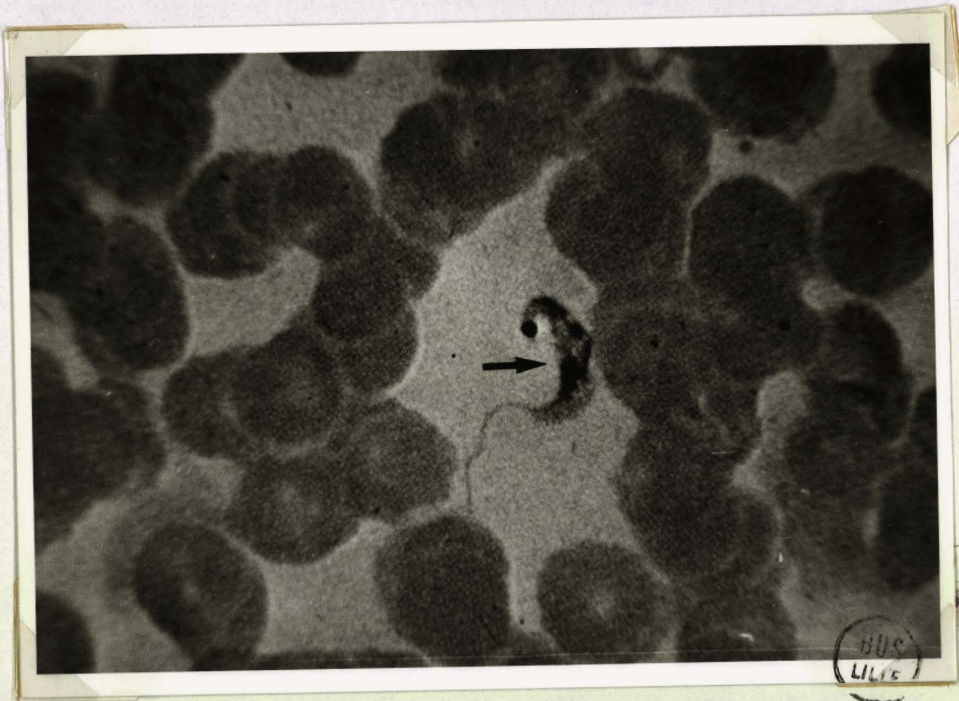
En 1909, au Brésil, Carlos Chagas découvre dans les fécès d'un réduvidé hématophage domestique une nouvelle espèce de flagellé de la famille des Trypanosomatidae, ordre des Kinétoplastidae, classe des Zoomastigophora nommé Schizotrypanosoma cruzi (voir photo p 6), (Chagas, 1909 a et b). Deux ans plus tard, il rapporte ses découvertes dans "Academia National Medicina" (Rio de Janeiro, 1911), accompagnées de la description précise des phases aiguës et chroniques provoquées chez l'homme par T. cruzi.

Parasite unicellulaire, protozoaire flagellé, il se rencontre sous différentes formes au cours de son évolution chez l'insecte vecteur et chez l'hôte définitif. Le tableau n°1 schématise les formes rencontrées chez la réduve et chez les mammifères.

Le cycle décrit dès 1909 par Carlos Chagas est confirmé par différents auteurs (Brumpt, 1912 ; Mayer et al., 1914 ; Muniz et al., 1946 ; Da Silva, 1959) mais Brack en 1968, par une étude de frottis colorés, étudie le développement du parasite dans le tube digestif de l'insecte et trouve en dehors des formes épimastigotes, amastigotes et trypomastigotes des formes rondes flagellées nommées sphaeromastigotes. Ces formes pourraient se transformer en épimastigotes ou trypomastigotes mais la forme épimastigote ne représente pas selon l'auteur le stade précédant la forme trypomastigote métacyclique (forme infectante). Certains auteurs décrivent divers types de formes de trypomastigotes circulants chez l'hôte définitif (Brener et Chiari, 1963 ; Brener, 1973) dont les deux types les plus différents sont la forme effilée et la forme trapue. Ces deux formes pourraient correspondre à deux souches différentes.

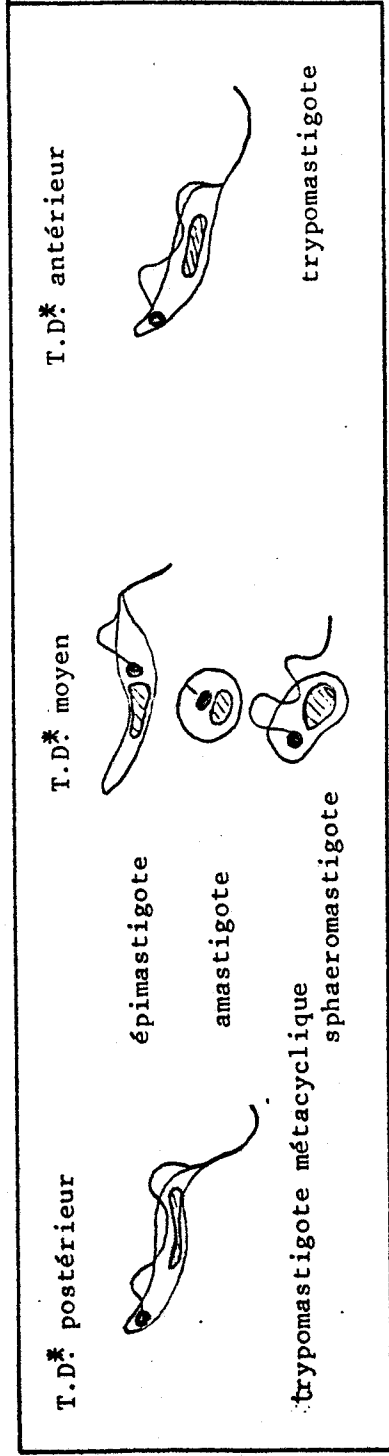
Du point de vue de la taxonomie, la classification de Hoare (1966) qui divise les trypanosomes en stercoraria et salivaria selon des critères morphologiques et biologiques, est unanimement acceptée et T. cruzi fait

TRYPANOSOMA CRUZI



Forme circulante trypomastigote

Tableau n°1 : Cycle évolutif de Trypanosoma cruzi

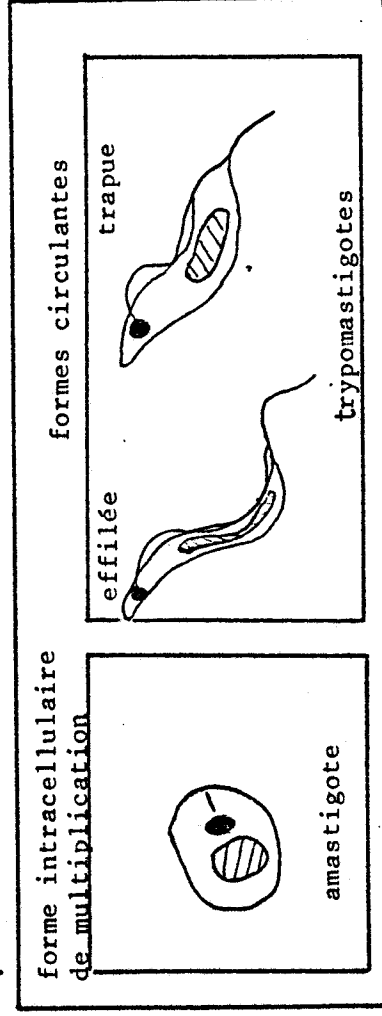


Insecte vecteur

Reduviidae

Contamination
par les fécès
de l'insecte

Piqûre de
l'insecte et
ingestion des formes
trypomastigotes



Hôte définitif

Mammifère

* Tube digestif



partie du groupe stercoraria. Les études immunostructurales d'Afchain (1976) sont en accord avec l'arbre phylogénique proposé par Hoare.

Au niveau intraspécifique, l'ensemble des travaux actuels montre une grande variation selon différents critères d'étude : la morphologie, les profils d'infections expérimentales, l'affinité pour les tissus, la susceptibilité aux drogues, l'hétérogénéité antigénique, les profils isoenzymatiques. Ainsi, des souches différentes inoculées à des animaux de laboratoire n'ont pas la même morphologie. Brener et Chiari (1963) et Brener (1973) décrivent trois types :

- La forme fine : noyau allongé, kinétoplaste terminal, flagelle libre et long forme effilée (exemple : souche Y)
- La forme longue : noyau ovale, kinétoplaste subterminal, flagelle libre et long
- La forme trapue : noyau en position postérieure, kinétoplaste terminal, cytoplasme très vacuolisé (exemple : souche CL).

Le pourcentage de ces formes diffère selon la souche, par exemple les formes fines prédominent dans la souche Y et les formes trapues dans la souche CL. Les formes trapues seraient moins infectantes que les formes fines (Howells et Chiari, 1975).

Andrade et al. (1966), Bice et al. (1970) montrent que les souches n'ont pas la même affinité pour les tissus et les auteurs classent les souches en myotropes et réticulotropes. Andrade (1979) établit 3 types selon les profils morphologiques, parasitémiques et l'affinité pour les tissus de ces trois souches (tableau n°2).

- La susceptibilité aux drogues est différente selon les souches (Hauschka, 1949 ; Goble, 1951 ; Haberkorn et al., 1972 ; Cover et al., 1981).

- Certains auteurs mettent en évidence une hétérogénéité antigénique entre les souches de T. cruzi. Nussenzweig et al. (1962, 1963) décrivent, à partir de 36 souches, trois sérotypes. Krettli et Brener (1976) décrivent

Tableau n°2 : Caractéristiques des trois types de souches de T.cruzi classées par Andrade,(1979).

	I	II	III
Morphologie	Fine	Fine dans la phase initiale	Trapue
Multiplication	Rapide	Lente	Très lente
Parasitémie	Haute	Irrégulière	Pics très élevés
Affinité pour les tissus	Système réticulo endothélial	Muscle cardiaque	Muscle squelettique
Exemple de souche	Péruvienne	Sao Paulo	Colombienne



également trois types en utilisant un test d'agglutination des formes trypomastigotes in vitro. D'autre part Kloetzel et Camargo (1976) trouvent, par le test d'immunofluorescence, des différences entre deux souches qui correspondraient à deux des types décrits par Nussenzweig et Goble. Par contre, les études immunostructurales d'Afchain portant sur plusieurs souches de T. cruzi ne montrent aucune différence.

- Des études des profils isoenzymatiques de souches de T. cruzi confirment l'hétérogénéité intraspécifique de cet ensemble de parasites (Miles et al., 1977 ; Tibayrenc et al., 1981a).

Il est utile de rappeler ici la définition de l'espèce : ensemble naturel et continu d'individus qui se reproduisent entre eux. Nous savons que les trypanosomatidae sont caractérisés par l'absence de sexualité mais cette caractéristique a récemment été remise en question : les trypanosomes africains présenteraient une reproduction sexuée (Tait et al., 1981) alors que l'étude des zymogrammes de T. cruzi montrerait qu'il n'y aurait pas de reproduction sexuée pour ce flagellé (Tibayrenc communication personnelle).

Il est donc clair que T. cruzi doit être considéré comme un complexe de souches et l'approche génétique des zymogrammes peut permettre d'élucider les liens de parentés existant entre ces souches et servir de base à des études immunologiques. Tibayrenc et al. (1981b) d'après les profils enzymatiques de 11 souches boliviennes, pour 10 enzymes, propose l'existence de trois types, et les calculs de distance génétique effectués pour deux d'entre eux suggère que ces 2 types sont très différents. Les distances observées sont de l'ordre de celles que l'on rencontre chez des insectes entre deux espèces très apparentées. Il est hasardeux d'établir une correspondance entre les distances génétiques observées et le niveau taxonomique mais les parentés géné-

tiques entre telle et telle souche peuvent servir de support aux études biologiques.

Ainsi toute classification de la plupart des trypanosomes reste pragmatique et seules des études génétiques fondamentales peuvent permettre de reconsidérer les problèmes de taxonomie et de sexualité que pose ce groupe de parasites.

Cette notion de souches du groupe T. cruzi est très importante pour tout travail concernant l'étude de la maladie de Chagas. Nous y reviendrons lors de la discussion de nos résultats concernant la réponse humorale au cours de l'infection humaine par T. cruzi.

La transmission de la maladie est assurée par plus de cent espèces de vecteurs en Amérique latine. Les vecteurs rencontrés, les plus importants en Bolivie, sont Triatoma infestans (voir photo p. 10) Rhodnius prolixus, Triatoma sordida. Triatoma infestans est de loin, le plus fréquent dans ce pays, cette réduve s'alimente sur n'importe quel hôte vertébré et si la température monte au delà de 32°C, elle est capable de voler en assurant ainsi une dissémination. Rhodnius prolixus est un insecte très vorace d'habitat domestique et sylvestre. Triatoma sordida, très répandu en Bolivie, est plutôt d'habitat sylvestre (nids d'oiseaux, de serpents); il se rencontre aussi dans les maisons mais le pourcentage d'insectes infectés est très réduit.

La transmission de l'infection se fait par :

- . Contamination de l'homme par les fécès de la réduve contenant les formes trypomastigotes infectantes. La pique indolore permet au parasite, déposé autour de celle-ci, de pénétrer la peau. Les voies d'entrée les plus fréquentes sont les muqueuses de la face ;

TRIATOMA INFESTANS



- . Passage du parasite à travers le placenta. Ce mode de contamination provoque une infection congénitale grave (Dao, 1949; Saleme et al., 1971 ; Bittencourt et al., 1972a et b). Le mode de passage est encore discuté, on ne sait pas avec certitude si une lésion placentaire pré-existante est une condition obligatoire ou non ;
- . Transfusion de sang d'un malade avec parasitémie (Dias , 1945 ; Amato et al., 1969 ; Coura, 1966; Baldy et al., 1979). Le traitement systématique des flacons de sang avec du violet de gentiane (0,25 g/l) permet d'éliminer le parasite (Nussenzweig et al., 1953, 1959. Malheureusement, ce traitement n'est pas appliqué dans les banques de sang en Bolivie, même dans les zones endémiques et ce type de contamination n'est pas négligeable.

Le cycle est assuré par l'habitat précaire de la majorité de la population, idéal pour les triatomes : maisons avec des murs de torchis ou de bois, toits de paille dans lesquels les triatomes, insectes nocturnes, se cachent pendant le jour. L'environnement péri-domestique entretient également la transmission (poulaillers et clapiers sont en général proches de la maison). Enfin, certaines habitudes alimentaires boliviennes peuvent permettre une contamination directe : le cobaye est classiquement préparé pour les repas de fête et la contamination peut se faire directement par pénétration du parasite au niveau de blessures ou excoriations lors de sa préparation.

II. RAPPEL CLINIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS

La maladie de Chagas évolue en deux phases, la phase aiguë, parfois asymptomatique et non reconnue et la phase chronique qui peut également être asymptomatique.

1. La phase aiguë

Elle se présente essentiellement chez les enfants, en zones endémiques, avec une symptomatologie souvent vague et peu caractéristique (Davalos et al., 1979). Après une incubation de 1 à 2 semaines, le début est marqué par :

- . des signes généraux : fatigue, céphalées, fièvre récurrente ou continue (38° - 40°) ;
- . un chancre d'inoculation parfois caractéristique comme le signe de Romana (Romana, 1935) qui s'observe selon les auteurs dans 5 à 60 % des cas (Cerisola et al., 1973 ; Chapuis, 1974).

Une à deux semaines après l'apparition des premiers signes, la phase aiguë entre en période d'état. Cette période se traduit par :

- . signes cardiovasculaires ou
- . forme méningo-encéphalique ou
- . forme oedémateuse ou rarement
- . formes respiratoires.

2. La phase chronique

Deux propriétés caractérisent cette phase :

- . Elle apparaît après un temps de latence de 10 à 20 ans pendant lequel le sujet ne ressent aucun trouble ;

- . La parasitémie est très faible et le diagnostic est obligatoirement immunologique (recherche des anticorps spécifiques).

Cliniquement, cette phase se traduit par différents syndrômes non spécifiques qui peuvent s'associer entre eux. Les deux principaux sont :

- . La myocardiopathie : elle est responsable des cas de "mort subite". Sa traduction clinique n'est pas spécifique et est principalement marquée par des arythmies et une insuffisance cardiaque ;
- . Les méga-organes : D'après Kokerle (1968), les méga-organes les plus fréquents sont :

- * les méga-colons
- * les méga-oesophages.

Les dilatations du colon peuvent atteindre des dimensions gigantesques et des capacités de 30 à 40 litres. La longueur du colon peut dépasser 2 mètres.

L'oesophage présente une dilatation et une hypertrophie musculaire importante. Il peut atteindre 26 fois son poids normal.

III. ELEMENTS DE LA REPOSE IMMUNE HUMORALE DE L'HOTE AU COURS DE L'INFECTION

PAR T. CRUZI

1. Les immunoglobulines de classes IgG, IgM, IgA

Au cours de multiples infections à protozoaires la synthèse des immunoglobulines est augmentée. Par exemple, en ce qui concerne le paludisme, le taux des IgG et des IgM peut atteindre sept fois le taux normal alors que seulement 5 % de ces immunoglobulines sont spécifiques du parasite. Au cours de la trypanosomiase africaine on note également une augmentation significative du taux des IgM qui a une valeur diagnostique d'orientation. Ces augmentations d'immunoglobulines sont trop élevées pour correspondre seulement à des anticorps spécifiques ; les parasites provoquent en fait une stimulation polyclonale des lymphocytes B qui explique cette augmentation.

1.1. Phase aiguë

Vattuone et al. (1973) montrent une légère augmentation des IgG et des IgM par rapport à un groupe témoin de patients non chagasiques. Ces travaux sont en accord avec ceux de Schmunis et al. (1978) pour les IgM seulement et en désaccord avec ceux de Leitchuk et al. (1970) qui trouvent des taux normaux pour les trois classes d'immunoglobulines.

1.2. Phase chronique

Quelques auteurs indiquent une légère augmentation des IgG, (Leitchuk et al., 1970 ; Vattuone et al., 1973) mais pour ces trois classes d'immunoglobulines Marsden et al. (1970) ne trouvent aucune différence significative en prenant comme groupe témoin des individus non infectés du même village.

1.3. Infection expérimentale

Au cours de l'infection de souris par T. cruzi, Capbern et al. (1974) montrent une augmentation des IgG2 en fin de parasitémie (fin de la phase aiguë). Hanson (1977) montre également que les taux d'IgG et d'IgM sont augmentés à partir de la 2ème semaine, atteignent un maximum à la 6ème semaine qui correspond à la diminution de la parasitémie (fin de la phase aiguë) puis diminuent pour se maintenir en plateau à un taux plus élevé que chez les souris normales durant le reste de l'infection (phase chronique).

Les résultats restent toutefois contradictoires au cours de l'infection humaine.

2. Immunoglobulines de classes IgE

Les phénomènes immunoallergiques sont classiques au cours des helminthiases et le taux des IgE est très élevé (Jarret, 1973; Ishizaki, 1973; Spitz et al., 1972; Rosenberg et al., 1971). Si les helminthiases induisent une hypersensibilité immédiate et la production d'anticorps réaginique, les manifestations allergiques de type immédiat n'ont pas la gravité que le taux des IgE ou des autres anticorps réaginique laissait prévoir; ces anticorps anaphylactiques peuvent cependant collaborer avec des cellules effectrices dans des mécanismes de cytotoxicité et jouer un rôle important en participant au contrôle de l'infection. C'est la situation exemplaire du modèle de la schistosomiase du rat où une activité cytotoxique in vitro sur des schistosomules a été montrée: cytotoxicité d'éosinophiles et de mastocytes en collaboration avec des IgG2a, cytotoxicité de macrophages en collaboration avec des IgE (Capron, A. et al., 1977; Capron, M. et al., 1978).

Parmi les protozooses, les travaux de Geller et al. (1978, a, b, c) décrivent des taux normaux d'IgE totales au cours de giardiose, amibiase, toxoplasmose et au cours de la maladie de Chagas, comparés aux taux d'IgE d'une population témoin du même endroit. Dans tous ces cas, les taux observés pour les deux populations sont élevés et probablement dus à des infections par des helminthes. Ces résultats indiqueraient donc seulement que les infections étudiées ne provoqueraient pas des taux d'IgE totales supérieurs à ceux provoqués par les helminthiases.

Par ailleurs, des tests cutanés d'intradermoréactions effectués avec de l'antigène de Leishmania (Shaw et al., 1974) et de l'antigène de T. cruzi montrent, une réaction immédiate positive (Zeledon et al., 1974).

Dernièrement, Afchain et al. (1981) démontrent la présence d'IgE spécifiques et des taux élevés d'IgE totales sériques dans le sérum de patients boliviens atteints de leishmaniose cutanée muqueuse.

La présence de taux normaux d'IgE totales n'exclue pas la possibilité d'une production d'IgE spécifiques et Harris et al. (1978) détectent des IgE spécifiques dans le sérum d'africains infectés par Entamoeba histolytica dont le pourcentage est en corrélation avec la prévalence du parasite dans la population.

Enfin, soulignons que peu de travaux ont été réalisés sur la recherche d'IgE spécifiques au cours de protozooses.

3. Le complément

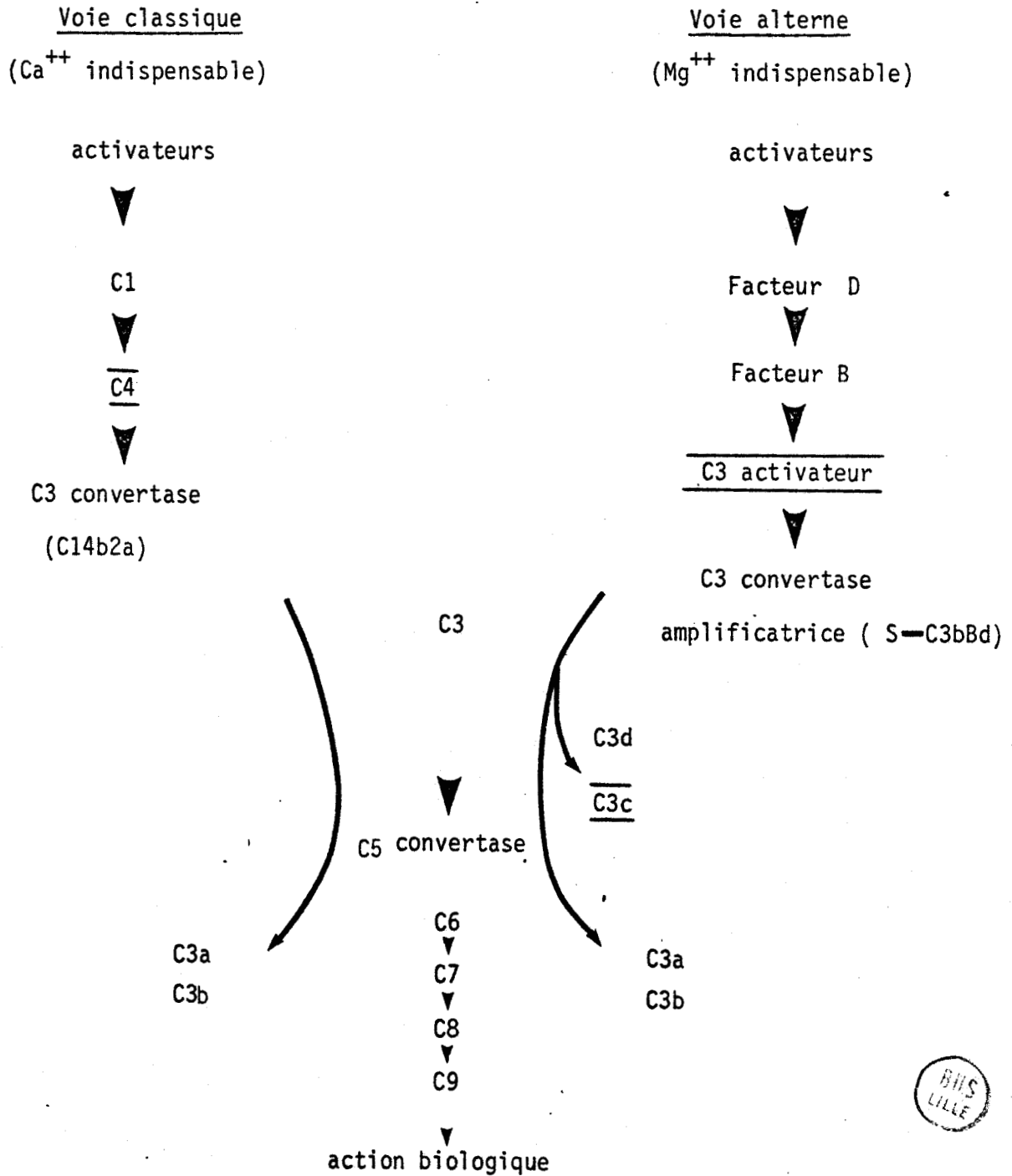
3.1. Dosage des facteurs du complément

Des concentrations anormales des facteurs du complément peuvent être les témoins de son activation ou de son utilisation et selon les facteurs dosés, on peut déterminer la voie impliquée dans cette activation (figure n°1).

Au cours de l'infection de souris par T. brucei, le C3 augmente en début d'infection puis revient à la normale (Shirazi et al., 1980) ; également,

FIGURE N°1

SCHEMA DES VOIES D'ACTIVATION CLASSIQUE ET ALTERNE DU COMPLEMENT



au cours d'infections bovines, par T. congolense et T. vivax, il y a consommation du complément (diminution du complément hémolytique total et du C₃) (Rurangirwa et al., 1980). Peu de travaux ont été réalisés sur le modèle T. cruzi et récemment Rodriguez (1981) montre qu'il y a une diminution de la voie alterne du complément au cours de l'infection expérimentale de rats mâles Fischer qui développent la phase aiguë de la maladie. Toutefois, aucun travail à notre connaissance ne s'est intéressé aux dosages de ces facteurs au cours d'infections humaines.

La connaissance du rôle important du complément lors d'infections par T. cruzi est basée sur des études de cytotoxicité ou de déplétion in vivo de certains facteurs du complément.

3.2. Action du complément sur les différentes formes de T. cruzi

Il faut distinguer l'action des sérums normaux sur les différentes formes de T. cruzi de celle de sérums d'infection qui présentent des anticorps anti-T. cruzi. Ce deuxième cas sera analysé dans le paragraphe sur les mécanismes effecteurs de la réponse immune humorale.

Le complément de la plupart des sérums de vertébrés est capable de lyser les formes de culture épimastigotes de T. cruzi (Rubio, 1956 ; Nogueira et al., 1975 ; Kototani Keito et al., 1979), ceux d'oiseaux, de crapauds et de grenouilles sont capables de lyser les formes épimastigotes et les formes trypomastigotes (Rubio, 1956) ; pour ces derniers cas, on parle d'immunité naturelle puisque ces animaux sont résistants à l'infection.

Le pouvoir lytique des sérums frais est perdu en soumettant les sérums à une température de 56°C durant 30 minutes, cette température détruit principalement le C₃ et ce phénomène paraît bien dépendre du complément. Les travaux de Rubio (1956) sont en faveur d'une activation du complément par la voie alterne et Kierszenbaum et al. (1976b) démontrent que la lyse des

formes trypomastigotes par du sérum frais de poulet (in vivo et in vitro) dépend de l'activation de la voie alterne du complément. Nogueira et al., (1975) confirment ces résultats dans le cas de la lyse de formes épimastigotes de culture par des sérums frais de lapin, de cobaye, et d'homme.

4. Les immuns complexes

La formation d'immuns complexes intervient lors de l'entrée de divers agents étrangers dans l'organisme. Ce processus fait partie d'une réponse immune normale, mais dans certaines situations il n'est pas seulement transitoire et un nombre croissant d'états pathologiques implique les immuns complexes. Ils peuvent se rencontrer dans les tissus ou en circulation dans le sérum et fixer ou non le complément.

La plupart des maladies parasitaires se caractérisent par des décharges chroniques de parasites dans les tissus ou dans la circulation et sont souvent associées à la formation d'immuns complexes (Lambert et al., 1968 ; Lambert et al., 1981 ; Butterworth et al., 1977). Parmi eux, un certain pourcentage est constitué par des immuns complexes d'origine parasitaire qui peuvent participer aux mécanismes effecteurs de la réponse immune (Capron et al., 1982, in press).

Des complexes immuns circulants de nature parasitaire ont été mis en évidence au cours d'infections expérimentales de souris par T. cruzi (phase aiguë de la maladie) (Chaves et al., 1979). Des travaux, effectués sur des sérums de patients en phase aiguë de l'infection corroborent ces résultats en montrant la présence dans les sérums d'immuns complexes de nature parasitaire (Martin et al., in press). Les auteurs effectuent une précipitation des sérums au PEG (polyéthylène-glycol) puis, après

dissociation des complexes immuns en milieu acide, les sérums sont testés par la technique de double diffusion en gel contre des fractions antigéniques de T. cruzi. Ces immuns complexes sont de nature IgM et réagissent contre la fraction microsomale de T. cruzi (Segura et al., 1977).

Fruit et al., (1979) montrent également la présence d'immuns complexes dans le sérum de patients en phase chronique de l'infection (technique de fixation du C1q aux immuns complexes). L'immunisation d'un lapin par les immuns complexes dissociés révèle leur nature parasitaire qui ne correspond pas à l'antigène 5 de T. cruzi décrit par Afchain (1976).

Des arguments expérimentaux indirects permettent de penser à la possibilité de dépôts d'immuns complexes dans les tissus au cours de l'infection par T. cruzi : Dos Santos et al. (1980a) montrent au début de l'infection de souris par T. cruzi un dépôt d'antigènes à la surface des cellules cardiaques suivi, au pic de parasitémie, d'un dépôt d'immunoglobulines. Des antigènes parasitaires apparaissent à la surface de cellules en culture, infectées par T. cruzi, après éclatement des cellules et libération des formes (72-96heures). Les cellules présenteraient des récepteurs capables de fixer des antigènes et si ce phénomène se produit in vivo il pourrait être à l'origine de dépôts d'immuns complexes dans les tissus (Kuhn et al., 1977; Dos Santos et al., 1981; Abrahamsohn et al., 1980).

5. Les anticorps anti-T. cruzi

La recherche des anticorps par des méthodes sérologiques permet le diagnostic de l'infection aux différentes phases de la maladie. Depuis la réaction de fixation du complément de Guerreiro et Machado en 1913, plusieurs techniques immunologiques sont utilisées et la mise au point de milieux de cultures a permis l'obtention d'une production massive d'antigène et une standardisation meilleure de ces techniques (Kelser, 1937; Mayer et Pifano, 1941 ; Fife et Kent, 1960 ; Maekelt, 1960).

5.1. Cas aigus

Les anticorps apparaissent environ au 20ème jour d'infection et atteignent des titres élevés (Muniz et al., 1944 ; Hauschka et al., 1950 ; Pizzi, 1962 ; Cerisola et al., 1969). Ils sont, à ce stade de l'infection, principalement de classe IgM (Vattuone et al., 1973 ; Camargo et al., 1974 ; Gonzalez-Cappa et al., 1973 ; Lelchuk et al., 1970) et il y a également en cas d'infection congénitale une production d'anticorps anti-T. cruzi en majorité de classe IgM (Szarfman et al., 1975).

Les sérums de patients en phase aiguë de l'infection agglutinent spontanément les formes épimastigotes de culture et cette agglutination est visible macroscopiquement. Toutefois, plusieurs auteurs constatent des réactions d'agglutination très importantes, par des sérums normaux qui rendent le test non interprétable pour des sérums de patients en phase chronique de l'infection, car les taux d'agglutination sont alors trop faibles comparés aux témoins (Senekjic et al., 1944 ; Muniz et al., 1946 ; Pifano, 1960 ; Maekelt, 1964). L'étude du type d'anticorps impliqués dans la réaction montre que les IgM et certains composants sériques comme la protéine C réactive de sérum d'individus non parasités, permettent une agglutination (Gonzalez-Cappa et al., 1973 ; Vattuone et al., 1973).

Le traitement enzymatique par la trypsine des épimastigotes, découvrant de nouveaux antigènes membranaires, a permis d'améliorer le test (Vattuone et al., 1971) et un test discriminatif, par traitement des sérums au 2-Mercaptoéthanol permet alors de faire le diagnostic chez des patients en phase aiguë ou chronique de l'infection (Schmunis et al., 1975 ; Storni et al., 1975).

Un extrait antigénique polysaccharidique de T. cruzi révèle des précipitines dans 97,9 % à 100 % des sérums de patients en phase aiguë de l'infection et seulement 17 % à 18 % des sérums en phase chronique. (Muniz et al., 1944 ; Pellegrino et al., 1956). Hoshino-Shimizu et al. (1978) confirment ce résultat en utilisant un antigène polysaccharidique dans un test d'hémagglutination. Les anticorps impliqués sont de classe IgM puisque après traitement au 2-Mercaptoéthanol, les sérums de cas aigus ne donnent plus d'hémagglutination. Il pourrait s'agir d'un antigène thymoindépendant n'apparaissant que dans la phase aiguë de la maladie. Afchain (communication personnelle) met en évidence un antigène spécifique de T. cruzi, de nature polysaccharidique, libéré dans les surnageants de milieux de culture des formes épimastigotes, trypomastigotes et non des formes amastigotes. Cette dernière donnée peut expliquer la faible incidence des anticorps dirigés contre un antigène polysaccharidique dans les sérums de patients en phase chronique de l'infection où le nombre de parasites circulants est très faible. Cet antigène semble être un candidat valable pour le diagnostic précoce de la maladie.

5.2. Cas chroniques

Des anticorps anti-T. cruzi se maintiennent tout au long de l'infection à des taux suffisants pour permettre le diagnostic immunologique. Les anticorps de classe IgM sont absents ou très faibles alors que les anticorps de classe IgG et IgA présentent des taux assez élevés (Lelchuk et al., 1970).

Ces anticorps sont capables de réagir avec des antigènes de surface du parasite (agglutination directe : A.D. ; immunofluorescence : IMF) ou des antigènes solubles somatiques, métaboliques ou structuraux (IMF, hémagglutination : Hmg, réaction de fixation du complément : RFC ; Enzyme Linked Immunosorbent Assay : ELISA ; radioimmunoassay : RIA ; précipitation en gel).

Les premiers antigènes utilisés étaient préparés à partir de broyats de foie ou de rate de chiens infectés (Mayer et al., 1914) et la présence de contaminants tissulaires dans ces extraits donnait lieu à de nombreuses fausses réactions avec des sérums de personnes non infectées.

Les parentés antigéniques entre les antigènes des différents stades évolutifs de T. cruzi sont importantes et cette propriété a permis la mise au point du diagnostic à partir d'antigènes de formes épimastigotes de culture. Les antigènes utilisés sont actuellement les formes ou les extraits solubles totaux de protéines et complexes protéiques des épimastigotes de culture. Certains laboratoires utilisent un extrait total délipidé (Maekelt, 1950 ; Fife et Kent, 1961) et selon les techniques l'un ou l'autre de ces antigènes donne de meilleurs résultats pour le diagnostic (l'antigène délipidé de Maekelt (1960) donne de très bons résultats pour la réaction de fixation du complément). Toutefois, il est tentant d'améliorer ces techniques en utilisation des antigènes purifiés ou semi-purifiés afin de résoudre les problèmes de réactions croisées que posent les sérums de patients porteurs de T. rangeli ou les patients atteints de leishmaniose et surtout afin de connaître de façon plus précise la qualité de la réponse humorale au cours de l'infection par T. cruzi.

La plupart des travaux de purification de fractions antigéniques de T. cruzi (Alves et Colli, 1975 ; Lederkremer et al., 1977 ; Gottlieb, 1977) ne s'attachent pas à l'étude de l'immunogénicité de ces fractions au cours de l'infection humaine.

Toutefois, l'étude de la mosaïque antigénique de plusieurs trypanosomatidae hétéroxènes, parasites de l'homme, menée par Afchain (1976) par analyse immunoélectrophorétique montre que le composant 5 de T. cruzi (localisation immunoélectrophorétique) est spécifique.

Ce composant est localisé à la surface des formes épimastigotes et trypomastigotes sanguicoles (Fruit et al., 1978), c'est une glycoprotéine (Afchain, 1976) et il est très immunogène, induisant la formation d'anticorps correspondants lors d'infections expérimentales et humaines et lors d'immunisations expérimentales (Afchain et al., 1976). Une étude immunoélectrophorétique faite sur des sérums humains brésiliens chagasiques montre la présence d'anticorps anti-Ag 5 dans le sérum de 60 % des cas aigus (10 cas), 94 % des cas chroniques avec une pathologie (17 cas), 50 % des cas chroniques asymptomatiques (16 cas) (Afchain et al., 1970).

L'immunoélectrophorèse semble être une approche intéressante de l'étude de la réponse immune humorale car elle est la seule qui donne une idée de la qualité des anticorps dans l'attente de fractions antigéniques purifiées utilisables en sérologie dans d'autres techniques.

L'utilisation de formes amastigotes pour rechercher les anticorps anti-T. cruzi par réaction d'immunofluorescence s'avère plus sensible que celle utilisant les formes épimastigotes (Cerisola et al., 1971). Un antigène préparé à partir de parasites cultivés sur cellules (mélange d'amastigotes et de trypomastigotes) révèle des taux d'anticorps plus élevés dans le sérum de patients infectés par T. cruzi qu'un antigène préparé à partir de formes épimastigotes (Neva et al., 1977 ; Gam et al., 1977). D'autre part, des antigènes spécifiques de stade sont décrits par différents auteurs (Kloetzel et al., 1975 ; Santiago et al., 1981).

Rappelons qu'au cours de l'infection chronique, la parasitémie est faible ou absente alors que les formes amastigotes intracellulaires prédominent.

Ainsi, l'étude de la réponse humorale au cours de la phase chronique de l'infection, réalisée avec des antigènes de formes épimastigotes, ne peut

être que restreinte, malheureusement c'est actuellement la seule forme qui peut s'obtenir en quantité massive.

6. Les autoanticorps circulants dans le sérum de patients infectés par T. cruzi

6.1. Rappels de l'anatomopathologie et de la physiopathologie de la maladie de Chagas

Deux types de réactions s'observent au cours de l'infection : des réactions inflammatoires et des réactions dégénératives.

Ces deux réactions sont plus intenses en phase aiguë de la maladie et elles se caractérisent en phase aiguë par :

- la présence de mononucléaires au voisinage des cellules parasitées avec phagocytose des parasites par les macrophages (Dias, 1934 ; Pizzi et al., 1955 ; Taliaffero et al., 1955) ;

- la présence de polynucléaires qui phagocytent les formes amastigotes libérées lors de l'éclatement des cellules (Andrade et al., 1966) ;

- des lésions dégénératives qui peuvent atteindre la nécrose des tissus subcutanés et adipeux (Mayer et al., 1912) avec dégénérescence en particulier des cellules musculaires et ganglionnaires (Koberle et al., 1960 ; Alcantara et al., 1965).

Les foyers inflammatoires sont ensuite plus diffus alors que les lésions dégénératives augmentent.

En phase chronique, le coeur augmente de poids (> 400 gr) et de volume ; il y a augmentation globale des cavités avec anévrisme de la pointe très caractéristique. L'examen microscopique montre des fibres musculaires

hypertrophiées ou atrophiées avec peu de réactions inflammatoires. L'anomalie la plus intense est la dénervation. Au niveau des méga-organes, la dénervation est également très intense.

Les travaux de Koberle (1956) montrent que ce phénomène est en corrélation avec la clinique : le taux de dénervation des organes est plus important chez des patients présentant une pathologie et à partir de 20 % de destruction apparaît une pathologie cardiaque, de 55 % une pathologie du colon, de 75 % une pathologie des bronches, de 85 % une pathologie de l'oesophage.

La première théorie émise pour expliquer la pathologie de la maladie de Chagas fut la théorie mécanique (action directe du parasite sur les cellules) mais des altérations importantes des tissus sont observées sans la présence du parasite. La deuxième théorie proposée fut la théorie toxique (Koberle et Alcantara, 1960), action à distance d'une substance comme une neurotoxine. Malissof, (1947) montrent la présence d'une toxine neuroplasique mais leurs travaux sont réfutés par ceux de Hauska et al. (1948) et depuis aucune toxine n'a pu être isolée.

La théorie autoimmune semble être la plus probable et repose sur les arguments suivants :

- Présence de dépôts d'immunoglobulines à la surface de cellules musculaires cardiaques ou de biceps (Laguens et al., 1975 ; Cossio et al., 1977 ; Szarfman et al., 1978)
- Présence d'autoanticorps dans le sérum de patients infectés (analyse détaillée des travaux dans le paragraphe suivant)
- Etat d'hypersensibilité de type retardé à des antigènes de coeur et de nerf (Santos/Buch et al., 1974 ; Vega et al., 1976 ; Cossio et al., 1976 ; Texeira et al., 1978)
- Mise en évidence de réactions croisées entre l'antigène de

- Mise en évidence de réactions croisées entre l'antigène de T. cruzi et de l'antigène de coeur, de gaine de Schwann et de fibroblastes (Cossio et al., 1974 ; Szarfman et al., 1974)

6.2. Les autoanticorps EVI (Endocardium - Vascular - Interstitium)

6.2.1. Mise en évidence

Cossio et al. (1974) mettent en évidence dans le sérum de patients chagasiques, en phase aiguë ou chronique de l'infection, des immunoglobulines réagissant avec des structures tissulaires présentes sur des coupes de coeur. La technique utilisée est celle de l'immunofluorescence indirecte et la fluorescence se localise au niveau de :

- l'endocarde
- l'endothélium vasculaire
- le tissu interstitiel

Sur d'autres tissus, cette fluorescence se limite à l'endothélium vasculaire (foie, reins, estomac, placenta). Les EVI ne sont pas spécifiques d'espèce, en effet ils peuvent être mis en évidence sur des coupes de coeur de différentes espèces d'animaux (homme, veau, cobaye, souris). La réaction peut aussi s'effectuer sur des coupes de muscle strié.

6.2.2. EVI et phase aiguë

Une étude de 38 cas montre que 63 % des patients présentent des anticorps EVI dans leur sérum (Szarfman et al., 1977). Deux patients infectés par accident de laboratoire ont présenté dans leur sérum des anticorps EVI (Hubsh et al., 1976). Schmunis et al. (1978) confirment la présence d'anticorps EVI en cas aigus et montrent que des individus traités au Nifurtimox maintiennent leur taux d'anticorps EVI alors que le taux des anticorps anti-T. cruzi chute.

6.2.3. EVI et phase chronique

Le premier travail de Cossio et al. (1974) montre que 95 % des patients infectés avec cardiopathie présentent des EVI dans leur sérum. Le travail de Diez et al. en 1976 corrobore ces premiers résultats mais ceux de Szarfman et al. (1978) et Sadiguský (1977) ne montre aucune relation entre, la présence dans le sérum de ces anticorps et la pathologie.

Ces résultats divergents peuvent dépendre des populations étudiées et nous analyserons la prépondérance des anticorps EVI parmi des populations boliviennes.

6.2.4. Spécificité des anticorps EVI

Des anticorps dirigés contre des structures cardiaques ont été mis en évidence dans le sérum de patients atteints de maladie cardiovasculaire (Kaplan et al., 1961 ; Person et al., 1974). Toutefois, il semble que la localisation de la fluorescence observée soit différente. En effet, Hubsh et al. (1976) montrent que le pourcentage de sérums de témoins sains ou atteints de maladie cardiovasculaire ou d'autres parasitoses présentant des anticorps EVI est faible (2 à 8 %). Les auteurs constatent cependant une fluorescence localisée à la striation des myofibrilles, au sarcoplasme et au sarcolème dans le sérum de 50 à 60 % des patients témoins. De même, la fluorescence de sérum de leishmaniens sur des coupes de coeur ou de muscles striés se localise à la striation, au sarcoplasme et au sarcolème (Szarfman et al., 1975).

6.3. Les autoanticorps anti-nerfs

Khroury et al. en 1979 mettent en évidence des anticorps anti-nerfs dans le sérum de chagasiques par réaction d'immunofluorescence indirecte, sur coupes de nerf sciatique de souris et d'homme. Les auteurs observent une

fluorescence péri-axonale, localisée au niveau de la gaine de Schwann mais aucune fluorescence sur des coupes de cerveau d'homme ou de souris. Dos Santos et al. (1976) contredisent ce résultat en observant une réaction positive d'immunofluorescence en utilisant des coupes de cerveau de souris.

63 % de patients présentant une parasitémie et récemment infectés (phase aiguë) possèdent des anticorps anti-nerfs dans leur sérum (Szarfman, 1977).

Au cours de la phase chronique de l'infection, Khoury et al. (1979) mettent en évidence des anticorps anti-nerfs dans le sérum de 83 % de malades présentant une cardiopathie. Dos Santos et al. (1976) confirment ce résultat en trouvant des anticorps anti-nerfs chez 96 % des patients en phase chronique de l'infection avec ou sans cardiopathie. Récemment, Szarfman et al. (1981) ont réalisé une étude détaillée sur la fréquence des anticorps EVI et des anticorps anti-nerfs chez des chagasiques de symptomatologies différentes : aucune relation n'est observée entre l'incidence de ces anticorps autoimmuns et la pathologie (Tableau n°3).

D'autre part, les auteurs observent une corrélation étroite entre la présence d'anticorps EVI dans les sérums et celle d'anticorps anti-nerfs.

Tableau n°3

Anticorps autoimmuns dans le sérum de chagasiques chroniques

(Szarfman et al., 1981)

Groupes	Nb. de patients et types d'autoanticorps	% Individus * titre \geq 6
Normaux	27	EVI 7.4
		anti-nerfs 3.7
douteux	29	EVI 58.6
		anti-nerfs 58.6
mégaoésophage stades I et II	15	EVI 66.6
		anti-nerfs 60.0
mégaoesophage stades III et IV ou/et mégacolon	14	EVI 57
		anti-nerfs 57
cardiopathie légère	19	EVI 68
		anti-nerfs 63.1
cardiopathie + mégaoesophage et/ou mégacolon	16	EVI 62.5
		anti-nerfs 62.5
cardiopathie sévère	9	EVI 55.5
		anti-nerfs 55.5

* inverse du titre (log 2)



MATERIEL ET METHODES

I. LES PATIENTS

1. Origine

Quatre groupes ont été étudiés.

- . Le premier groupe est composé de patients habitant La Paz (3800 m) ou sur l'altiplano bolivien (4000 m) venus consulter à l'Institut bolivien de Biologie d'Altitude à la Paz. Ces personnes ont été dirigées vers l'Institut par différents centres médicaux, avec une suspicion clinique ou parasitologique de la maladie de Chagas. Ces consultants ont pu s'infecter dans différentes régions de Bolivie mais vivent depuis plus d'un an à la Paz.
- . La deuxième population étudiée est composée de paysans habitant une vallée plus chaude, située à 100km de la Paz et à 2500 m. De nombreux triatomes infectés ont été trouvés autant dans les maisons que dans l'habitat péri-domestique (20 % : rapport du ministère bolivien de la santé, étude épidémiologique 1980, Dr Valencia).
- . La troisième population est composée de citadins habitant Camiri, ville pétrolière de 2000 habitants, située au sud de la Bolivie en zone tropicale. Notons que le nombre de triatomes infectés dans les maisons de Camiri même, a beaucoup diminué du fait de l'amélioration de l'habitat.
- . La quatrième population est composée de paysans, habitants d'un village (Salinas) situé à quelques kilomètres de Camiri où de nombreux triatomes infectés ont été trouvés dans les maisons comme dans l'habitat péri-domestiques (40 % : rapport du ministère bolivien de la santé, étude épidémiologique 1980, Dr Valencia).

2. Age moyen et sexe des populations

La comparaison de l'âge moyen des quatre populations (tableau 4) selon le test dit de Student montre que celle de La Paz est significativement plus âgée que celles de Chiwisivi, Camiri, Salinas; celle de Salinas significativement plus jeune que celles de La Paz, Chiwisivi, Camiri; celles de Camiri et de Chiwisivi comparables entre elles.

Il n'y a pas de différence significative entre l'âge moyen des femmes et des hommes dans ces populations par contre le pourcentage de femmes étudiées à Chiwisivi est faible (20,2 %).

3. Etude clinique des patients

Un examen clinique et un électrocardiogramme (Dr G. Antezana et Dr E. Ribaute, IBBA) permettent de classifier les patients selon les critères établis par l'OMS (1974) :

- . Stade I : Pas de signes cliniques, électrocardiogramme normal
- . Stade II : Signes cliniques modérés ou absents, électrocardiogramme avec l'une des altérations suivantes:
 - . Extra systole ventriculaire
 - . Bloc auriculo ventriculaire incomplet
 - . Bloc de branche droite incomplet ou complet
 - . Bloc de branche gauche incomplet ou complet
 - . Altération primaire de la repolarisation
- . Stade III : Signes cliniques évidents avec altérations suivantes de l'électrocardiogramme :
 - . Bloc de branche droite complet plus bloc du tronc antérieur gauche
 - . Zone électrique muette

TABLEAU N° 4

AGE et SEXE DES POPULATIONS SELECTIONNEES

	âge moyen	Pourcentage	
		% hommes	% femmes
LA PAZ	45,57 ± 10,61	61,7	48,3
CHIWISIVI	38,04 ± 13,55	79,8	20,2
CAMIRI	38,97 ± 13,62	47,8	52,2
SALINAS	33,27 ± 12,69	57	43



- . Bloc auriculo ventriculaire complet
- . Fibrillation ou flutter auriculaire

Pour les populations de Chiwisivi, Camiri, Salinas, les patients présentant un électrocardiogramme de stade II ou III sont considérés comme cardiopathiques ; aucun examen paraclinique supplémentaire n'est effectué. Pour les patients venus consulter à l'institut, une étude de la pathologie gastrique est aussi menée. Les examens du tube digestif sont effectués à l'hôpital gastroentérologique de La Paz (Hospital gastroenterologico Boliviano Japonés, Dr J. PABON).

Pour la détection des méga-oesophages, un interrogatoire du malade et une radiographie de l'oesophage sont effectués. Le diagnostic est basé sur l'image radiologique.

Après lavage de l'oesophage, une radiographie du côté antérieur droit (malade debout) est faite. Les malades présentant à la radiographie une rétention oesophagienne sans dilatation, ou une dilatation évaluée selon la classification de Ferreira Santos (1961), sont considérés comme présentant une méga-oesophage.

Pour la détection des méga-colons, quatre clichés radiologiques sont pris après lavage barité. Sont considérés comme présentant un méga-colon, les sujets avec dolicosigmoïde (longueur anormale du colon) ou un mégasigmoïde (largeur anormale du colon) (J. PABON et al., 1980, soumis pour publication). La classification établie est celle des gastroentérologues de La Paz.

4. Prélèvement de sang

Les sangs veineux sont prélevés dans des "vacuteners" stériles" et laissés quelques heures à coaguler à la température du laboratoire puis

une nuit à 4°C et sont centrifugés. Les sérums sont alors récupérés, distribués et congelés à -70°C.

II. DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE DE L'INFECTION PAR T. CRUZI

Une goutte de sang prélevée au bout du doigt est examinée entre lame et lamelle au microscope et les parasites recherchés.

Un frottis et une goutte épaisse sont également effectués et après coloration au "May-Grunwald" examinés au microscope et les parasites recherchés.

Un xénodiagnostic est effectué de manière systématique chez les sujets venus consulter à l'Institut. Trois boîtes contenant chacune 10 triatomes (*Triatoma infestans*) sains sont fixées sur chaque cuisse et sur la poitrine gauche pendant une 1/2 heure afin de permettre aux triatomes de se nourrir du sang du patient par piqûre. L'infection des triatomes se vérifie au microscope par examen des fécès de l'insecte 30 jours, 60 jours, 90 jours après l'exposition du patient aux triatomes (voir photo p. 33).

III. PREPARATION DES ANTIGENES

1. Souches utilisées

- Trypanosoma cruzi Tehuantepec

Cette souche a été isolée en 1938 par E. Brumpt à partir de Triatoma Sp. trouvés infectés dans la région de Tehuantepec au Mexique (Darman, 1941). Maintenu en culture in vitro depuis 1959 dans le service de Parasitologie de l'Institut Pasteur de Paris, elle nous a été donnée par le CIBP de l'Institut Pasteur de Lille qui l'entretenait en culture depuis 1967.

XENODIAGNOSTIC



5MS
EALF

603

- Trypanosoma (Herpetomosa) rangeli RG -B-

Cette souche a été isolée in vitro en 1949, à partir d'un chien "PIFANO" (HERBIG-SANDREUTER, 1957).

Elle nous a été donnée par l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers (ITMA) (département de protozoologie du Professeur WERY)

2. Cultures in vitro

Le milieu de culture utilisé est le GLSH (glucose, lactalbumine hydrolysée, sérum, hémoglobine), initialement décrit par JADIN et PIERREUX (1960) modifié légèrement par JADIN et LE RAY (1969) pour l'ensemble de la culture des Trypanosomatidae.

L'entretien des souches en routine est réalisé en veintubes stériles contenant 3 à 4 ml de milieu GLSH. Les subcultures sont effectuées de manière systématique une fois par semaine.

Les cultures massives s'effectuent progressivement selon le schéma de la figure n°2.

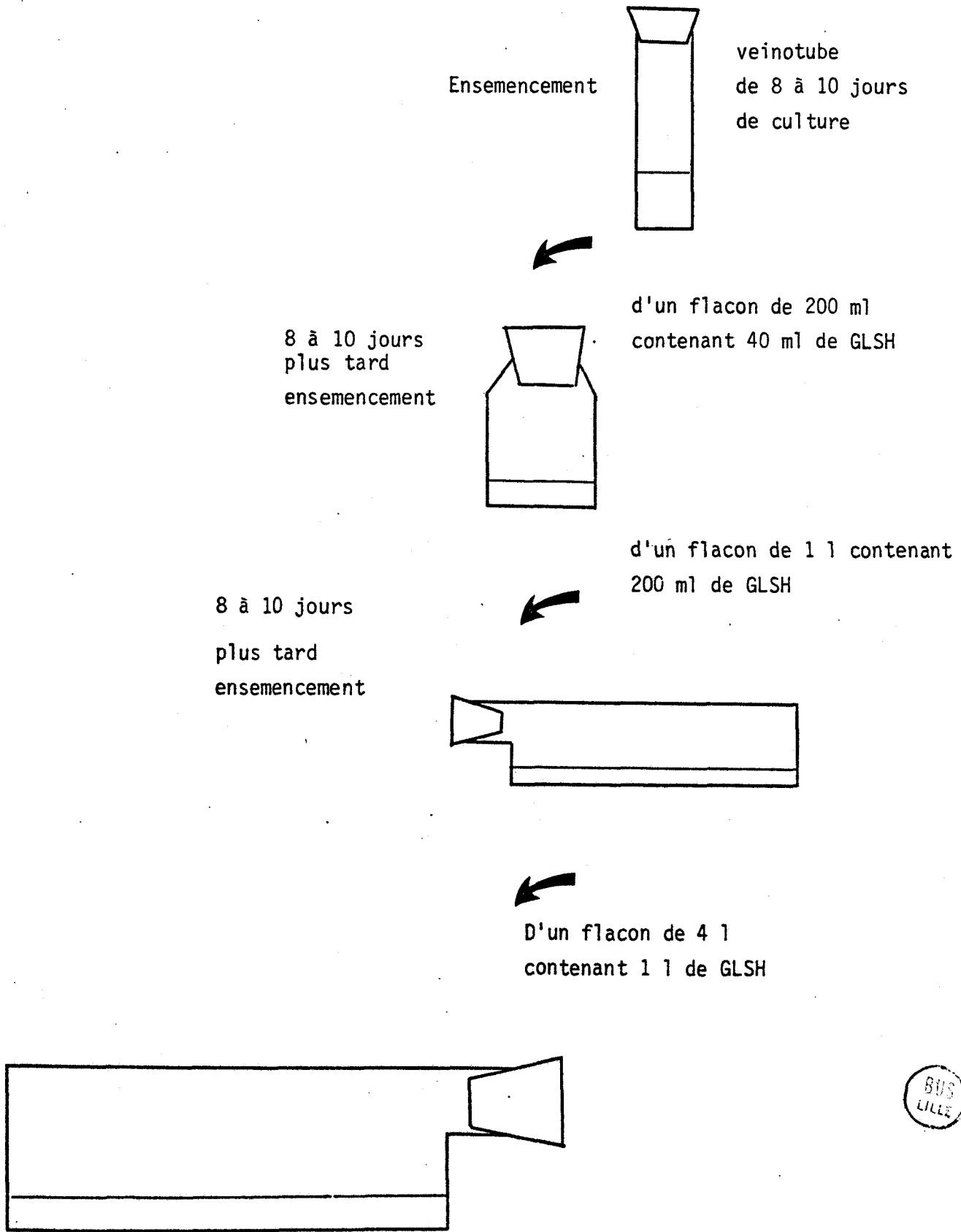
3. Préparation des formes épimastigotes utilisées pour la réaction d'immunofluorescence indirecte (IMF)

La méthode a été mise au point par Weller et Coons (1954). Elle utilise comme antigène un antigène figuré, c'est-à-dire les formes épimastigotes de culture.

Un à deux tubes de culture de 8 ou 10 jours sont centrifugés à 3000 t/min et le culot de parasites lavé dans du Hanks Wallace trois fois. Le culot est resuspendu dans environ 2 ml de PBS pH 7.4 et une goutte de glutaraldéhyde à 2.5 % ou de formol à 0,2 %

FIGURE 2

PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L'OBTENTION DE CULTURES MASSIVES



BUS
LILLE

ajoutée au tube. Dix minutes plus tard, le tube est à nouveau centrifugé et le culot lavé une fois dans du Hanks Wallace. Le dernier culot de centrifugation est suspendu dans du PBS. Les parasites sont ainsi fixés. On utilise ensuite la technique des gouttes sur lames porte objet. On trace trois puits par lame à l'aide d'un diamant, une goutte est déposée sur chaque puits et on laisse sécher pendant deux heures. Les plaques sont ensuite conservées à -70°C . La fixation au formol donne une fluorescence plus diffuse tandis que celle à la glutaraldéhyde donne une fluorescence membranaire. Nous avons adopté la fixation à la glutaraldéhyde.

4. Préparation d'un extrait soluble brut par éclatement sous pression

La technique utilisée est celle des Argentins qui substituent l'action du pilonnage des parasites dans un mortier glace, associée à des congélations, décongélations, à l'action d'une pression de 10 à 20 tonnes sur la suspension congelée de parasites.

Des cultures massives de 10 à 15 jours sont centrifugées à 3500 t/min, le culot lavé 3 fois dans du Hanks Wallace et le dernier culot de centrifugation suspendu dans une solution hypotonique (NaCl 1 ‰) à raison de 1 ml/g poids humide (culot de centrifugation après les lavages). La solution hypotonique permet de faire éclater les parasites. Cet extrait antigénique est ensuite soumis à une pression de plusieurs tonnes à l'aide d'une presse spéciale (X Press, LKB) et ceci trois fois. La presse est constituée de deux chambres séparées par une pièce percée d'un petit orifice. Sous l'action de la pression, il y a un changement de phase soudain de la glace en eau, ce qui permet l'écoulement du matériel à travers l'orifice et la complète désintégration des cellules. Cet extrait antigénique est utilisé dans les réactions de précipitation en gel.

5. Extrait antigénique soluble lyophilisé

Le précédent extrait est centrifugé à 26 000 g pendant une heure à 4°C. Le surnageant est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant 24 heures puis lyophilisé. Cet antigène soluble a été utilisé pour les réactions d'ELISA et de RFC et du RAST.

IV. ETUDES SEROLOGIQUES

1. Dosage des immunoglobulines totales

Le dosage des immunoglobulines s'effectue par immuno-diffusion radiale utilisant des plaques Behring (TRI partigen IgG, IgM, IgA, Lc partigen IgE). Les sérums dilués ou purs sont déposés dans des puits percés dans la gélose contenant des anti-immunoglobulines. Après un certain temps de diffusion, il se forme des anneaux de précipitation mesurés, à l'aide d'une règle spéciale (Behring Institut) qui permet la lecture directe du diamètre au carré. Le diamètre au carré de l'anneau de précipitation est proportionnel à la quantité d'immunoglobulines du sérum.

Chaque protocole est accompagné de standards qui sont indispensables à l'interprétation des résultats.

L'équation de la courbe standard est calculée sur ordinateur selon une courbe de régression linéaire de type : $y = ax + b$ ($y =$ diamètre au carré ; $x =$ concentration des immunoglobulines). La valeur à l'origine de cette droite, doit se trouver dans certaines limites indiquées par la firme de commercialisation des plaques. Si cette valeur sort des limites, le protocole est annulé. Par ailleurs, ces plaques présentent des valeurs limites de mesure et si un sérum sort des limites de mesure

il sera repris à une dilution supérieure.

Valeurs limites de mesure des plaques :

- . IgG : 19 UI/ml à 226 UI/ml
- . IgA : 16 UI/ml à 108 UI/ml
- . IgM : 39 UI/ml à 495 UI/ml
- . IgE : 920 UI/ml à 11000 UI/ml

Les valeurs normales d'individus d'Europe entre 15 et 65 ans sont :

	moyenne	valeurs extrêmes
. IgG	144 UI/ml	92 UI/ml - 207 UI/ml
. IgA	125 UI/ml	54 UI/ml - 268 UI/ml
. IgM hommes	144 UI/ml	69 UI/ml - 287 UI/ml
. IgM femmes	184 UI/ml	80 UI/ml - 322 UI/ml
. IgE	taux pathologiques: > 700 UI/ml	

Il n'y a pas de différence pour les taux des immunoglobulines de classes IgG, IgA, IgE, entre hommes et femmes.

2. IgE spécifiques

Les sérums sont testés par la technique du RAST (Radioallergo-sorbent test) pour détecter les anticorps de classe IgE spécifiques de T. cruzi (KRAFT et al., 1976). 10 mg d'extrait antigénique soluble lyophilisé de formes épimastigotes de culture, sont mélangés à 100 mg de particules microcristallines de cellulose activées au CNBr. Puis, 0,05ml de sérum sont ajoutés à 0,5 ml de particules. Après lavage pour éliminer les IgE non spécifiques, la solution est incubée avec 0,05 ml d'anti-IgE (0,8 µg ; 185 KBq Pharmacia AB, Uppsala). Les deux étapes d'incubation sont réalisées par agitation verticale des tubes et chaque sérum traité en triple.

La quantité d'IgE spécifique est proportionnelle au taux de radioactivité fixée (Bound = B) sur les particules, comparé au taux de la radioactivité totale introduite dans les tubes (total = T). Les résultats s'expriment en pourcentage de fixation : B/T.

3. Dosage des immuns complexes (I.C.)

Le dosage des immuns complexes est réalisé par la méthode de fixation du Clq de NYDEGGER et al. (1974). Du Clq marqué à ^{125}I ode, ajouté à un sérum, se fixe sur les immuns-complexes et l'adjonction de polyéthylène glycol (PEG) à une concentration finale de 2,5 % permet la précipitation des immuns complexes marqués. Après centrifugation la radioactivité est mesurée dans les culots. Le taux de radioactivité est proportionnel à la quantité de Clq marqué dans le culot qui est elle même proportionnelle à la quantité de Clq fixé sur les immuns complexes, c'est-à-dire, à la quantité d'immuns complexes présents dans le sérum à l'origine.

Ces dosages sont réalisés au CIBP de l'Institut Pasteur de Lille sur des sérums de Camiri lyophilisés. 25 μl de sérum sont mélangés à 50 μl d'EDTA (0.2 M) et à 75 μl de tampon VBS (Biomerieux) et décomplémentés une demi-heure à 37°C. Ensuite 50 μl de Clq ^{125}I sont ajoutés (50 μl donnent 10000 cpm). Tous les tests sont réalisés en triple. Nous laissons le mélange incuber une heure à 60°C Puis une heure à 4°C. Les tubes sont enfin centrifugés à 3500 t/min à 4°C pendant 20 minutes. Les surnageants sont décantés et la radioactivité mesurée sur un compteur gamma (Intertechnique PG 4000).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de Clq fixé aux I.C. précipités. Ce pourcentage est calculé par rapport au Clq total précipité par de l'acide trichloracétique (TCA) 20 %.

4. Dosages du C3 activateur, C3c et du C4

Ces dosages sont réalisés par immunodiffusion radiale sur des plaques Behring (Lc-Partigen pour le C3 activateur, M-Partigen C3c et M Partigen pour le C4). Le protocole expérimental est semblable à celui suivi pour le dosage des immunoglobulines totales.

Les domaines de mesure sont les suivants :

- . C3act. 0,8... 13,5 mg/100 ml
- . C3c 9,5... 132 mg/100 ml
- . C4 2,5... 35 mg/100 ml

et les valeurs normales de sujets sains européens de 10 à 90 ans.

- . C3act. 10-45 mg/100 ml
- . C3c 50-120 mg/100 ml
- . C4 20-56 mg/100 ml

dilué dans du PBS pH 7,4 au 1/100ème auquel 15 mg d'antigène soluble de muscle de lapin ont été ajoutés afin d'absorber les composants du conjugué

5. Techniques quantitatives de dosage des anticorps anti-T. cruzi

5.1. Réaction d'immunofluorescence indirecte (IMF)

* Principe

Il s'agit de visualiser la liaison spécifique antigène - anticorps en marquant les anticorps par une substance fluorescente en lumière ultra-violette (fluorochrome).

L'application pratique en a été faite dès 1942 par COONS et al., en fixant de l'isothiocyanate de fluorescéine à des immunoglobulines à fonction anticorps. Cette technique permet de révéler directement les liaisons antigène-anticorps. Une modification de la méthode directe

est la méthode indirecte dite à "deux couches" qui utilise des immunoglobulines marquées anti-immunoglobulines de l'espèce animale ayant servi à l'immunisation. Cette méthode serait selon NAIR (1969) plus sensible en raison de la disposition en éventail des complexes antigène-anticorps révélés par les anti-immunoglobulines marquées. Ces immunoglobulines marquées sont actuellement commercialisées et de bonne qualité.

* Protocole expérimental

La technique suivie est celle de WELLER et COONS (1954), adaptée aux conditions de laboratoire.

Les dilutions sériées des sérums sont effectuées en PBS pH 7.4. Chaque dilution est déposée sur un puits d'antigène et les lames sont mises à incuber une demi-heure à la température du laboratoire. Après trois lavages des plaques en PBS pH 7.4, les immunoglobulines marquées sont déposées sur l'antigène. Ces immunoglobulines marquées (conjugué) sont diluées 200 fois dans une solution de Bleu d'Evans préparé dans du PBS pH 7.4 au 1/7500^{ème} (Institut Pasteur : Immunoglobuline totales humaines 2,95 mg/ml protéines anticorps). Les plaques sont à nouveau mise à incuber une demi-heure à la température du laboratoire. Nous effectuons ensuite trois lavages en PBS puis les lames sont montées avec de la glycérine 50 % pour l'observation au microscope Leitz avec un filtre BG 12.

Chaque protocole comprend un témoin positif et un témoin négatif. Chaque nouveau lot de conjugué est titré par rapport à des sérums négatifs et positifs déjà connus.

* Lecture et interprétation

La dernière dilution fluorescente sera prise comme titre de positivité. La lecture a été réalisée le plus souvent par la même personne ou par une seconde personne entraînée avec la précédente afin d'avoir les mêmes critères de positivité. Il faut remarquer qu'une dilution de différence entre deux sérums n'est pas significative.

5.2. Réaction d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays)

* Principe

Il s'agit de visualiser et quantifier une réaction antigène-anticorps non pas en utilisant comme en immunofluorescence des anticorps marqués par une substance fluorescente mais des anticorps marqués par une enzyme qui, en contact avec son substrat, donnera une réaction colorée proportionnelle à la quantité d'enzyme entrant dans la réaction.

Ces réactions utilisent des antigènes solubles fixés par liaisons covalentes, ou liaisons de type électrostatique, à des supports solides. Le choix du support est sans doute déterminant quant à la précision de la technique.

Les différentes étapes de la réaction sont schématisées sur la figure n°3.

* Protocole expérimental

Le protocole expérimental est celui de Bout et al., (1975) adapté à l'antigène soluble de T. cruzi.

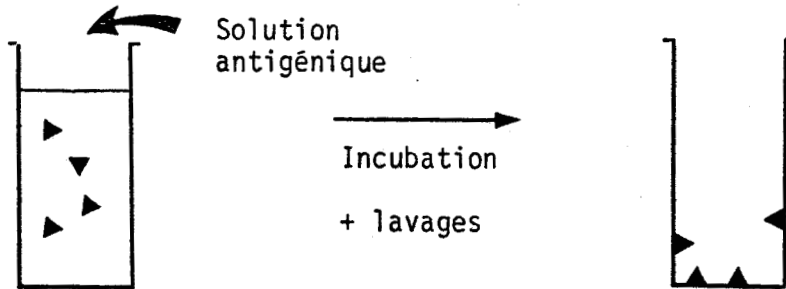
. Le coating est réalisé dans des tubes à hémolyse de polyéthylène

Les tubes contenant 1 ml de solution antigénique (10 µg/ml) en tampon PBS azide pH 7.2 sont mis à incuber pendant trois heures à 37°C. Trois lavages (aspirations, remplissages en PBS pH 7.2 tween

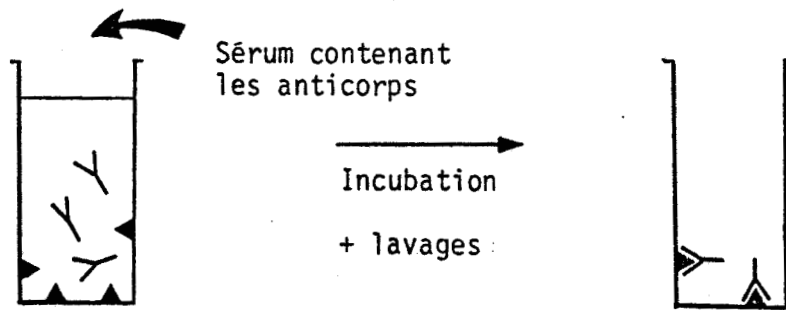
FIGURE N°3

ETAPES EXPERIMENTALES DE LA REACTION D'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

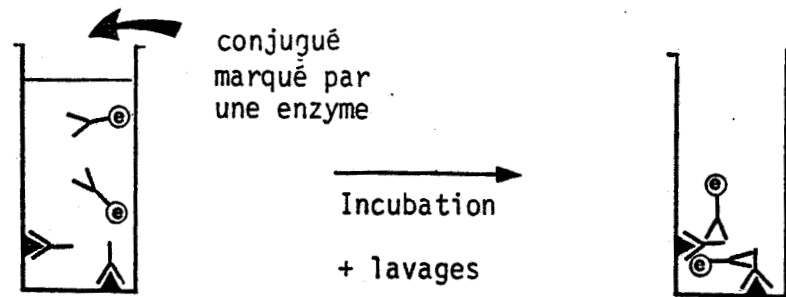
1. Sensibilisation du support par l'antigène (coating)



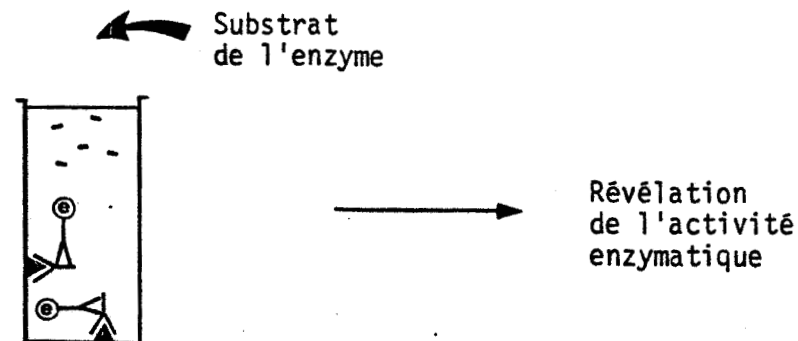
2. Fixation des anticorps



3. Fixation du conjugué



4. Révélation de l'activité enzymatique



20, 0,05 %) sont effectués. Un ml de sérum dilué dans du PBS pH 7,2, Tween 20,0,05 % est déposé dans chaque tube et les tubes sont incubés quatre heures à la température du laboratoire. Ensuite, trois lavages sont effectués comme précédemment. Un ml de conjugué (antiimmunoglobulines totales humaines) marqué à la peroxidase (Institut Pasteur 1,25 mg/ml), dilué dans du PBS tween 20, 0,05 % pH 7,2 est ajouté à chaque tube et les tubes de nouveau incubés une nuit à 4°C.

Le lendemain le substrat enzymatique [0,6 ml de tampon phosphate pH 6 + 0,6 ml de H₂O₂ 0.3 % + 58.8 ml d'eau distillée + 0.5 ml d'ortho-dianisidine (10 mg/ml de méthanol)] est ajouté à raison d'un ml par tube et laissé en contact pendant une heure. Après ce délai, la réaction est stoppée par une goutte d'acide chlorhydrique 5N dans les tubes.

La lecture de la densité optique est faite à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckmann) à 405 nm, en prenant comme blanc le substrat. Chaque sérum est traité en triple au cours du même protocole. Tous les protocoles comprennent un témoin positif et un témoin négatif. Nous faisons la moyenne des trois densités optiques obtenues pour un même sérum. Si une des valeurs est très éloignée des deux autres, celle-ci est écartée.

5.3. Réaction de fixation du complément (RFC)

* Principe

Le principe de cette réaction est basé sur la consommation de complément par les complexes immuns de telle manière que le complément n'est plus disponible pour lyser des globules rouges sensibilisés à l'hémolysine, ajoutés lors de la dernière étape de la réaction. Les sérums décomplémentés sont mis en présence d'antigène soluble et de complément. Si le sérum contient des anticorps dirigés

contre l'antigène utilisé, il se forme des complexes antigène-anticorps-complément. En ajoutant un système hémolytique (globules rouges sensibilisés à l'hémolysine) à cette solution, plus le sérum contiendra d'anticorps, moins il y aura de complément disponible dans le milieu pour produire l'hémolyse.

* Composants utilisés

La méthode utilisée est celle de GUERREIRO et MACHADO, (1913) modifiée par KENT et al. (1963) et adaptée aux conditions de laboratoire.

L'antigène utilisé est l'antigène soluble lyophilisé des formes épimastigotes de cultures de T. cruzi et un même lot a été pris pour toutes les expériences. La concentration est de 0,2 mg/ml.

Le même tampon est utilisé pour toutes les dilutions ainsi que pour la préparation des globules rouges.

Composition : 1 volume de tampon VBS (veronal bicarbonate salt)

pH 7.3 - 7.4 ;

4 volumes de gélatine (1.25 g/l)

Le tampon VBS contient des ions Mg^{++} et Ca^{++} en concentrations optimales afin de permettre la lyse immune.

La solution de gélatine permet de densifier le milieu.

Le complément utilisé est du complément de cobaye lyophilisé , commercialisé (Behring Institut).

Le système hémolytique est réalisé par l'incubation de globules rouges de moutons (prélevés en alselver, lavés trois fois dans du tampon VBS puis suspendu dans ce même tampon à raison de 0.5 ml dans 14 ml de tampon) dans une solution d'hémolysine obtenue par immunisation de lapin par des globules rouges de mouton (Behring Institut). L'incubation se fait volume à volume à 37°C pendant une demi-heure.

* Protocole expérimental

La technique est réalisée en microplaques. Les sérums décomplé-

mentés sont dilués de façon sériée à partir d'une dilution au 1/2 et distribués sur la plaque :

- . 25 μ l de sérum dilué
- . 25 μ l d'antigène (0.2 mg/ml)
- . 50 μ l de complément (1/50ème)

Après une nuit à 4°C, 50 μ l de globules rouges sensibilisés (hémolysine 1/500) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est laissée une heure à 4°C avant d'être centrifugée.

Chaque protocole expérimental comprend un sérum témoin positif, un autre négatif. D'autre part les sérums sont testés dans les mêmes conditions, avec des globules rouges non sensibilisés à l'hémolysine afin d'écartier les sérums qui donneraient spontanément une hémolyse.

Enfin, tous les protocoles comprennent un témoin complément afin de contrôler son pouvoir hémolytique:

	dilutions des sérums		
	1/50	1/100	1/200
complément + antigène	H	-	-
complément + tampon	H	-	-

et un témoin cellules: globules rouges de moutons sensibilisés seuls

Lecture : Si le sérum contient des anticorps anti-T. cruzi il y aura inhibition de la lyse et ceci jusqu'à une certaine dilution. Après centrifugation, les globules rouges sédimentent au fond de chaque puits. Si le sérum ne contient pas d'anticorps anti-T. cruzi, le complément libre lysera les globules rouges et après centrifugation, seul restera un tout petit sédiment (membrane des globules rouges) et le surnageant sera coloré par l'hémoglobine libérée.

La dernière dilution pour laquelle subsiste une hémolyse partielle sera considérée comme titre définitif.

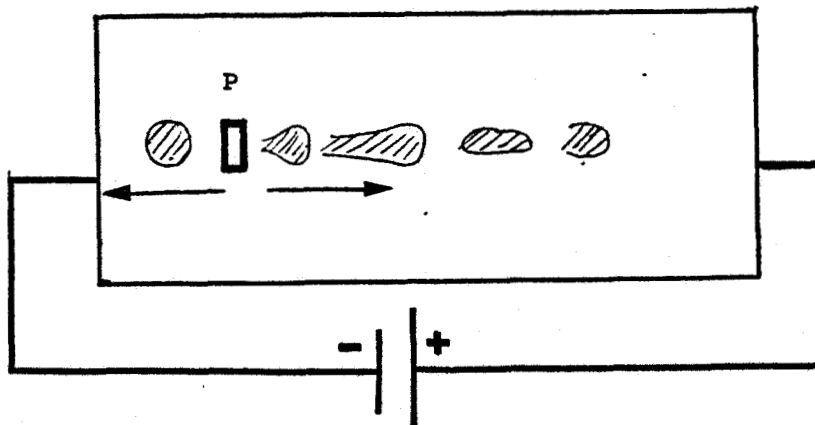
6. Techniques qualitatives de dosage des anticorps anti-T. cruzi
(précipitation en gel)

6.1. Immunoélectrophorèse (IEP)

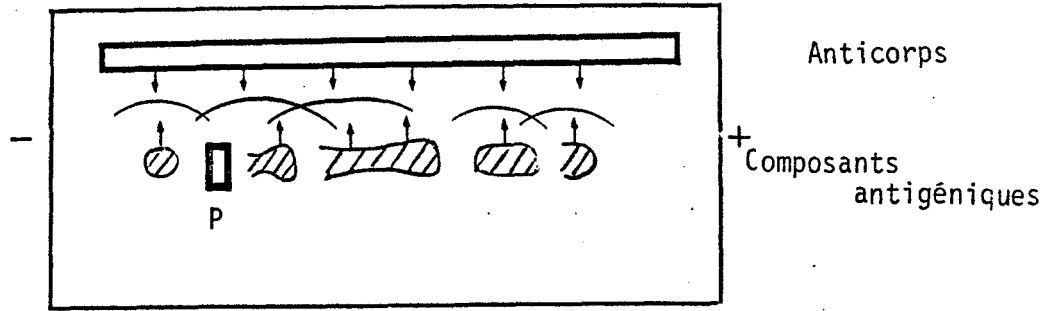
L'immunoélectrophorèse est basée sur deux propriétés des composants antigéniques : leur charge, et leur spécificité immunochimique. La première propriété se caractérise par une mobilité électrophorétique propre de l'antigène dans un milieu gélosé. La seconde par sa capacité à former un précipité avec les anticorps correspondants dans des conditions optimales de concentrations respectives de l'antigène et de l'anticorps. GRABAR et BURTIN dans leur traité (1964) détaillent le principe et les différentes applications de l'analyse immunoélectrophorétique.

Schéma théorique de l'immunoélectrophorèse

1er temps : Migration des composants antigéniques à partir du puits P de dépôt.

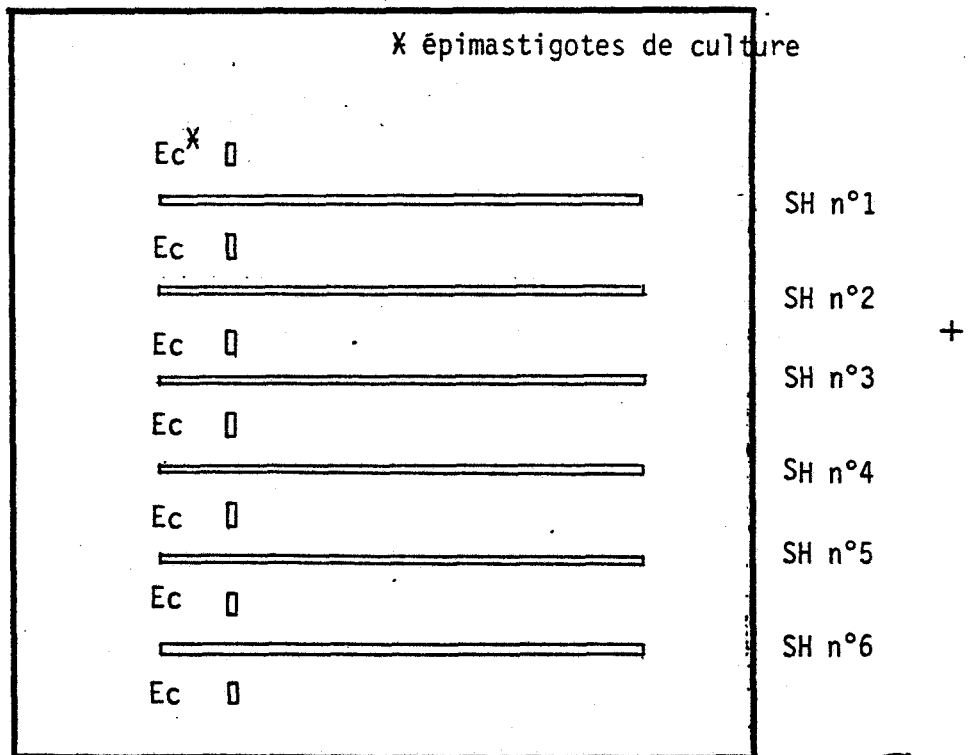


2ème temps : Diffusion des composants antigéniques et des anticorps jusqu'à équilibre et formation d'arcs de précipitation



La méthode utilisée est celle de GRAGAR et WILLAMS mise au point par AFCHAIN (1976) pour la caractérisation antigénique des Trypanosomatidae Hétéroxènes parasites de l'homme.

Nous présentons ci-dessous le diagramme utilisé en routine pour réaliser les immunoélectrophorèses des sérums.



- . Dimensions de la lame : 10 x 10 cm
- . Volume d'agarose 1 % (Indubiose agarose, IBF) : 20 ml
- . Volume de dépôt de l'extrait antigénique X Press T. cruzi ou T. rangeli : 14 µl

- Volume de dépôt du sérum concentré trois fois : 100 µl
- Voltage aux bornes de la plaque et durée : 20 volts, 2 h 30
- Tampon de migration : tampon véronal pH 8.2 (160 g de barbital sodique + 220 ml HCl 1N, qsp 10 l)

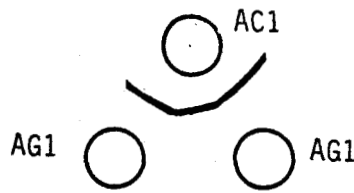
La diffusion est de 48 heures, puis les lames sont plongées dans un bain de citrate trisodique à 5 % pendant 2 à 3 heures (élimination d'arcs de précipitation non spécifiques dus à la substance C (Afchain, 1976)). Les plaques sont ensuite lavées pendant 48 heures dans de l'eau physiologique tamponnée (9 l de Na Cl 9 ‰ + 1 l de tampon véronal pH 8.2). La dernière étape est celle de déminéralisation qui s'effectue après rinçage des plaques en eau distillée, en déposant sur la gélose un papier filtre (Watmann n°1) jusqu'à séchage complet de celle-ci sur la plaque de verre. Les plaques sont enfin colorées pendant 5 à 10 minutes dans une solution d'Amidoschwartz [1 g de noir soudan + 425 ml d'acétate de sodium, (13.6 g/l) + 425 ml d'acide acétique 60 %]. La décoloration se fait avec de l'acide acétique 60 %.

L'interprétation se fait sur deux points : le nombre d'arcs précipitants et leur localisation.

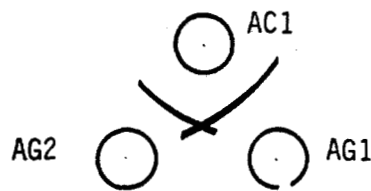
6.2. Immunodiffusion en gel et identification des anticorps anti-antigène 5 de T. cruzi

La diffusion d'un antigène dans un milieu gélosé vers son anticorps provoque au point d'équivalence, c'est-à-dire dans des conditions optimales de concentration de l'antigène et de l'anticorps pour un système donné, la formation d'un précipité.

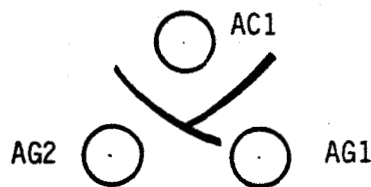
Si une même préparation antigénique est introduite simultanément dans deux puits adjacents face à un puits contenant les anticorps correspondants, les deux précipités vont se rejoindre si les puits ne sont pas trop éloignés. On parle alors de réaction d'identité.



Si au contraire deux solutions antigéniques différentes sont déposées, les traits de précipitation vont se couper, on parle alors de réaction de non identité.



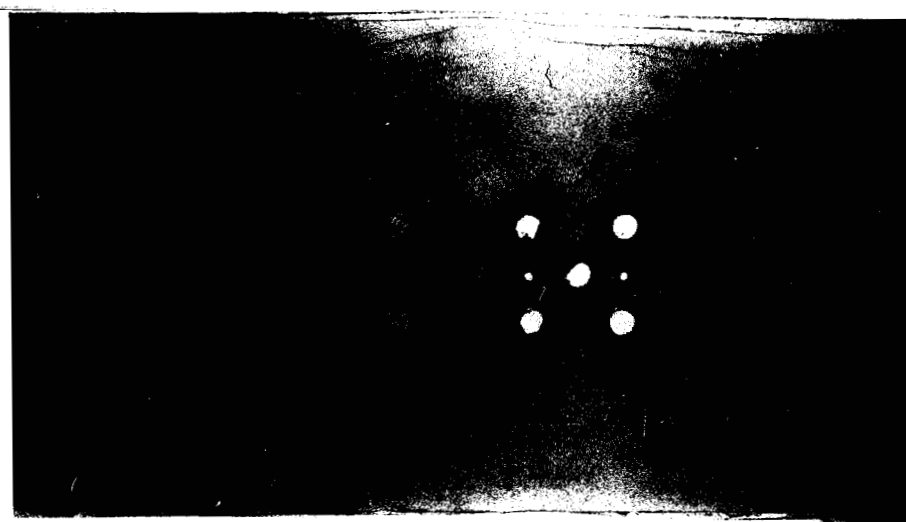
Enfin, si deux solutions antigéniques donnent lieu à une réaction croisée, les bandes de précipitation vont fusionner mais on notera une pointe qui marque la différence partielle entre les deux molécules.



Nous avons utilisé la réaction de double diffusion en gel pour rechercher dans les sérums la présence des anticorps anti-antigène 5.

Cette mise en évidence s'est faite par réaction d'identité entre un sérum monospécifique anti-antigène 5 produit chez le lapin et fourni par le laboratoire du Docteur D. Afchain (CIBP Lille) et les sérums humains face à un extrait antigénique T. cruzi X Press. Le modèle employé a été celui utilisé dans le diagnostic spécifique de l'hydatidose développé par BOUT et al. (1979), (voir photo p. 49).

Immunodiffusion et identification des anticorps
anti antigène 5 de T. cruzi



- a : Antigène épimastigote de T. cruzi (extrait X Press) = 2 μ l.
b : Hyperimmunsérum anti-antigène 5 de T. cruzi majeur = 12 μ l
1,2,3,4, : Sérums humains de patients = 12 μ l

Les sérums sont concentrés trois fois et la diffusion dure 48 heures. Les étapes suivantes sont en tous points analogues au traitement des plaques d'immunoélectrophorèse après leur diffusion.

L'arc Ag5-Ac anti.5 présente ou non une réaction d'identité avec un des arcs formés entre le sérum humain et l'extrait antigénique.

7. Dosage des autoanticorps (EVI)

La technique d'immunofluorescence permet de mettre en évidence des autoanticorps anti-EVI, c'est-à-dire dirigés contre l'endocardium, l'endothélium vasculaire, l'interstitium myocardique, dans le sérum de patients.

La technique de Cossio et al. (1974) adaptée aux conditions de laboratoire a été suivie.

- Coupes : Nous utilisons des coupes de coeur de souris de 2 μ d'épaisseur faites à l'aide d'un cryostat à -20°C. Les coupes sont déposées sur une lame porte objets à raison de trois par lame ; elles sont ensuite conservées à -20°C. Avant emploi, les coupes sont décongelées sous ventilation légère à la température du laboratoire.
- 1er temps de contact : Les sérums sont dilués de façon sériée à partir d'une dilution au 1/10ème dans du PBS pH 7.4. 1 goutte de sérum dilué est déposée sur chaque coupe mise à incuber une demi-heure à 37°C. On réalise ensuite trois lavages en PBS pH 7.4.
- 2ème temps de contact : Le conjugué anti-immunoglobulines totales humaines marquées à la fluorescéine (Institut Pasteur) est dilué dans du PBS pH 7,4 au 1/100ème auquel 15 mg d'antigène soluble de muscle de lapin ont été ajoutés afin d'absorber les composants du conjugué qui donnent une fluorescence non spécifique. Cette absorption s'effectue

à 37°C pendant 2 heures puis pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, le conjugué est centrifugé à 5000 t/min pendant une demi-heure et le surnageant récupéré. Juste avant l'emploi, on ajoute du bleu d'Evans à une dilution finale de 1/7500. Le temps de contact avec le conjugué est d'une demi-heure à la température de 37°C. Après trois autres lavages dans du PBS, les lames sont montées (glycérine 50%).

La lecture se fait au microscope en lumière ultra-violette (Leitz filtre BG 12), le critère de positivité est l'observation d'une fluorescence à la fois au niveau :

- . de l'endocardium
- . de l'endothélium vasculaire
- . de l'interstitium myocardique.

Les dilutions des sérums étant sériées, l'observation se fait selon un critère d'extinction de la fluorescence. La dernière dilution fluorescente sera retenue comme titre du sérum pour cette technique. Chaque protocole comprend un témoin positif et un témoin négatif qui nous ont été fournis par le Dr Mirtha STREIGER (Santa-Fé en Argentine).

RESULTATS

I. TAUX DES IMMUNOGLOBULINES DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION

1.1. Immunoglobulines de classe IgG, IgM, IgA

Les taux des immunoglobulines totales de classe IgG, IgM, IgA sont étudiés parmi trois populations boliviennes (figures n°4,5,6). Les sujets infectés par T. cruzi sont sélectionnés par trois réactions sérologiques positives parmi les réactions d'IMF, d'ELISA, de RFC et d'IEP.

Les moyennes arithmétiques sont calculées pour chaque population. L'écart type à la moyenne est calculé, après vérification des variances, dans le cas de populations dont les deux effectifs des patients infectés et des témoins dépassent 30. Dans le cas contraire, l'écart-type à l'effectif est utilisé.

La signification statistique des différences entre les moyennes de chaque population est analysée selon le test du t de Student.

Les patients infectés de Chiwisivi présentent des taux d'IgG et d'IgM significativement plus élevés que ceux des témoins non infectés.

Les patients infectés de La Paz (habitants demeurant depuis cinq ans au moins à La Paz) présentent seulement un taux moyen d'IgG significativement plus élevé que celui du groupe témoin. Il n'y a pas de différence significative entre les taux des IgM des patients infectés et non infectés quel que soit leur sexe.

Figure n° 4 : Taux des immunoglobulines IgG, IgM, IgA chez des patients infectés de Chiwisivi (agriculteurs, 2500 m)

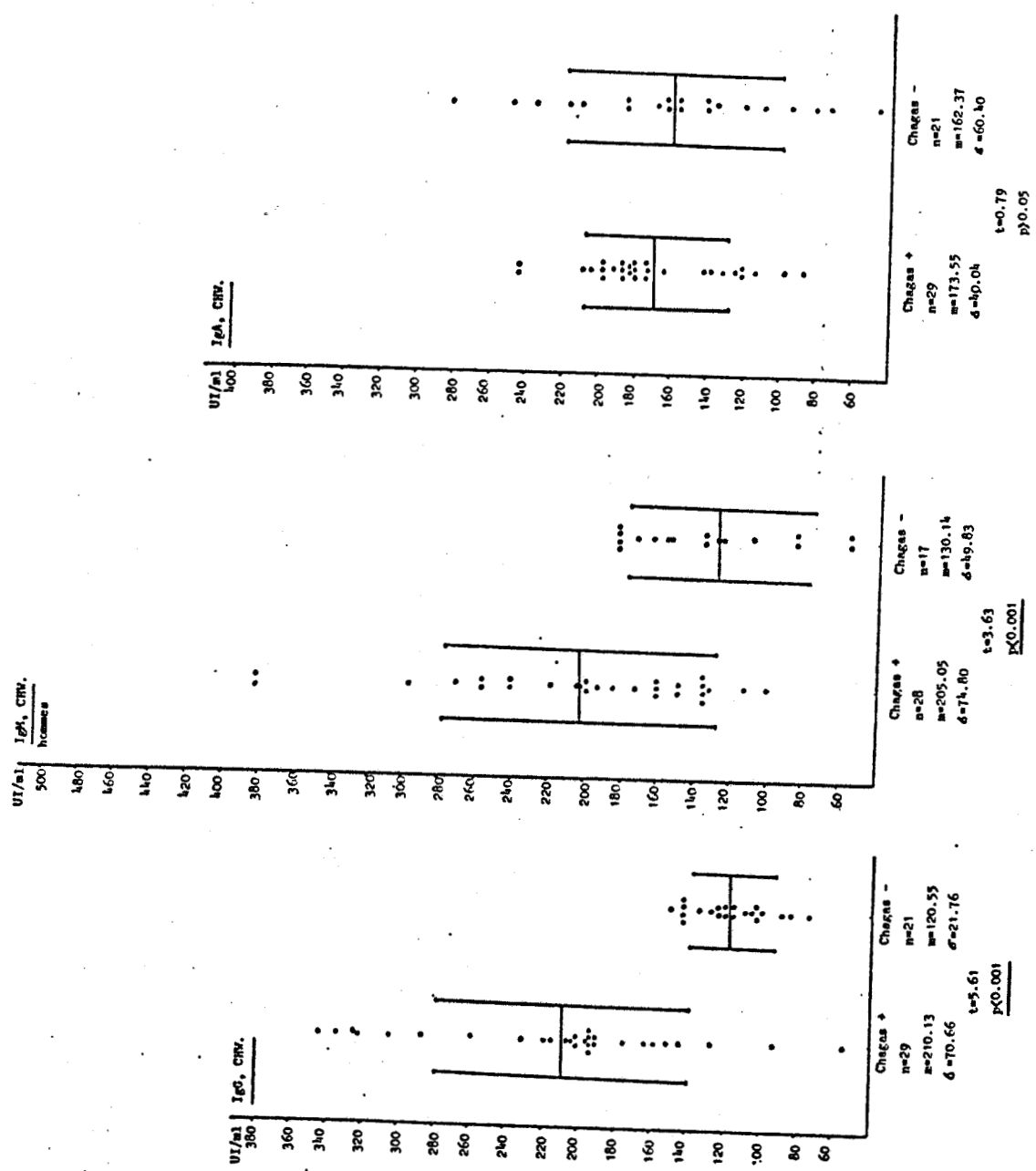


Figure n° 5 : Taux des immunoglobulines IgG, IgM, IgA chez des patients infectés, de Camiri (citadins, 800 m).

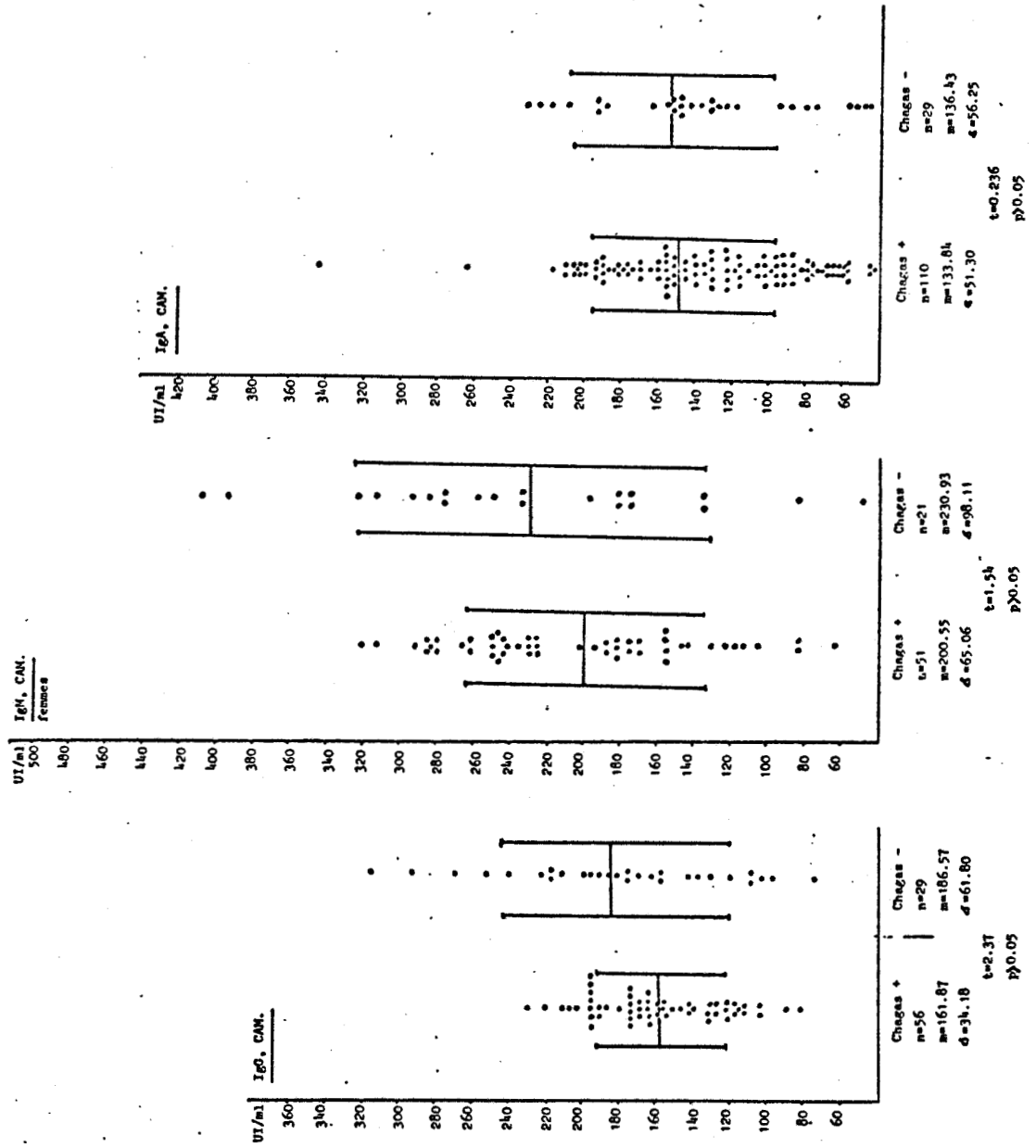
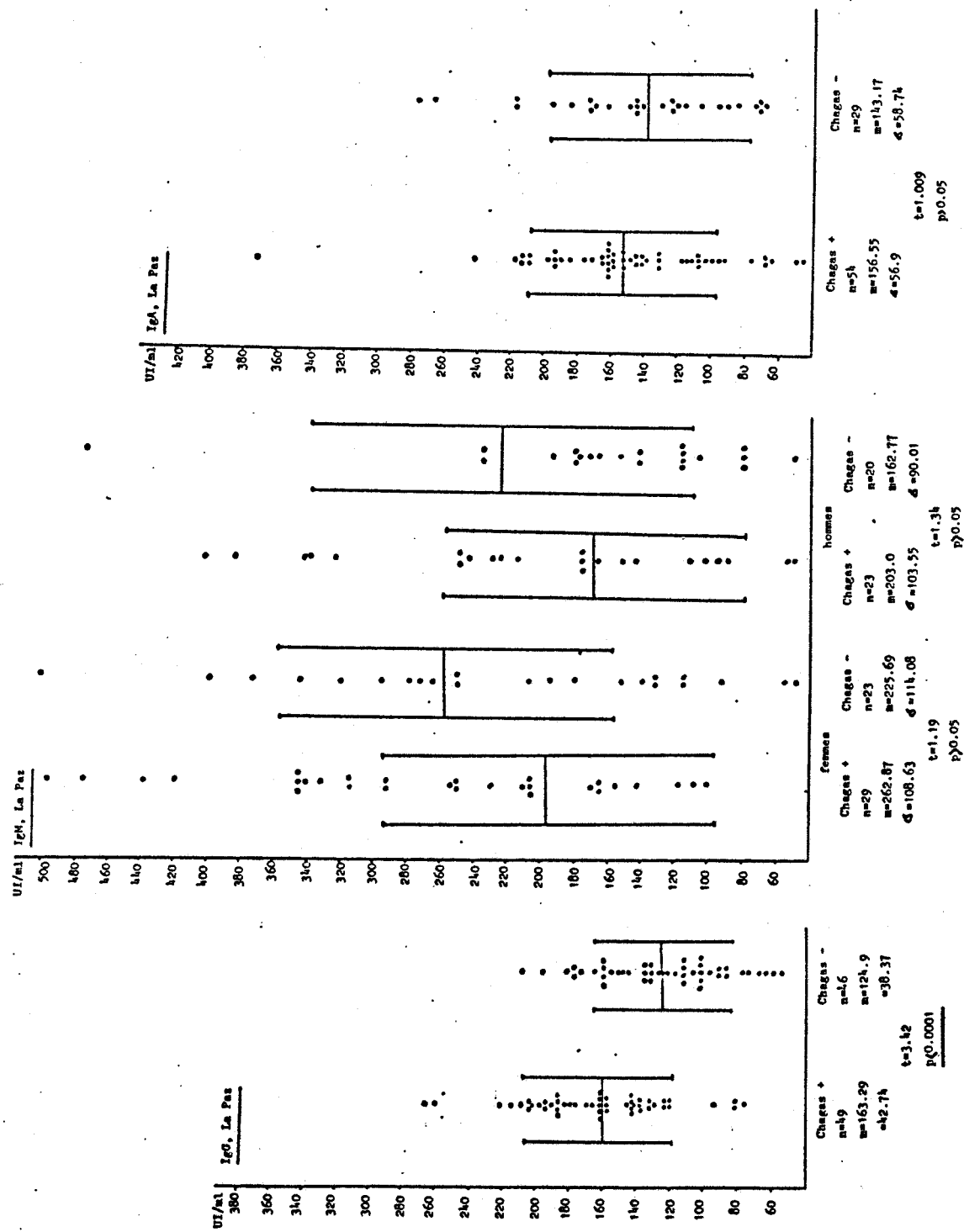


Figure n° 6 : Taux des immunoglobulines IgG, IgM, IgA chez des patients infectés demeurant depuis au moins 5 ans à La Paz (citadins -3500 m)



Aucune population infectée ne présente des taux d'IgA significativement plus élevés que les groupes témoins respectifs et dans la population de Camiri il n'y a pas de différence significative pour les taux des trois classes d'immunoglobulines.

2. Immunoglobulines de classe IgE

Dans la population de Camiri, la moyenne des taux des IgE totales, mesurées à partir de 920 UI/ml n'est pas significativement différente pour les deux groupes de patients infectés et non infectés. Toutefois, le pourcentage d'individus avec des taux d'IgE totales élevés est plus important que dans les deux autres populations.

Pour l'ensemble de la population de Chiwisivi seulement, un patient sur 48 (2 %) présente un taux d'IgE $>$ 920 UI/ml, pour celle de La Paz, 3 patients sur 80 (3,7 %) (tableau n°5).

Les IgE spécifiques ont également été dosées parmi un groupe de patients de Camiri (figure n°7). Quelques sérums de patients infectés présentent des taux élevés d' IgE spécifiques (13,7 % : B/T $>$ 3 %) et la différence des deux moyennes des patients infectés et des témoins est statistiquement significative selon le test du t de Student.

II. DOSAGE DES IMMUNS COMPLEXES DANS LE SERUM DE PATIENTS EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION

Ce dosage est effectué sur des sérums de la population de Camiri (figure n° 8). Les moyennes des taux d'immuns complexes des chagasiques sans cardiopathie ou avec cardiopathie sont significativement différentes de celle des témoins (patients non infectés). Par ailleurs, aucune différence significative n'est trouvée chez les chagasiques sans cardiopathie entre les hommes

Tableau n° 5 : Taux des IgE totales dans le sérum de patients en phase chronique de l'infection

Origine	Sérologie	Nombre de cas	Patients avec IgE > 920 UI/ml			Test statistique*2
			Nombre	Pourcentage	Taux moyen *1	
Camiri (800 m)	+	85	22	26 %	3747.98 ± 2781.86	p > 0.05
	-	35	8	23 %	2827.18 ± 3671.0	
Chiwisivi (2500 m)	+	26	0	0 %		-
	-	22	1	5 %	2466.63	
La Paz (3500 m)	+	50	2	4 %	3145.07	-
	-	30	1	3.3 %	979.51	

*1 Moyenne arithmétique ± écart-type à l'effectif

*2 Comparaison des moyennes selon le test du t de Student



Figure n°7 : Dosage des IgE spécifiques dans le sérum de
Chagasiques en phase chronique de l'infection

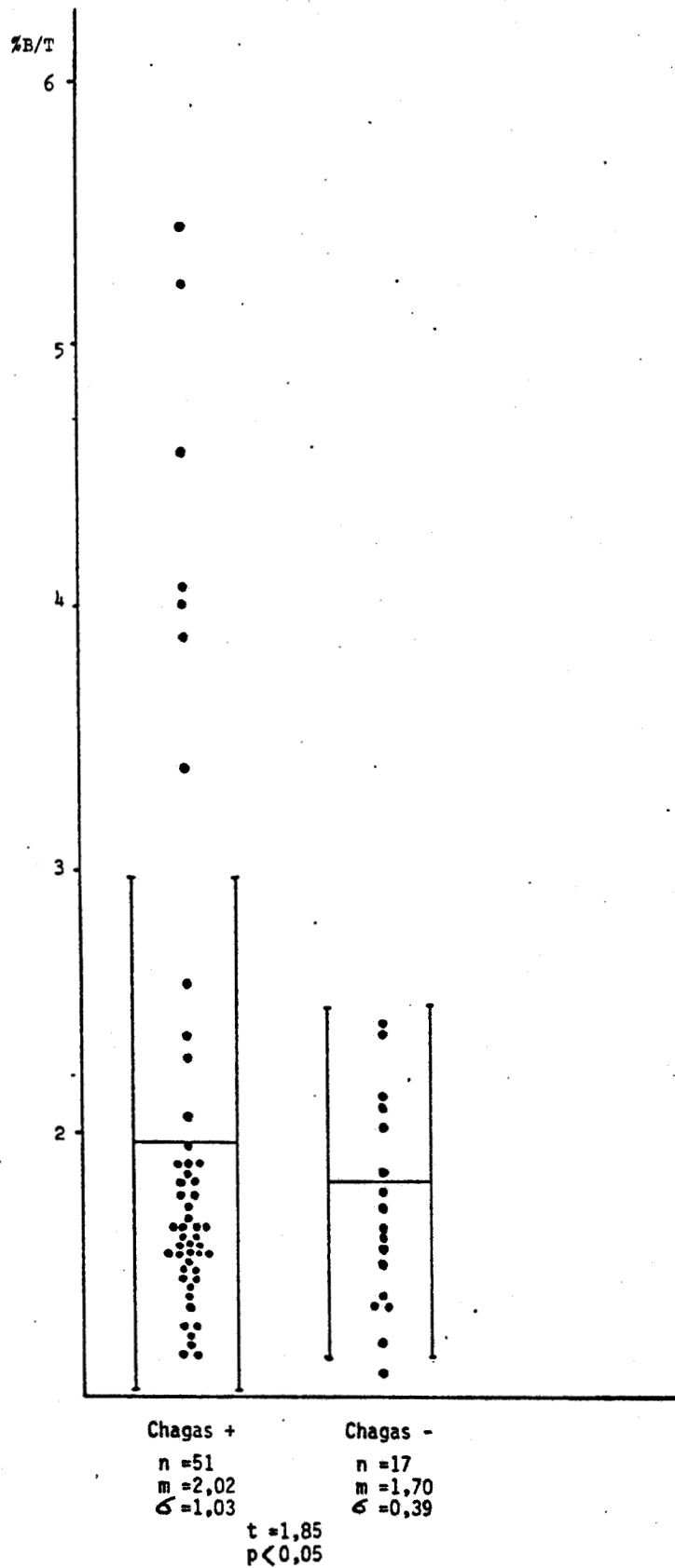
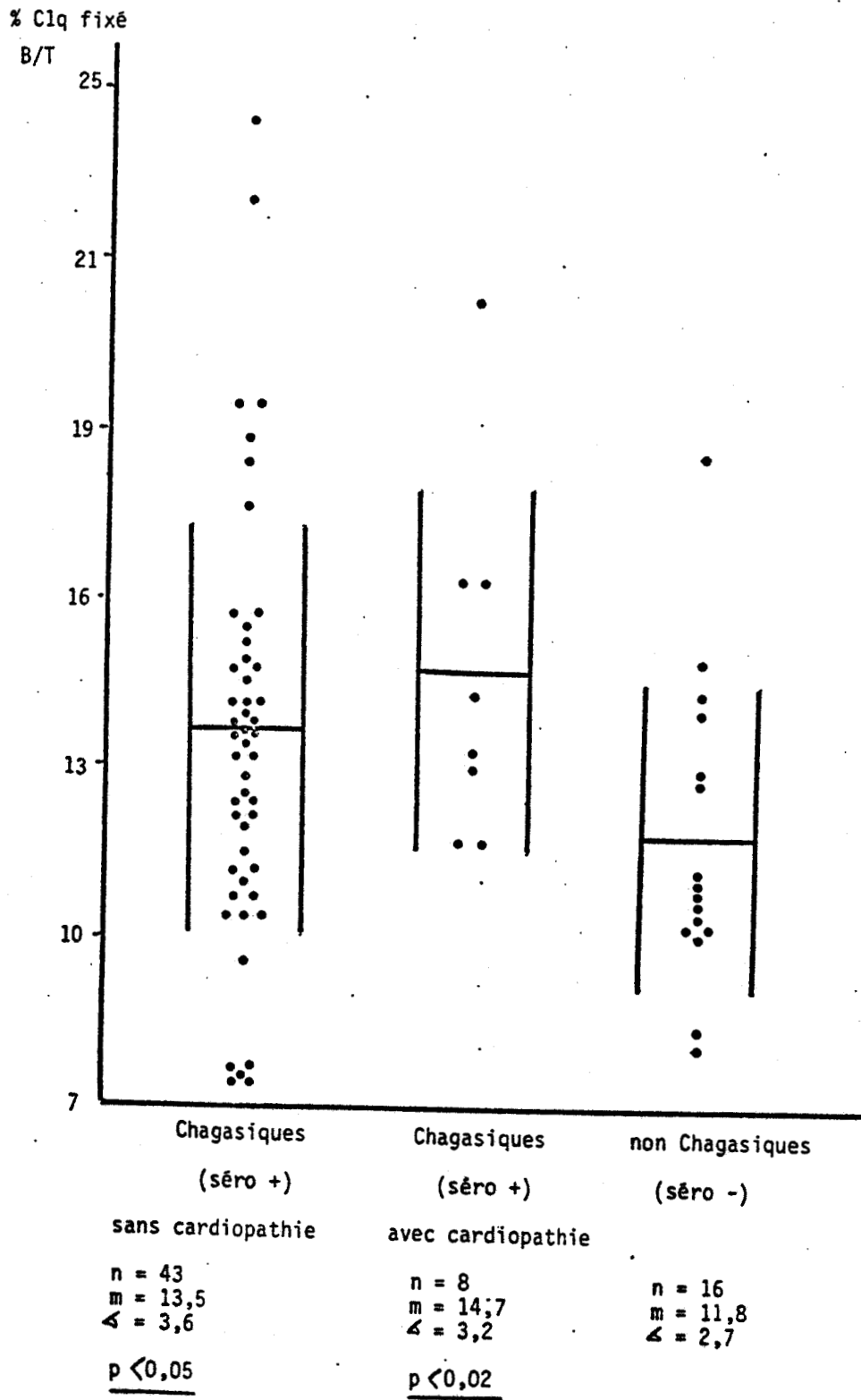


Figure n° 8 : Taux des immuns complexes dans le sérum de chagasiques en phase chronique de l'infection.



et les femmes (17 hommes : $m = 13,2 \pm 3,7$; 26 femmes $m = 13,7 \pm 3,6$).

III. DOSAGE DU C3 ACTIVATEUR, DU C3c ET DU C4 DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION

Aucune différence significative n'est observée entre les moyennes, les taux sériques du C3c, du C3 activateur, du C4 chez des patients de Camiri présentant une sérologie positive ou négative (Figure n° 9). La comparaison des moyennes est réalisée selon le test du t de Student comme précédemment.

IV. REPOSE HUMORALE ANTI T. CRUZI

1. Mise au point et corrélation des différentes techniques, intérêt diagnostique

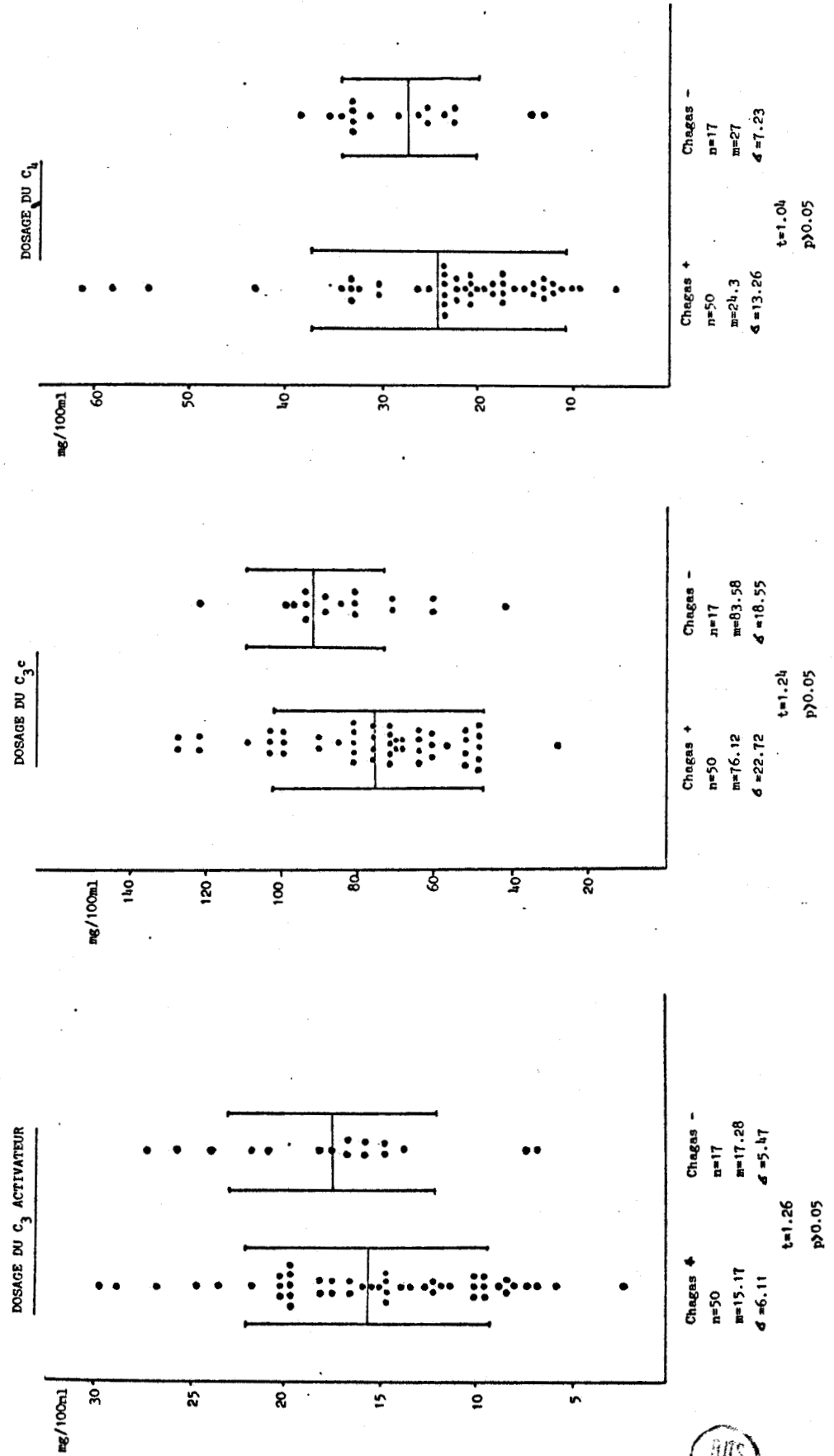
1.1. Détermination des titres ou valeurs significatives de la présence d'anticorps anti-T. cruzi pour les réactions d'IMF, d'ELISA, de RFC et d'IEP.

1.1.1. Technique d'IMF

Le tableau suivant montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les titres de sérums chagasiques, que les parasites soient fixés au formol ou à la glutaraldéhyde :

Sérums n°	titres obtenus	
	fixation au formol	fixation à la glutaraldéhyde
1	1/160	1/160
2	1/160	1/160
3	1/80	1/80
4	1/80	1/160
5	1/320	1/320
6	1/160	1/80
7	1/640	1/320
8	1/320	1/640
9	1/40	1/40
10	1/40	1/40

Figure n° 9 : Taux du C3 activateur, C3c et C4, dans le sérum de Chagasiques en phase chronique de l'infection.



• La dilution du sérum à partir de laquelle la positivité de la réaction peut être considérée comme significative de la présence d'anticorps anti-T. cruzi dans le sérum est déterminée à partir de sérums témoins et de sérum d'individus présentant une infection par T. cruzi parasitologiquement confirmée (tableau n°6) :

- patients boliviens qui n'ont jamais voyagé en dehors de l'altiplano. Dans cette région (4000 m), la maladie de Chagas n'est pas endémique.
- 6 sérums d'européens non infectés car n'ayant jamais voyagé en Amérique Latine (personnel français du laboratoire) analysés dès leur arrivée à La Paz
- 25 patients boliviens, présentant des lésions cutanées caractéristiques de leishmaniose cutanéomuqueuse à Leishmania braziliensis, sans signes cliniques de la maladie de Chagas mais où une infection chagastique est possible.
- 12 patients présentant une sérologie positive pour la toxoplasmose, sans signes cliniques de la maladie de Chagas mais où une infection chagastique est aussi possible
- 61 patients avec un xénodiagnostic positif, c'est-à-dire une infection par T. cruzi, confirmée parasitologiquement.

Parmi les sérums témoins, seul un sérum positif en sérologie toxoplasmose donne un titre $>1/40$. Pour ce groupe de patients une infection chagastique asymptomatique n'a pas été écartée. Les autres sérums témoins ne sont pas positifs au-delà de la dilution de 1/20ème.

Aucun sérum de patients avec confirmation parasitologique d'une infection par T. cruzi n'est positif à une dilution de 1/20ème, 11,4 % sont positifs à une dilution de 1/40ème et 16,3 % de 1/80ème. Nous avons donc choisi la dilution de 1/40ème comme premier titre significatif pour cette technique.

Tableau n° 6 : Détermination du titre significatif de la présence d'anticorps anti-T. cruzi pour la réaction d'IMF.

Sérums	Nombre	Nombre de sérums positifs aux dilutions indiquées				
		<1/10	1/10	1/20	1/40	1/80
Boliviens de l'altiplano	68	51	13	4	0	0
Européens	6	6	0	0	0	0
Boliviens, Leishmaniens, cliniquement confirmés	25	20	4	1	0	0
Boliviens présentant une sérologie toxoplasmosse positive	13	12	0	0	0	1
Boliviens avec infection par <u>T. cruzi</u> confirmée par un xénodiagnostic positif	61	0	0	0	7	10



1.1.2. Technique d'ELISA

. Mise au point de la réaction

Un coating avec traitement préalable des tubes à la glutaraldéhyde (Carlier et al., 1981 a, b) est comparé au coating sans traitement (figure n°10 A). La détermination de la concentration antigénique optimale à utiliser s'effectue par dilutions progressives de l'antigène (figure n°10 A) afin d'obtenir une saturation de la surface du tube et ceci pour les deux types de coating. Les coating sont équivalents et celui sans traitement a été retenu en utilisant une solution de 10 µg/ml d'antigène.

Le choix des dilutions du sérum et du conjugué sont déterminées par titration (figures n°10B et C) et les dilutions retenues sont celles de 1/100ème pour le sérum et une concentration de 500 ng/ml pour le conjugué.

. Détermination du seuil

La valeur de la densité optique à partir de laquelle la technique peut être considérée comme positive a été déterminée de la manière suivante : la moyenne arithmétique des densités optiques à 405 nm de 141 sérums dont le titre en IMF était < 1/40ème, a été faite et la valeur limite de significativité calculée selon la formule suivante : $L = m + 2\Delta$.

Nous avons obtenu : $m = 0.0733$ et $\Delta = 0.0459$

$L = 0.1652$, tous les sérums présentant une densité optique ≥ 0.17 seront considérés comme positifs pour cette technique.

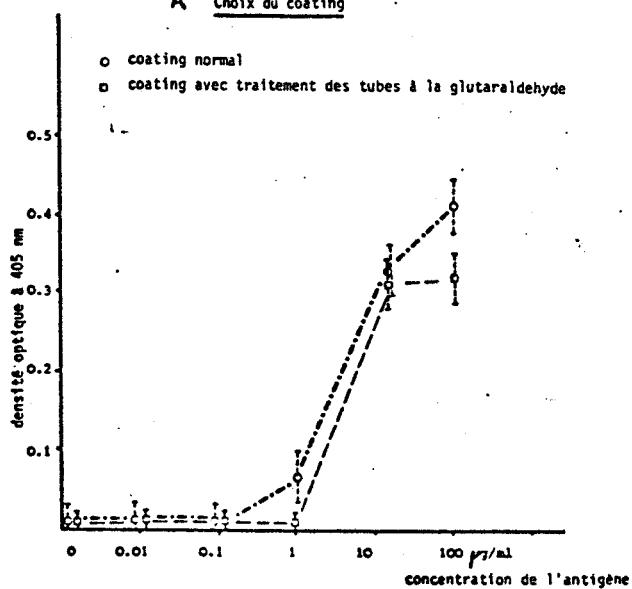
1.1.3. Technique de RFC

. Mise au point du système hémolytique

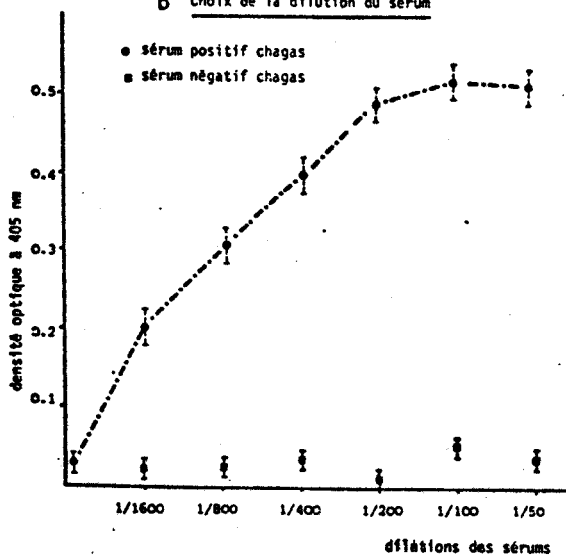
Les résultats suivants nous ont permis de choisir les dilutions de 1/50ème pour le complément et de 1/500ème pour l'hémolysine, de telle façon à être en excès de ces deux composants.

Figure n°10 A, B, C : Mise au point de la technique d'ELISA

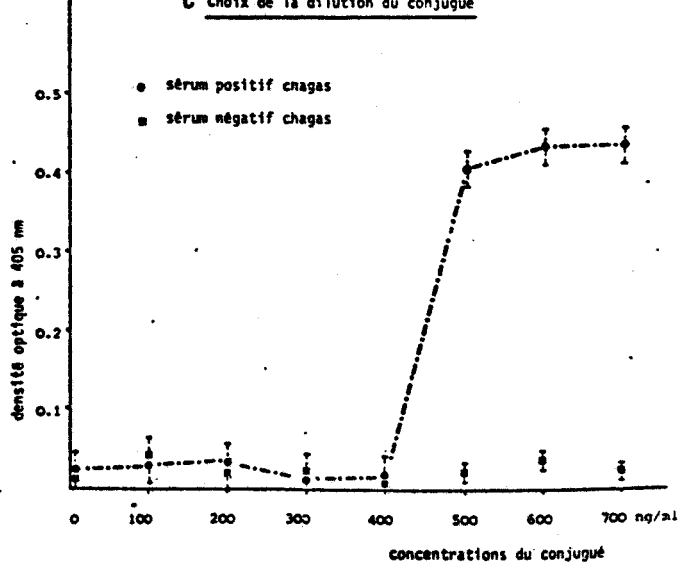
A Choix du coating



B Choix de la dilution du sérum



C Choix de la dilution du conjugué



Dilutions du complément	Dilutions de l'hémolysine				
	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000
1/25	H	H	H	-	-
1/50	H	H	H	-	-
1/100	H	H	-	-	-
1/200	-	-	-	-	-
1/400	-	-	-	-	-
Tampon	-	-	-	-	-

H = hémolyse

- = pas d'hémolyse

Les mêmes lots de complément et d'hémolysine ont été utilisés au cours de toutes les expériences.

. Détermination du seuil de spécificité

De même que pour la réaction d'ELISA, le titre significatif pour la réaction de fixation du complément, a été déterminé à l'aide de la réaction d'IMF. 59 sérums présentant un titre en IMF $< 1/40^{\text{ème}}$ ont été titrés en RFC : 95 % présentent un titre $< 1/2$, 1,69 % un titre de $1/2$ ($1/54$) et 3,4 % un titre de $1/8^{\text{ème}}$ ($2/54$). De plus, parmi 202 sérums avec un titre $\geq 1/40^{\text{ème}}$ en IMF, 27 présentent un titre en RFC de $1/2$ (13.36 %). Etant donné les résultats obtenus, le titre de $1/2$ a été considéré comme le premier titre significatif pour cette technique.

1.1.4. Technique d' IEP

Les critères de positivité pour cette technique ont été déterminés à partir de sérums pour lesquels les trois techniques quantitatives de dosage des anticorps anti-T. cruzi, IMF, RFC, ELISA étaient négatives toutes les trois à la fois. Parmi 48 sérums négatifs, un sérum donne 2 arcs de précipitation en traces et 47 n'en donnent aucun. Les sérums présentant donc 1 à 2 arcs de

précipitation en traces ont été considérés comme négatifs.

1.2. Corrélation des techniques de dosage des anticorps anti-T. cruzi

1.2.1. Corrélation quantitative des techniques entre elles

La figure n°11 montre qu'il y a bien une corrélation entre les taux des anticorps anti-T. cruzi dosés par les techniques d'IMF, RFC ou ELISA. Les droites de corrélation sont calculées par régression linéaire dont les coefficients de corrélation testés par rapport au test du t de Student sont les suivants:

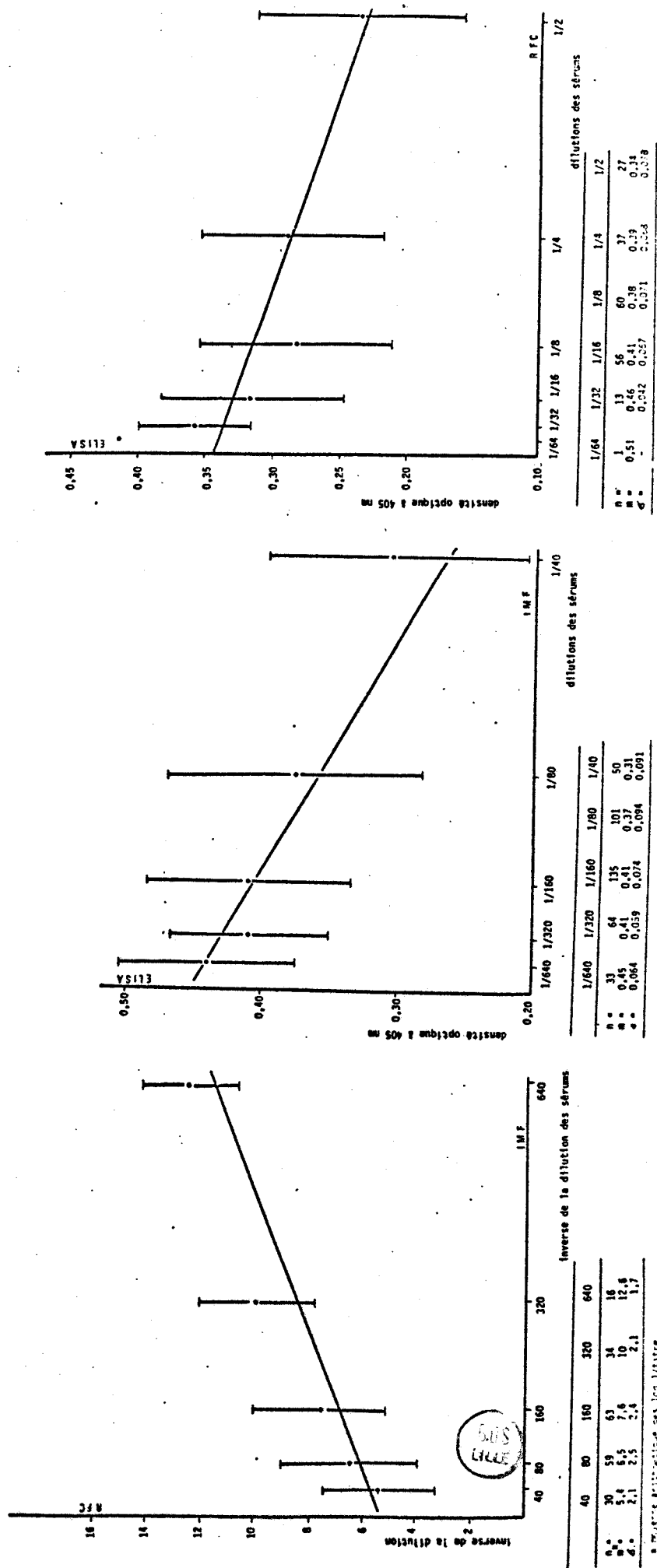
	r	t	p
RFC/ELISA	0,57	2,59	p < 0.01
IMF/ELISA	0,67	3,30	p < 0.005
IMF/RFC	0,81	5,016	p < 0.001

Les techniques qui donnent la meilleure corrélation sont celles d'IMF et RFC puis d'IMF et ELISA, et enfin d'RFC et ELISA.

1.2.2. Corrélation selon les seuils

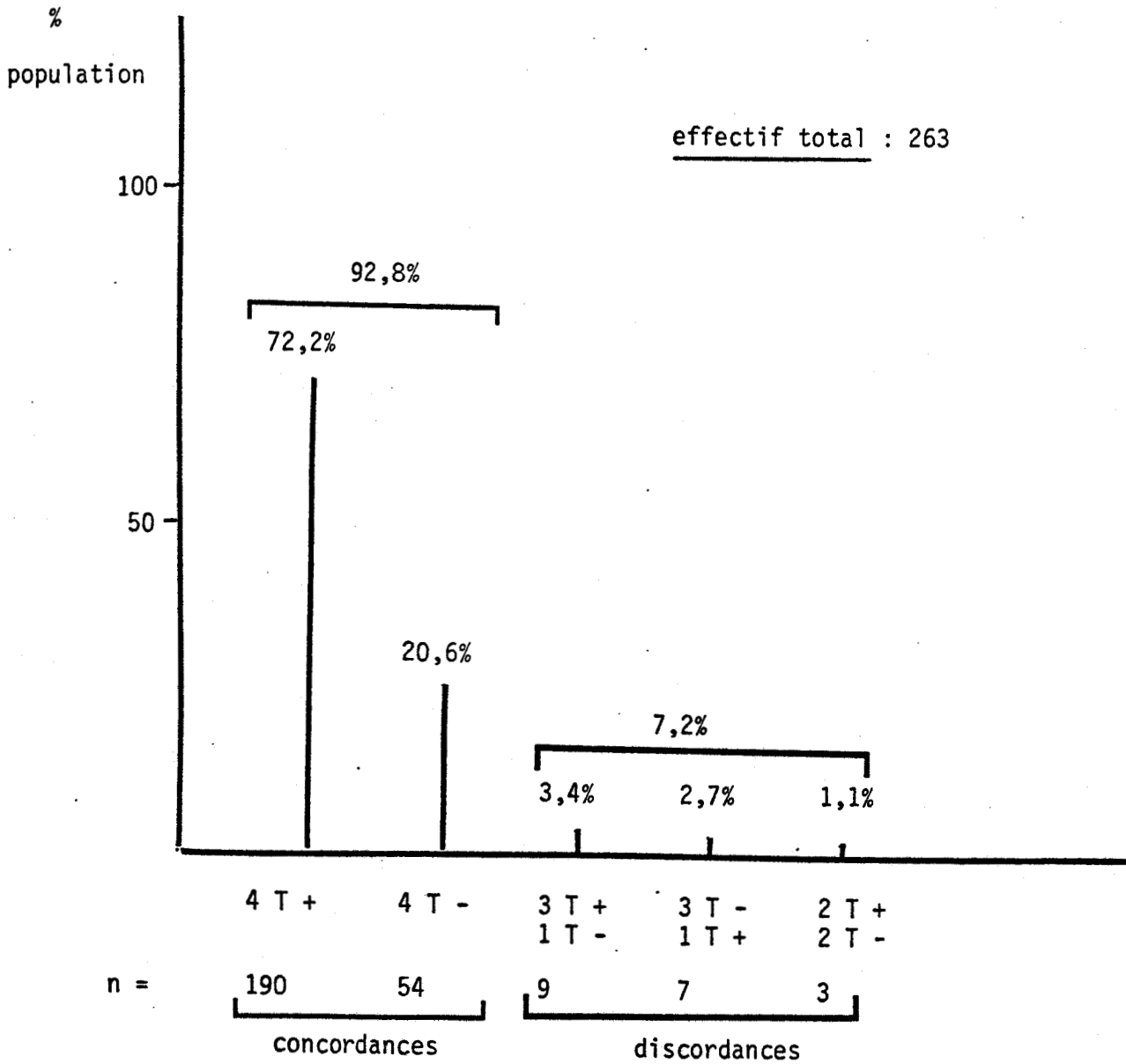
Parmi 263 sérums testés par les quatre techniques (figure n°12), 244 sont positifs ou négatifs pour les quatre techniques à la fois (92.77 %), 9 sont positifs pour trois techniques et négatifs pour une (2 sérums : 0 arc, 6 sérums : 1 à 2 arcs en traces, 1 sérum négatif en RFC) et 7 sérums sont négatifs pour trois techniques et positifs pour une (2 sérum : IMF 1/80, 1/40 ; 3 sérums ELISA : 0.173, 0.23, 0.18 ; 2 sérums RFC 1/2, 1/8 ; enfin trois sérums restent douteux puisque positifs pour deux techniques et négatifs pour les deux autres. A l'aide de quatre techniques, le diagnostic peut être assuré dans 98.85 % des cas en considérant trois techniques sur quatre positives comme un résultat positif et trois techniques sur quatre négatives comme un résultat négatif.

Figure n°11: Corrélation quantitative des techniques de dosage d'IMF, de RFC et d'ELISA



à moyenne géométrique des log 1/titre

Figure n° 12 : Concordances entre les techniques d'IMF, d'ELISA, de RFC et d'IEP selon leur seuil



1.2.3. Etude de la sensibilité des techniques

Par définition, la sensibilité d'une technique est donnée par le pourcentage d'individus parasitologiquement confirmés, présentant une sérologie positive pour une technique déterminée de dosage des anticorps étudiés. Dans notre cas, les patients présentant un xénodiagnostic positif sont les seuls à être parasitologiquement confirmés, 100 % de cette population (50 cas) sont positifs pour les réactions d'IMF, d'ELISA, de RFC, par contre la sensibilité de la réaction d'IEP est de 98 % car l'un des sérums présente un arc en trace et est donc considéré négatif pour cette technique.

Une étude de la valeur de ces techniques a été réalisée sur la population dont le diagnostic a été établi immunologiquement par quatre techniques (3 techniques sur 4 positives ou négatives) et nous avons tenu compte des trois sérums pour lesquels le diagnostic reste douteux.

Tout d'abord, nous avons calculé le pourcentage de cas qui donne un résultat conforme au diagnostic ainsi porté pour chaque technique :

IMF : 258/263, 98 %

ELISA : 257/263, 97 %

RFC : 257/263, 97 %

IEP : 252/263, 96 %

Ensuite, nous avons calculé le pourcentage de cas pour lequel l'association de deux techniques parmi les quatre donne un résultat conforme au diagnostic porté précédemment à l'aide des quatre techniques et pour lequel les deux techniques sont en accord, c'est-à-dire positives ou négatives.

IMF/ELISA : 255/263, 97 %

IMF/RFC : 255/263, 97 %

IMF/IEP : 250/263, 95.1 %

IEP/ELISA : 249/263, 94.7 %

IEP/RFC : 249/263, 94.7 %

ELISA/RFC : 254/263, 96.6 %

Enfin, nous avons étudié le pourcentage de cas pour lequel l'association de trois techniques parmi les quatre donne un résultat conforme au diagnostic porté à l'aide des quatre techniques et pour lequel les trois techniques sont à la fois positives ou négatives.

ELISA/IMF/RFC : 252/263, 95,8 %

ELISA/IMF/IEP : 247/263, 93,9 %

ELISA/RFC/IEP : 246/263, 93.5 %

RFC/IEP/IMF : 247/263, 93.9 %

2. Etude quantitative de la réponse immune humorale chez des chagasiques en phase chronique de l'infection

Deux types d'études statistiques sont menées :

- comparaison des moyennes des logarithmes de l'inverse des titres d'anticorps dosés par les différentes techniques ou pour l'ELISA moyenne arithmétique des densités optiques ; l'analyse de la probabilité de la différence de ces deux populations est faite statistiquement selon le test du t de Student.
- Etude de la répartition des taux des anticorps anti-T. cruzi : pour chaque technique et dans chaque groupe, les effectifs sont calculés pour les limites suivantes choisies arbitrairement :

$$\text{IMF} \llcorner 1/80 ; \gg 1/160$$

$$\text{ELISA} \llcorner 0,40 ; \gg 0.40$$

$$\text{RFC} \llcorner 1/8 ; \gg 1/16$$

Le test de χ^2 est utilisé pour tester la probabilité de trouver un nombre significativement différent d'individus avec des taux supérieurs aux limites établies ci-dessus.

2.1. Taux des anticorps anti-T. cruzi dans le sérum de Chagasiques de trois régions boliviennes différentes.

2.1.1. Nombre de patients présentant une sérologie positive dans ces populations

La population de Chiwisivi présente la sérologie la plus basse, vient ensuite celle de Camiri et enfin celle de Salinas (Tableau n° 7). Seules les différences entre les populations de Chiwisivi et Salinas, de Chiwisivi et Camiri sont significatives.

2.1.2. Taux des anticorps

La figure n°13 montre la répartition des taux d'anticorps parmi les trois populations boliviennes étudiées. Une différence significative est observée seulement pour la RFC entre les populations de Chiwisivi comparée à celles de Camiri et Salinas. Chiwisivi présente pour cette technique un taux moyen d'anticorps plus faible qu'à Camiri et Salinas (tableau n°8). Le second type d'analyse statistique est mené afin de vérifier si la répartition des taux des anticorps est différente entre les populations : le test du χ^2 nous permet de conclure que la population de Salinas présente un nombre de patients avec des taux élevés en anticorps significativement plus grand que celui de la population de Chiwisivi pour les trois techniques sérologiques et celui de Camiri pour la technique d'ELISA seulement (tableau n° 8).

2.2. Taux des anticorps anti-T. cruzi et xénodiagnostic.

Le xénodiagnostic a pu être réalisé de manière systématique sur des patients venus consulter à La Paz.

Parmi 99 personnes, 61 présentent un xénodiagnostic positif, c'est-à-dire 61.6 %. La figure n°14 présente la répartition des taux d'anticorps anti-T. cruzi dosés par trois techniques (IMF, ELISA, RFC), dans des populations présentant un xénodiagnostic positif ou négatif.

Tableau n° 7 : Nombre de patients présentant une sérologie positive parmi trois populations boliviennes

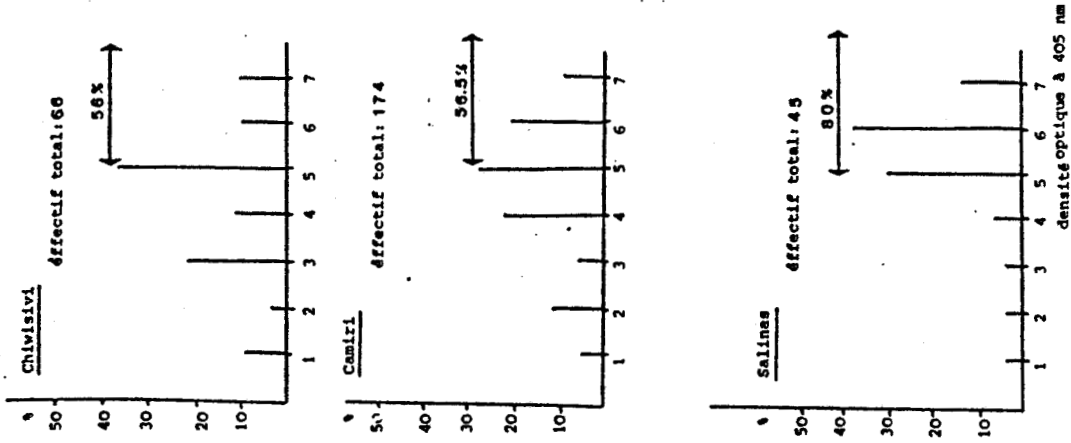
Lieu	Population totale	Sérologie positive *		Test de χ^2
		Nombre	Pourcentage	
Chiwisivi	130	72	55.38] p < 0.0001] p > 0.05
Camiri	211	170	80.56	
Salinas	48	45	93.75	

* Sérologie positive : 3 T au moins + parmi IMF, ELISA, RFC, IEP.



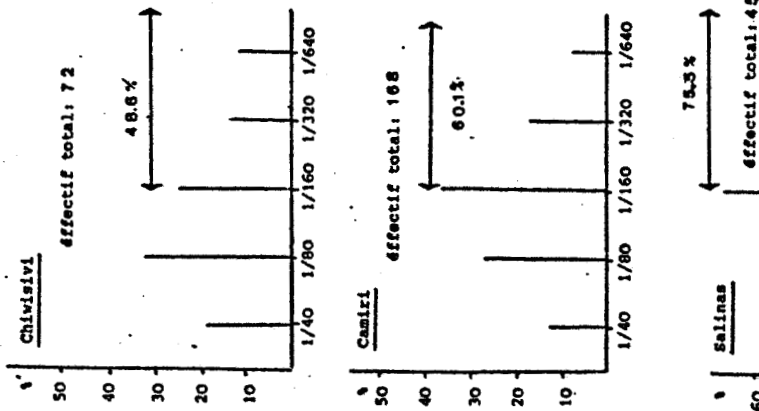
Figure n° 13 : Taux des anticorps anti-T. cruzi dans le sérum de trois populations boliviennes.

ELISA



- 1= de 0.17 à 0.25
- 2= de 0.251 à 0.30
- 3= de 0.301 à 0.35
- 4= de 0.351 à 0.40
- 5= de 0.401 à 0.45
- 6= de 0.451 à 0.50
- 7= de 0.501 à 0.55

JMF



RFC

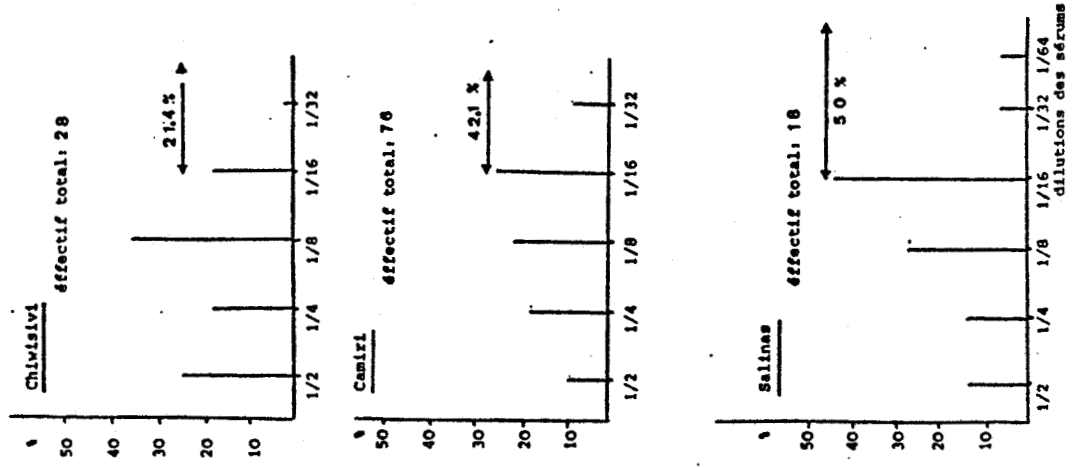


Tableau n°8: Analyse statistique des taux des anticorps anti I.cruzi dans trois populations boliviennes

	IMF			RFC			ELISA		
	Effectifs	Moyenne \bar{X}_1	$p_1 \chi^2 \geq 1/160$	Effectifs	Moyenne \bar{X}_1	$p_1 \chi^2 \geq 1/16$	Effectifs	Moyenne \bar{X}_1	$p_1 \chi^2 \geq 0,40$
CHIWISIVI/CAMERI	72/158	2,09 ± 0,37 2,16 ± 0,36	>0,05	28/76	0,77 ± 0,35 0,93 ± 0,35	<0,05	56/174	0,40 ± 0,08 0,41 ± 0,07	>0,05
		48,6% 60,1%	>0,05			21,4% 42,1%			56,0% 56,5%
CAMERI/SALINAS	168/45	2,16 ± 0,36 2,15 ± 0,22	>0,05	76/18	0,93 ± 0,35 1,00 ± 0,38	>0,05	174/45	0,41 ± 0,07 0,44 ± 0,07	>0,05
		60,1% 75,5%	>0,05			42,1% 50,0%			56,5% 80,0%
SALINAS/CHIWISIVI	45/72	2,15 ± 0,22 2,09 ± 0,37	>0,05	18/28	1,00 ± 0,38 0,77 ± 0,35	<0,05	45/66	0,44 ± 0,07 0,40 ± 0,08	>0,05
		75,5% 48,6%	<0,01			50,0% 21,4%			80,0% 56,0%

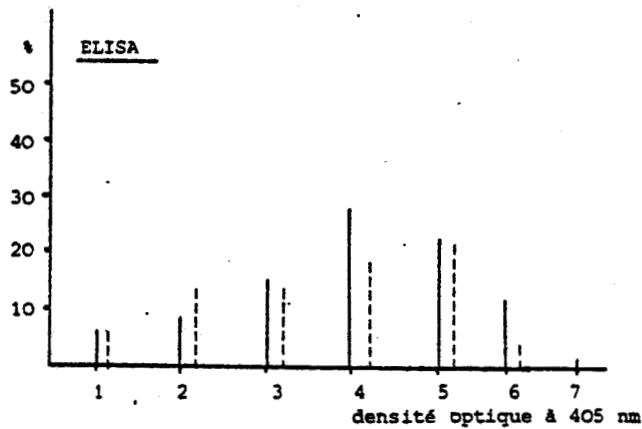
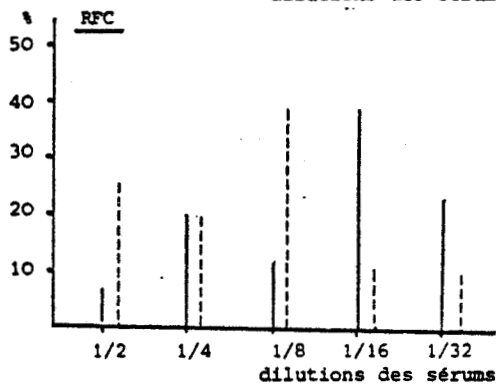
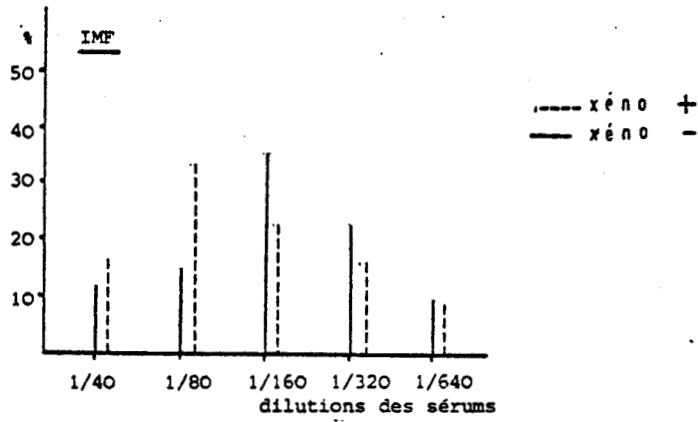
\bar{X}_1 Moyenne arithmétique de log 1/titre

χ^2 p1: Comparaison des deux moyennes selon le test du t de Student.

χ^2 p2: Comparaison des effectifs par le test de χ^2 .



Figure n°14 : Taux des anticorps anti-T. cruzi chez des chagasiques chroniques présentant un xénodiagnostic positif ou négatif.



- 1 = de 0.17 à 0.25
- 2 = de 0.251 à 0.30
- 3 = de 0.301 à 0.35
- 4 = de 0.351 à 0.40
- 5 = de 0.401 à 0.45
- 6 = de 0.451 à 0.50
- 7 = de 0.501 à 0.55



Comme précédemment deux types d'analyse statistique sont menées. Seuls les taux moyens des anticorps anti-T. cruzi dosés par la technique d'ELISA sont significativement différents entre les populations présentant un xénodiagnostic positif et un xénodiagnostic négatif.

S'il n'y a pas de différence significative entre les moyennes des titres obtenus en IMF et RFC, le nombre d'individus présentant des taux $\geq 1/160$ en IMF et $\geq 1/16$ en RFC est significativement plus grand pour le groupe présentant un xénodiagnostic positif, comparé au groupe présentant un xénodiagnostic négatif (tableau n°9).

2.3. Taux des anticorps anti-T. cruzi et altitude

Parmi la population venue consulter à l'Institut, nous avons sélectionné les personnes infectées demeurant depuis au moins 5 ans à La Paz (3500 m) et comparé le taux des anticorps de cette population à celui des populations de Chiwisivi (2500 m), Camiri et Salinas (800 m).

L'étude statistique des résultats est menée comme précédemment selon deux types d'analyse statistique (tableau n°10).

La moyenne des taux d'anticorps, dosés en ELISA, de la population de La Paz est significativement plus basse que celles des populations de Chiwisivi, Salinas et Camiri, alors qu'il n'y a pas de différence entre ces populations. D'autre part, le nombre d'individus de La Paz avec des taux d'anticorps $\geq 0,40$ n'est pas significativement différent de celui des populations de Chiwisivi et Camiri. Seule, la population de Salinas présente un nombre de sujets, avec des taux $\geq 0,40$, significativement plus grand que celui de La Paz et également plus grand que ceux de Chiwisivi et Camiri.

Tableau n°9 : Analyse statistique des taux des anticorps anti-T. cruzi en fonction du xénodagnostic

	IMF			RFC			ELISA								
	Effectif	moyenne*1	p ₁ *	% ≥ 1/160	p ₂ *3	Effectif	moyenne*1	p ₁ *2	% ≥ 1/16	p ₂ *3	Effectif	moyenne*1	p ₁ *2	% ≥ 0,40	p ₂ *3
Xéno +	61	2,23 ± 0,36	>0,05	72,1 %	<0,05	42	0,92 ± 0,3	>0,05	41,9 %	<0,05	62	0,38 ± 0,07	<0,05	39,4 %	>0,05
Xéno -	37	2,11 ± 0,38		47,4 %		26	0,79 ± 0,37		18 %		35	0,34 ± 0,09		23,8 %	

*1 moyenne arithmétique des Log titre

*2 p₁ : comparaison des deux moyennes selon le test du t de Student

*3 p₂ : Comparaison des effectifs par le test de X²



Tableau n°10 : Analyse statistique des taux des anticorps anti-T. cruzi d'une population vivant à 3500 m
et de populations vivant à 2500 m et à 800 m

	IMF					RFC					ELISA				
	P.T.*1	moyenne*2	p1*3	% ≥1/160	p2*4	P.T.	moyenne*2	p1*3	% ≥1/16	p2*4	P.T.*1	moyenne*2	p1*3	% ≥0,40	p2*4
La Paz 3500 m	76	2,19 ± 0,32		67,1 %		61	0,87 ± 0,31		32,8 %		74	0,36 ± 0,071		70,3 %	
Chiwisivi 2500 m	72	2,09 ± 0,37	<0,05	48,6 %	<0,05	68	0,77 ± 0,35	>0,05	21,4 %	>0,05	66	0,40 ± 0,075	<0,001	71,2 %	>0,05
La Paz 3500 m	76	2,19 ± 0,32		67,1 %		61	0,87 ± 0,31		32,8 %		74	0,36 ± 0,077		70,3 %	
Camiri 800m	168	2,16 ± 0,35	>0,05	60,1 %	>0,05	76	0,93 ± 0,35	>0,05	42,1 %	>0,05	174	0,41 ± 0,006	<0,001	77,58 %	>0,05
La Paz 3500 m	76	2,19 ± 0,32		67,1 %		61	0,87 ± 0,31		32,8 %		74	0,36 ± 0,077		70,3 %	
Salinas 800 m	45	2,15 ± 0,22	>0,05	75,5 %	>0,05	18	1,0 ± 0,38	>0,05	50 %	>0,05	45	0,44 ± 0,074	<0,05	86,7 %	<0,05

*1 P.T. : population totale

*2 Moyenne arithmétique de $\log \frac{1}{\text{titre}}$

*3 Comparaison des moyennes selon le test du t de student

*4 Comparaison des effectifs par le test de χ^2



En RFC, la population de La Paz ne diffère pas de celles de Chiwisivi, Camiri, Salinas.

Enfin pour la réaction d'IMF, la moyenne des taux pour la population de La Paz est significativement plus élevée que celle de Chiwisivi et le nombre de sujets avec des taux $\geq 1/160$ est aussi plus grand à La Paz qu'à Chiwisivi.

2.4. Taux des anticorps anti-T. cruzi et pathologie

Une différence significative est observée entre le nombre de cardiopathiques à Camiri et à Chiwisivi, bien que les populations ne présentent pas de différence significative de l'âge moyen ; la population de Salinas, dont l'âge moyen est le moins élevé, ne présente pas un pourcentage d'individus avec cardiopathie différent de celui des autres populations (tableau n°11).

La première partie de l'étude du taux des anticorps en fonction de la pathologie a concerné les populations de Chiwisivi et de Camiri. Les deux groupes pathologiques ont été formés à partir de l'observation de l'électrocardiogramme, mais les sujets peuvent présenter une pathologie du tube digestif associée ou non à une cardiopathie. D'autre part, l'étude du taux des anticorps n'a pu être réalisée que pour les techniques d'IMF et d'ELISA car le nombre de sérums testés en RFC était trop réduit.

La figure n°15, présente la répartition des taux des anticorps en IMF et en ELISA des cardiopathiques et non cardiopathiques.

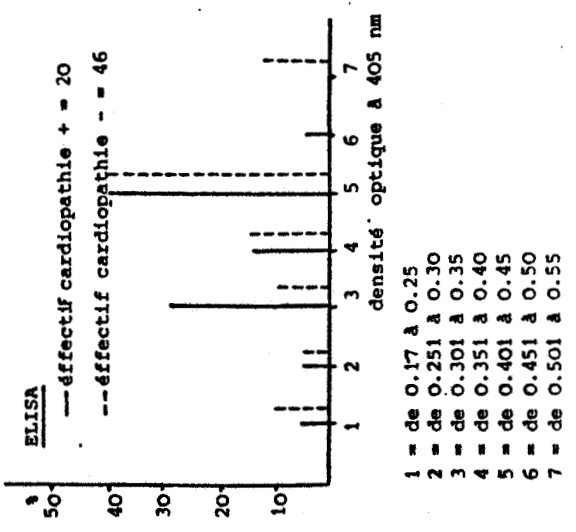
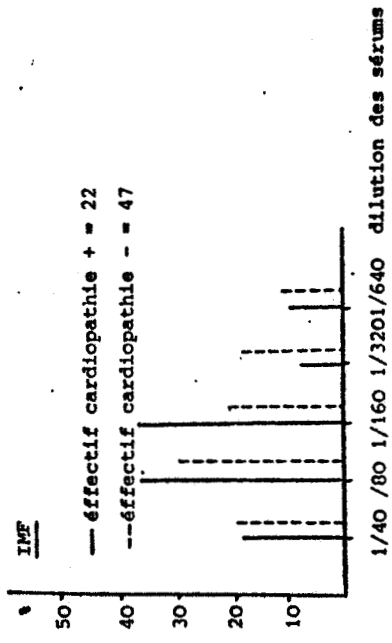
Tableau n° 11 : Nombre de chagasiques chroniques avec cardiopathie parmi
les populations de Chiwisivi, Camiri, Salinas

	Nombre individus infectés	Cardiopathies		Test de χ^2 p
		Nombre	pourcentage	
CHIWISIVI	69	22	31,88	$\left[\begin{array}{l} \leftarrow < 0,05 \\ \rightarrow 0,05 \\ \rightarrow > 0,05 \end{array} \right]$
CAMIRI	167	31	18,56	
SALINAS	43	12	27,9	

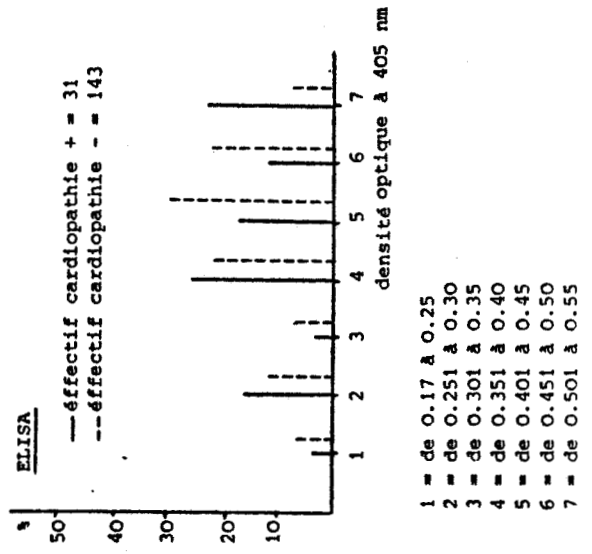
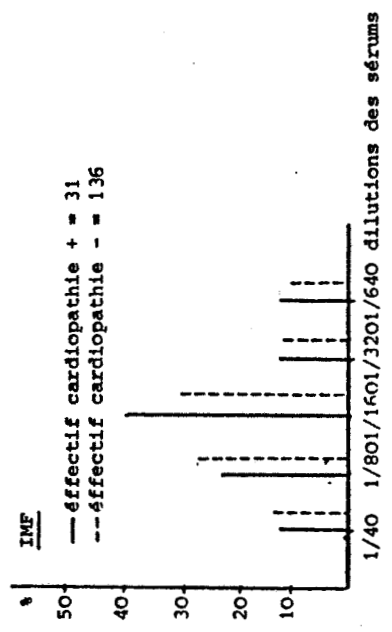


Figure n°15: Taux des anticorps anti I.cruzi chez des chagasiques avec ou sans cardiopathie

CHIVISIVI



CAMIRI



L'analyse statistique présentée dans le tableau n°12, ne montre aucune différence significative entre les moyennes des taux des groupes de chagasiques avec ou sans cardiopathie, de même, le nombre des chagasiques avec cardiopathie présentant des taux $\geq 1/160$ ème en IMF et $\geq 0,40$ en ELISA n'est pas significativement différent de celui des chagasiques sans cardiopathie.

Une étude plus détaillée a pu être menée chez des patients venus consulter à La Paz. Sur 70 personnes ayant subi les examens cardiologiques et gastroentérologiques, 29 présentent un méga-colon dont, un cas associé à un méga-oesophage et deux cas avec rétention oesophagienne sans dilatation, 8 présentent une cardiopathie sans autre pathologie associée, 9 présentent une pathologie cardiaque associée à une pathologie du tube digestif et 24 sont asymptomatiques.

Le tableau n°13 montre une différence significative des taux moyens des anticorps entre les chagasiques avec une pathologie mixte et les asymptomatiques ainsi qu'entre l'ensemble des chagasiques présentant une quelconque pathologie et les chagasiques asymptomatiques pour la technique d'ELISA seulement.

Nous présentons sur la figure n°16 les pourcentages respectifs de ces populations présentant des taux d'anticorps anti-T. cruzi $\geq 1/160$ en IMF et $\geq 0,40$ en ELISA. La comparaison de ces pourcentages a été réalisée par rapport à la population asymptomatique mais les groupes étant réduits, l'étude statistique n'a été possible qu'entre, les asymptomatiques et le groupe méga-colon non associé d'une part et les asymptomatiques et l'ensemble des individus présentant une pathologie d'autre part. Aucune différence significative n'a été observée.

Tableau n°12 : Analyse statistique du taux des anticorps anti-T. cruzi en fonction de la cardiopathie

	IMF					ELISA					
	P.T.*1	moyenne *2	p1*3	% $\geq 1/160$	p2*4	P.T.*1	moyenne *2	p1*3	% $\geq 0,40$	p2*4	
Chiwisivi	cardio +	22	2,04 \pm 0,33		45,5 %		20	0,38 \pm 0,069		45 %	
	cardio -	47	2,12 \pm 0,39	>0,05		>0,05	43	0,40 \pm 0,099	>0,05	60,9 %	>0,05
Camiri	Cardio +	31	2,17 \pm 0,36		64,5 %		31	0,41 \pm 0,093		51,6 %	
	Cardio -	136	2,15 \pm 0,35	>0,05		>0,05	143	0,40 \pm 0,069	>0,05	57,3 %	>0,05

*1 : P.T. = population totale

*2 Moyenne arithmétique de $\log \frac{1}{\text{titre}}$

*3 Comparaison des moyennes selon le test du t de Student

* 4 Comparaison des effectifs par le test de χ^2



Tableau n°13 : Comparaison des moyennes générales des taux des anticorps anti T.cruzi en fonction de la pathologie

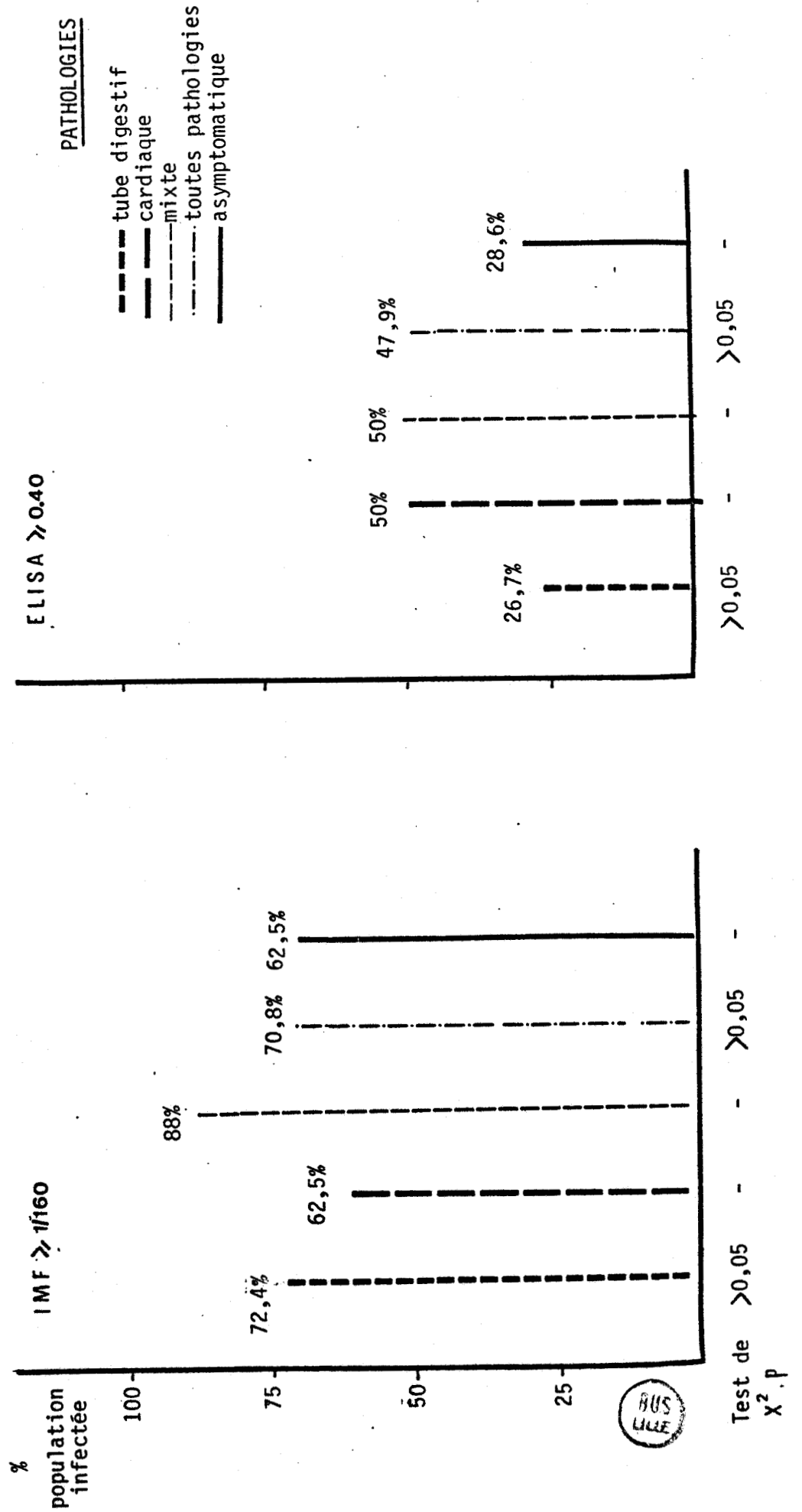
	effectifs	IMF		ELISA	
		moyenne*1	p1*2	moyenne *1	p1 *2
Cardio/asympt.	8	2,13 ± 0,42	>0,05	0,37 ± 0,11	>0,05
	24	2,18 ± 0,33		0,34 ± 0,07	
Gastro/asympt.	29	2,30 ± 0,35	>0,05	0,36 ± 0,07	>0,05
	24	2,18 ± 0,33		0,34 ± 0,07	
Mixte/asympt.	9	2,34 ± 0,37	>0,05	0,40 ± 0,02	<0,001
	24	2,18 ± 0,33		0,34 ± 0,07	
Toutes patho/asympt.	46	2,28 ± 0,36	>0,05	0,37 ± 0,08	<0,05
	24	2,18 ± 0,33		0,34 ± 0,07	

*1 Moyenne arithmétique de $\log \frac{1}{\text{titre}}$

*2 Comparaison des moyennes avec le groupe asymptomatique selon le test du t de Student



Figure n°16: Taux des anticorps anti I.cruzi chez des chagasiques présentant différentes pathologies



3. Etude qualitative de la réponse immune humorale anti-T. cruzi de chagasiques en phase chronique de l'infection

3.1. Incidence des anticorps anti-antigène 5, spécifique de T. cruzi

Les anticorps anti-antigène 5 sont présents dans plus de 50 % des sérums de chagasiques. Seule une différence significative du nombre d'individus présentant dans leur sérum des anticorps anti-antigène 5 est observée entre les populations de Chiwisivi et de Salinas (tableau n°14).

3.1.1. Incidence et taux des anticorps anti-T. cruzi

L'analyse statistique des résultats montre, que seulement pour la population de Camiri, les patients avec des anticorps anti-antigène 5 dans leur sérum, présentent une moyenne des taux des anticorps totaux et un nombre de patients avec des taux $\geq 1/160$, $\geq 1/16$, $\geq 0,40$, significativement plus élevés que ceux des patients sans anticorps anti-antigène 5 dans leur sérum (tableau n°15).

3.1.2. Anticorps anti-antigène 5 et xénodiagnostic

Le tableau n°16 montre quelle est l'incidence des anticorps anti-antigène 5 chez des patients avec un xénodiagnostic positif ou négatif. Nous ne notons aucune différence significative entre les deux groupes.

3.1.3. Anticorps anti-antigène 5 et pathologie

Le tableau n°17 résume les résultats obtenus pour les populations de Chiwisivi et de Camiri avec les restrictions que cette étude implique

Tableau n°14 : Incidence des anticorps anti-antigène 5 de *T. cruzi* parmi trois populations boliviennes différentes

	Nbre total de chagasiques (sérologie * positive)	% de chagasiques avec Ac anti-Ag 5 (D.D.)	Test de χ^2 p
Chiwivisi	61	63.93 %] < 0.05]
Camiri	91	78.02 %	
Salinas	45	86.66 %	

* Sérologie positive: 3 techniques au moins positives parmi l'IMF, RFC, ELISA, IEP



Tableau n°15:: Analyse statistique de l'incidence des anticorps anti-antigène 5
en fonction du taux des anticorps totaux anti-I.Cruzi

	IMF				RFC				ELISA						
	P.T.*1	moyenne*2	p1*3	% ≥ 1/160	p2*4	P.T.*1	moyenne*2	p1*3	% ≥ 1/16	p2*4	P.T.*1	moyenne*2	p1*3	% ≥ 0,40	p2*4
Chiwisivi	anti 5 +	2,18 ± 0,32	>0,05	64,1 %	>0,05	20	0,84 ± 0,37	<0,05	70 %	-	38	0,42 ± 0,06	>0,05	65,78 %	>0,05
	anti 5 -	2,15 ± 0,47		40,9 %		7	0,51 ± 0,28		100 %		20	0,37 ± 0,13		45,45 %	
Camiri	anti 5 +	2,22 ± 0,37	<0,05	71,23 %	<0,05	57	1,01 ± 0,31	<0,0001	49,12 %	<0,05	71	0,41 ± 0,07	<0,01	68,57 %	<0,05
	anti 5 -	2,04 ± 0,35		42,8 %		17	0,63 ± 0,33		17,6 %		22	0,35 ± 0,07		23,8 %	
La Paz	anti 5 +	2,23 ± 0,37	>0,05	68,13 %	>0,05	62	0,90 ± 0,3	<0,05	33,87 %	>0,05	91	0,37 ± 0,07	<0,001	39,56 %	>0,05
	anti 5 -	2,15 ± 0,27		62,5 %		17	0,71 ± 0,4		27,77 %		31	0,32 ± 0,07		12,12 %	

*1 P.T. : population totale

*2 Moyenne arithmétique de log $\frac{1}{titre}$

*3 Comparaison des moyennes selon le test du t de student

*4 Comparaison des effectifs par le test de χ^2



Tableau n°16: Incidence des anticorps anti-antigène en fonction
du xénodiagnostic

Chagasiques * (Population de La Paz)	nombre de cas	Ac anti-Ag 5	
		nombre	pourcentage
Xéno +	59	48	81.35 %
Xéno -	36	26	72.22 %
Test de χ^2		p > 0,05	

* Sérologie positive: 3 techniques au moins positives parmi l'IMF,
RFC, ELISA, IEP



Tableau n°17: Incidence des anticorps anti-antigène 5 en fonction de la cardiopathie

	Patients avec une sérologie positive					
	Cardiopathiques			non cardiopathiques		
	nombre total	Ac anti-Ag 5		nombre total	Ac anti-Ag 5	
nombre		%	nombre		%	
Chiwisivi	10	5	50 %	19	12	63.15 %
Test de χ^2			$p > 0,05$			
Camiri	17	12	70.5 %	87	63	72.4 %
Test de χ^2			$p > 0.05$			



quant aux groupes cardiopathiques et non cardiopathiques. Nous n'observons aucune différence significative entre les deux groupes.

Une étude plus détaillée a pu être réalisée chez les patients venus consulter à La Paz et le tableau n°18 présente ces résultats. Nous n'observons aucune différence significative quant à la présence des anticorps anti-antigène 5, entre le groupe d'asymptomatiques vrais et celui des patients présentant une pathologie digestive sans autre pathologie associée; nous n'en observons pas non plus entre le groupe présentant une quelconque pathologie et le groupe d'asymptomatiques. Les autres groupes étant très réduits nous n'avons pu réaliser l'étude statistique.

3.2. Etude d'autres antigènes (immunoélectrophorèse)

L'analyse immunoélectrophorétique présente l'avantage par rapport aux techniques de dosage quantitatif des anticorps, d'avoir une approche qualitative de la réponse humorale anti-T. cruzi par la connaissance des caractéristiques immunoélectrophorétiques, d'anticorps dirigés contre des antigènes du parasite. Certains de ces antigènes sont , spécifiques du parasite et ceci présente un intérêt diagnostique évident ; d'autres pourraient être spécifiques de souches de parasites et susciter une réponse en anticorps différente selon les populations. Nous étudierons dans ce chapitre six types d'anticorps, dirigés contre six types d'antigènes différents. Ces anticorps, révélés en immunoélectrophorèse, peuvent présenter une spécificité T.cruzi déjà démontrée, ou être remarquablement fréquents dans le sérum des populations étudiées.

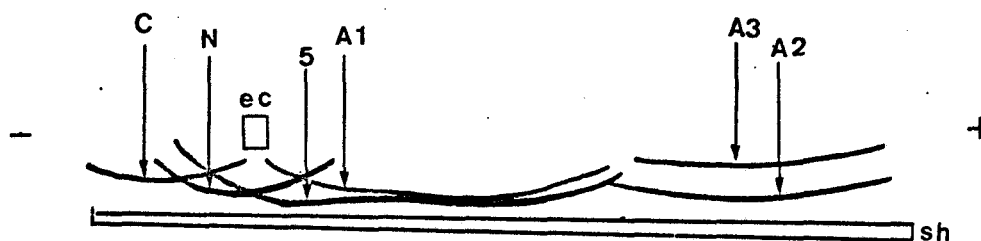
Tableau n°18: Incidence des anticorps anti-antigène 5 en fonction de la pathologie

(Pathologie Population de La Paz)	Effectif total	Ac anti-Ag 5		Test de χ^2 * p
		nombre	pourcentage	
Tube digestif strict	30	19	63.3 %	>0,05
Cardiaque strict	8	7	87.5 %	
Mixte	10	9	90 %	
Toutes pathologies	48	35	72.9 %	>0.05
Asymptomatiques	21	13	61.9 %	

* Comparaison avec le groupe des asymptomatiques



La position immunoélectrophorétique des six types d'anticorps étudiés est schématisée ci-dessous et illustrée par les photos p.68.



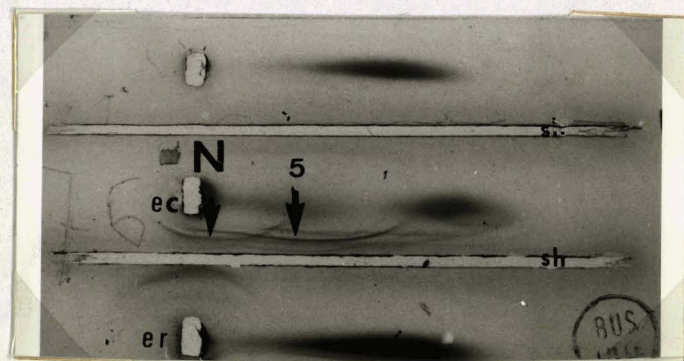
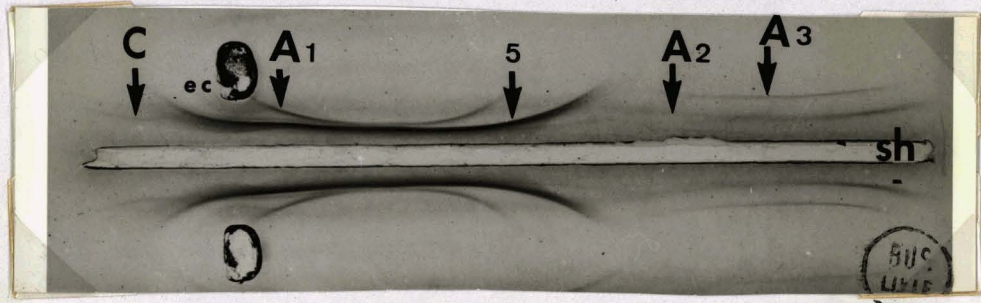
Nous avons repéré six arcs, dans les conditions de l'expérience, selon leur position immunoélectrophorétique :

- . un arc cathodique, (C)
- . un arc neutre, (N)
- . deux arcs anodiques lents : anodique 1 et arc 5, (A1 et 5)
- . deux arcs anodiques rapides: anodique 2 et anodique 3, (A2 et A3).

Seul l'arc 5, dont le tracé est très caractéristique a été montré spécifique de T. cruzi (Afchain, 1976).

L'arc neutre pourrait correspondre au facteur EF (excreting factor), décrit par Marcipar et al., (1980). Cet antigène décrit dans le milieu de culture de formes épimastigotes est un polysaccharide et serait spécifique de T. cruzi. L'arc neutre obtenu entre un sérum humain de chagastique et l'antigène de formes épimastigotes de culture présente la même localisation immunoélectrophorétique que celle caractérisant le facteur EF. De l'antigène de formes épimastigotes traité au TCA 20%, (fraction polysaccharidique, Carlier et al., 1978) donne également un arc de précipitation, avec des sérums humains, de localisation identique à celle de l'arc neutre (photo p. 69).

Position immunoélectrophorétique des six
types d'anticorps étudiés



ec: Antigène épimastogote T.cruzi

er: Antigène épimastigote T.rangeli

C : Arc cathodique

N : Arc neutre

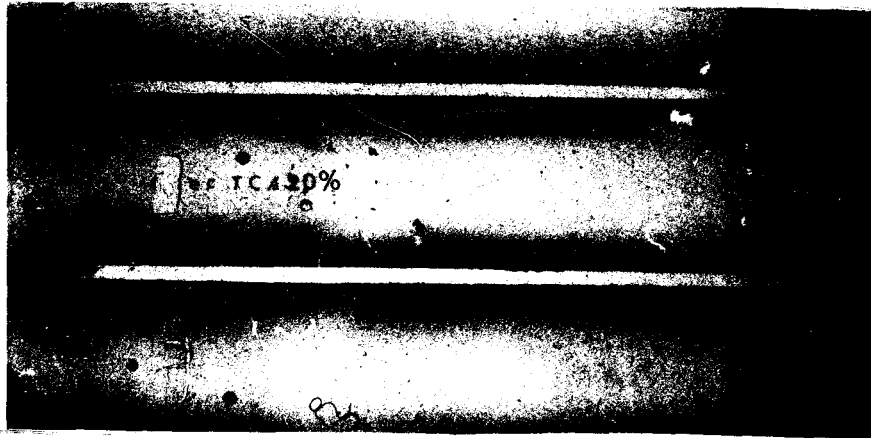
A1: Arc anodique 1

5 : Arc n°5 (Afchain,1976)

A2: Arc anodique 2

A3: Arc anodique 3

Immunoélectrophorèse: extraction TCA 20% de l'antigène de T.cruzi
(ec TCA 20%) testé contre des sérums humains
de chagasiques. (sh1,sh2).



L'arc cathodique repéré, présente une position caractéristique et parmi 10 sérums de chagasiques présentant cet arc et testés contre de l'antigène T. rangeli de formes de culture, aucun ne donne un arc de précipitation avec cette même localisation immunoélectrophorétique.

Les trois arcs anodiques repérés présentent également une position immunoélectrophorétique caractéristique. L'un des deux anodiques rapides correspondrait à un antigène glycoprotéinique (extraction méthanol chloroforme, précipitation à l'éthanol ; Lemesre, communication personnelle). L'étude de leur spécificité est encore à faire.

La figure n°17 présente les fréquences des arcs étudiés chez les chagasiques (sérologie positive) de Chiwisivi, de Camiri et de Salinas. L'arc 5 est majeur pour ces trois populations, les arcs anodiques 2 et 3 sont, après l'arc 5, les plus fréquents. La comparaison des fréquences des arcs, parmi les différentes populations, révèle seulement une différence significative de la fréquence de l'arc anodique 1, entre Salinas et Camiri (moins fréquent à Salinas). Entre Chiwisivi et Salinas les effectifs sont trop réduits pour permettre l'étude statistique de ce même arc.

Il n'y a pas de différence significative des fréquences des arcs observés, entre des chagasiques chroniques avec un xénodiagnostic positif ou négatif (figure n°18).

La figure n°19 présente les fréquences des arcs pour des chagasiques (sérologie positive) avec ou sans cardiopathie. L'étude statistique n'a été menée que pour quelques arcs car les effectifs étaient le plus souvent très réduits. Remarquons qu'à Salinas 18.1 % des cardiopathiques présentent l'arc 3 alors que les non cardiopathiques ne le présentent pas.

Figure n° 17 : Fréquences des 6 arcs de précipitation repérés en IEP, dans le sérum de chagasiques de Chiwisiwi, Camiri, Salinas

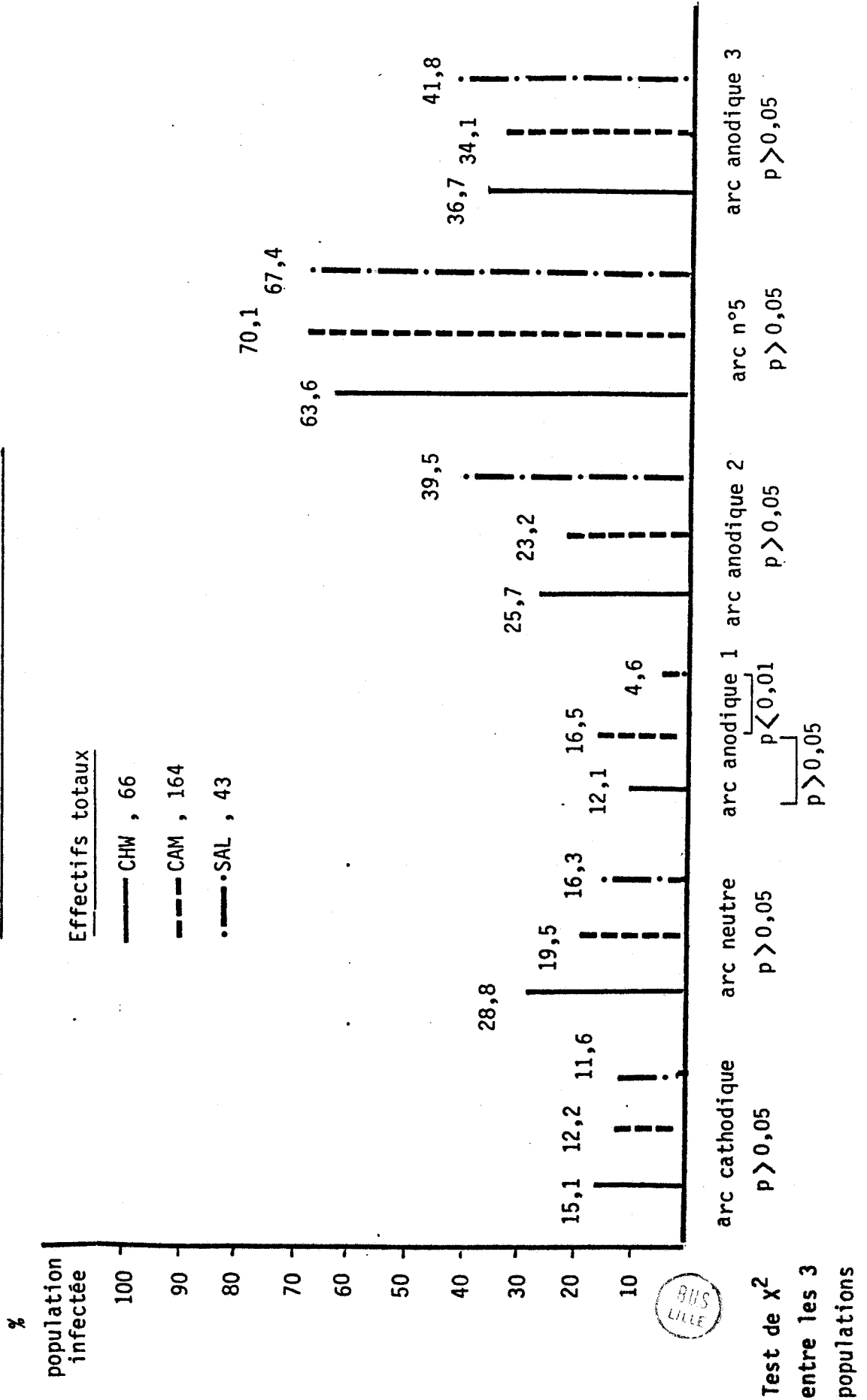
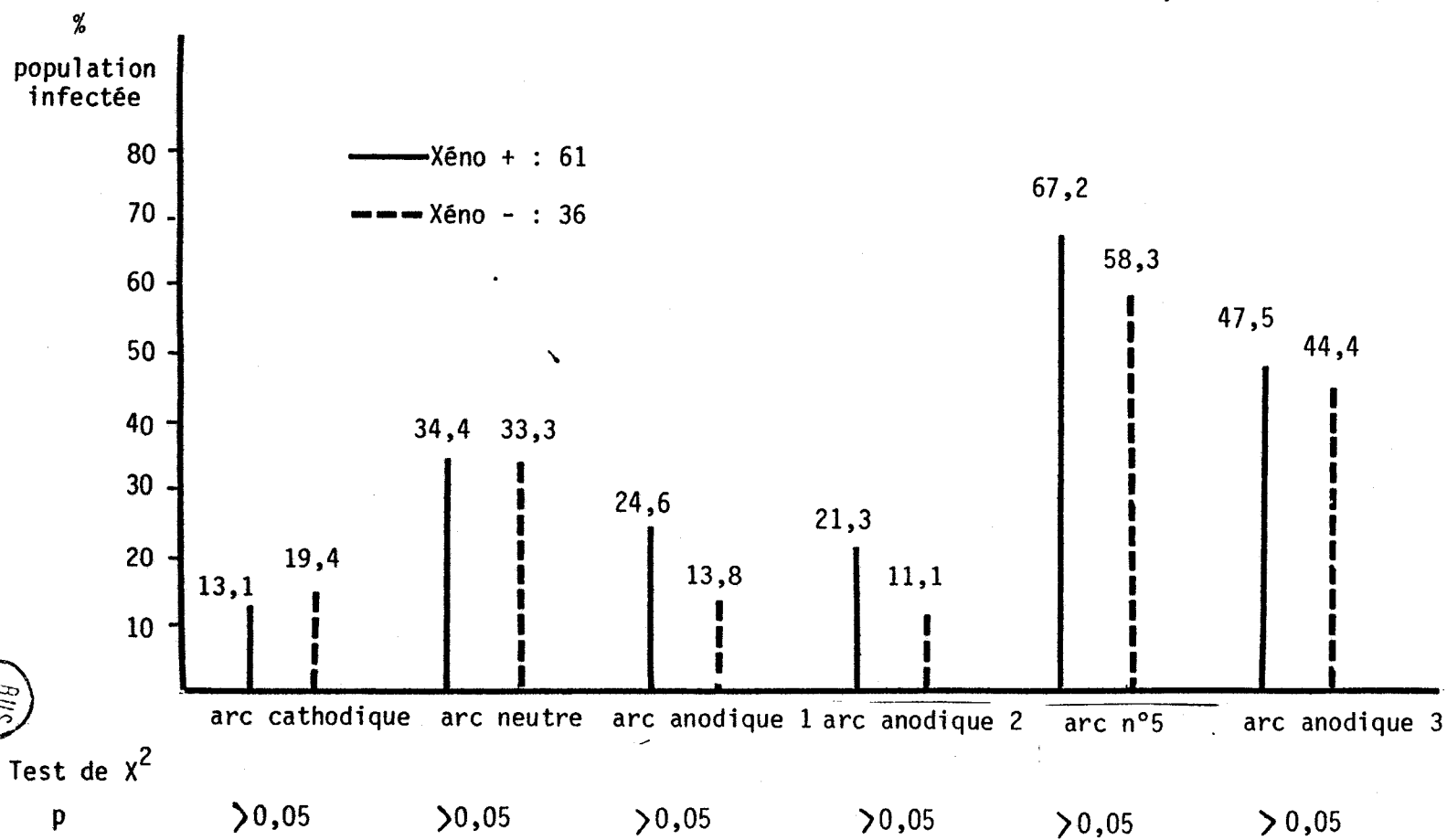
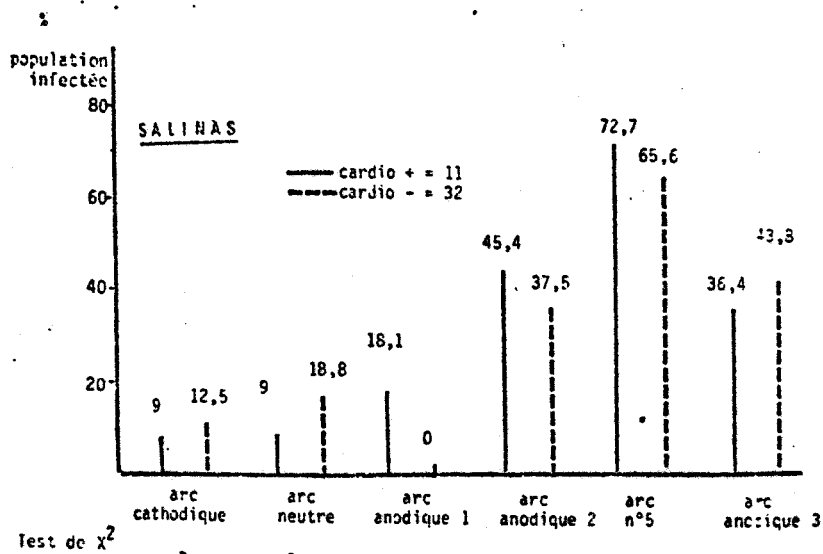
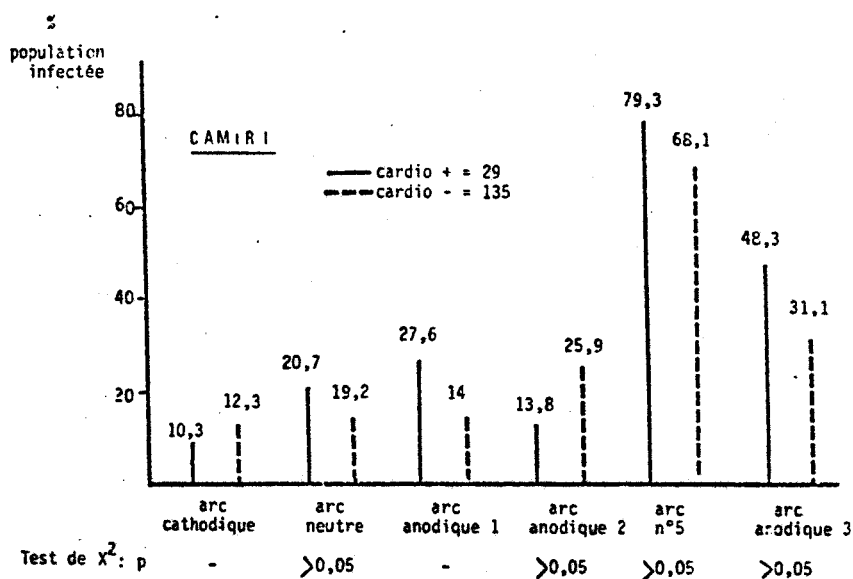
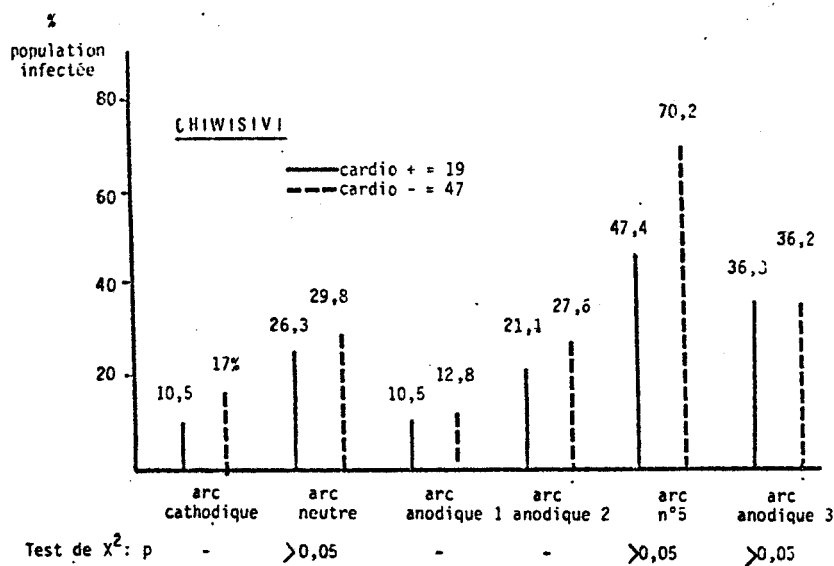


Figure n°18 : Fréquences des 6 arcs de précipitation repérés et le
xénodiagnostic



BIUS
LITE

Figure n°19: Fréquences des arcs repérés chez des chagasiques
avec ou sans cardiopathie



L'étude a été poursuivie chez les patients venus consulter à La Paz. La figure n° 20 montre quelles sont les fréquences de ces arcs parmi les différents groupes de chagasiques présentant une pathologie et le groupe des chagasiques asymptomatiques.

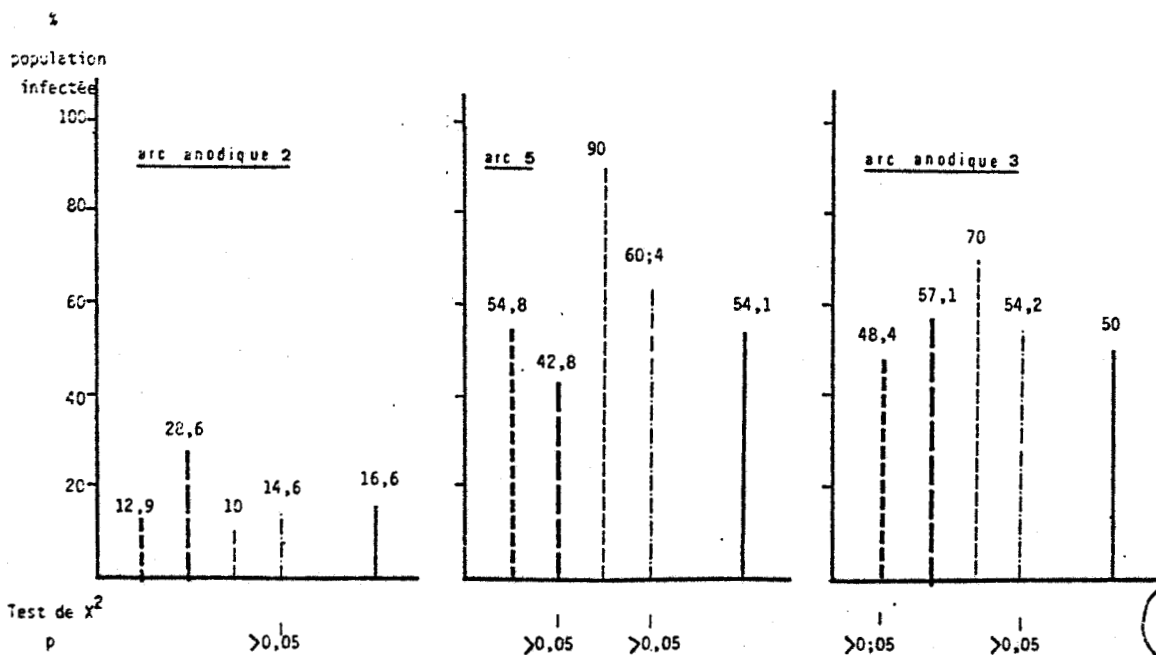
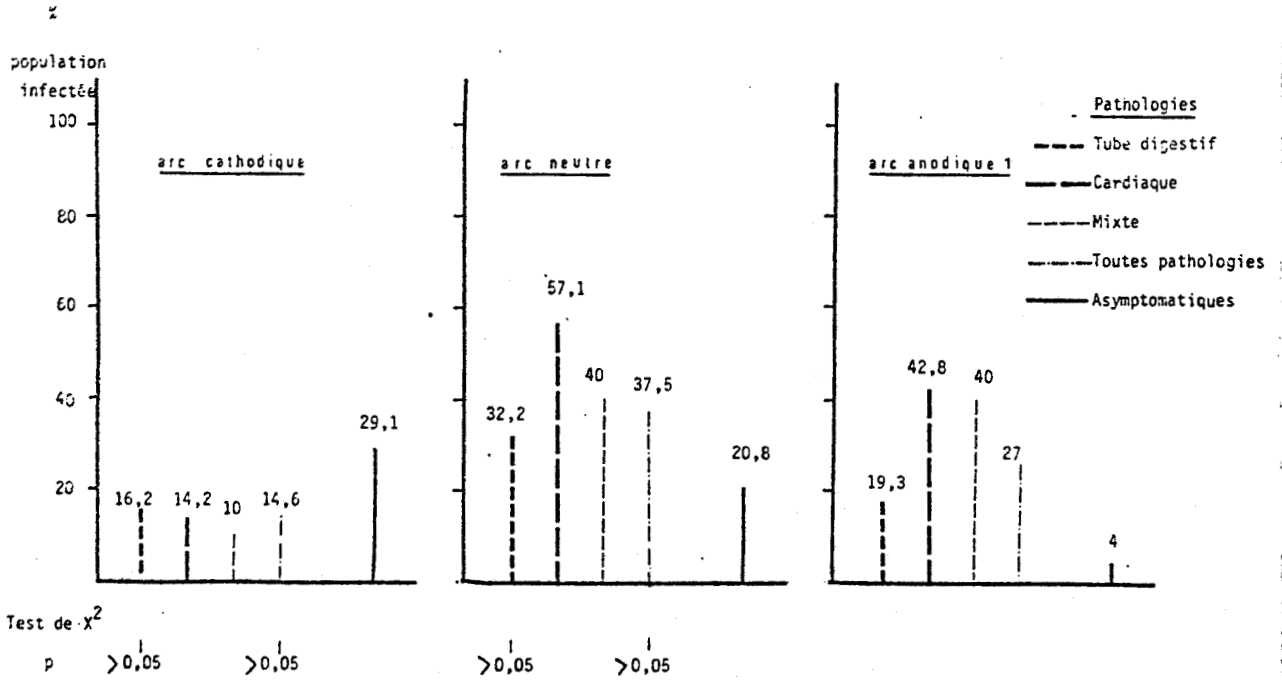
Etant donné les effectifs réduits dans chaque groupe, l'étude statistique n'a pu être réalisée que pour certains arcs. Les fréquences des arcs, cathodique, neutre, 5 et anodique 3, ne sont pas différentes pour les chagasiques asymptomatiques et ceux présentant une pathologie du tube digestif non associée ; celles des arcs neutre, anodique 2, 5 et anodique 3 ne sont pas différentes pour les chagasiques asymptomatiques et ceux présentant une quelconque pathologie. Remarquons seulement que la fréquence de l'arc anodique 1 est beaucoup plus élevée chez les individus présentant une pathologie.

V. REPONSE HUMORALE AUTOIMMUNE DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION

Rappelons tout d'abord que les autoanticorps EVI ont été mis en évidence par Cossio et al. (1974), dans le sérum de 95 % des cardiopathiques chroniques. Plusieurs auteurs travaillant sur des populations différentes ne confirment pas ces résultats. D'autre part, Szarfman et al. (1976) montrent que les autoanticorps dirigés contre la gaine de Schwann existent dans le sérum de patients présentant des anticorps EVI. Ce dernier résultat nous a permis de choisir un seul type d'autoanticorps (les EVI) pour l'exploration de la réponse humorale autoimmune.

Une première partie de notre étude a été menée sur les sérums de patients de Chiwisivi et de Camiri.

Figure n°20: Fréquences des arcs repérés et pathologie



BUS
LILLE

La figure n°21 et le tableau n°19 montrent que, parmi les populations de Chiwisivi et de Camiri, les taux moyens des EVI sont plus élevés chez les patients chagasiques comparés aux non chagasiques et le nombre de patients avec des taux $\geq 1/40^{\text{ème}}$ en IMF est plus grand.

D'autre part, pour ces deux populations, il n'y a aucune différence significative des taux des anticorps EVI entre les chagasiques avec ou sans cardiopathie (figure n°22, tableau n°20, a et b).

L'étude précédente est restrictive dans la mesure où les patients peuvent présenter une pathologie associée. L'étude des anticorps EVI chez des patients de La Paz, permet de conclure qu'il n'y a pas de rapport entre le taux des anticorps EVI et la pathologie (tableau n°21) car la comparaison des patients présentant une pathologie est alors faite en fonction d'un groupe d'asymptomatiques vrais.

Figure n° 21 : Taux des anticorps EVI dans le sérum de patients de Camiri et de Chiwisivi avec une sérologie positive ou négative

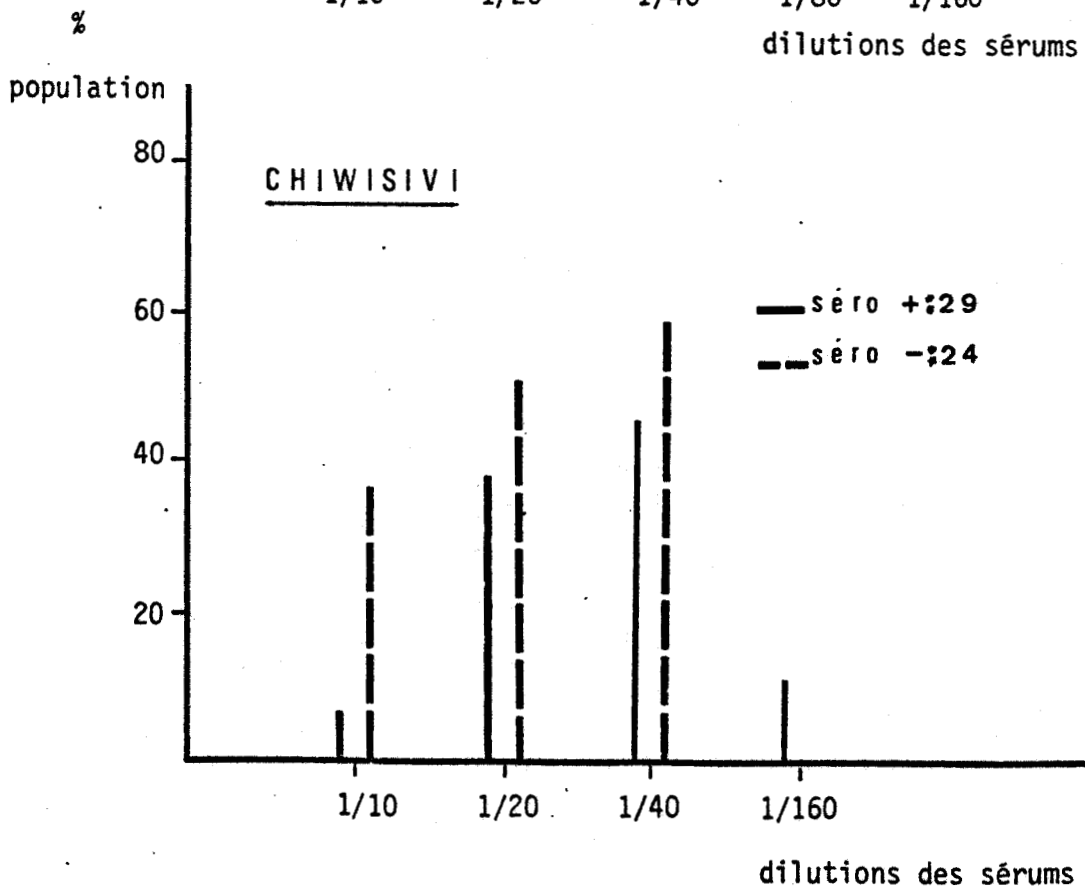
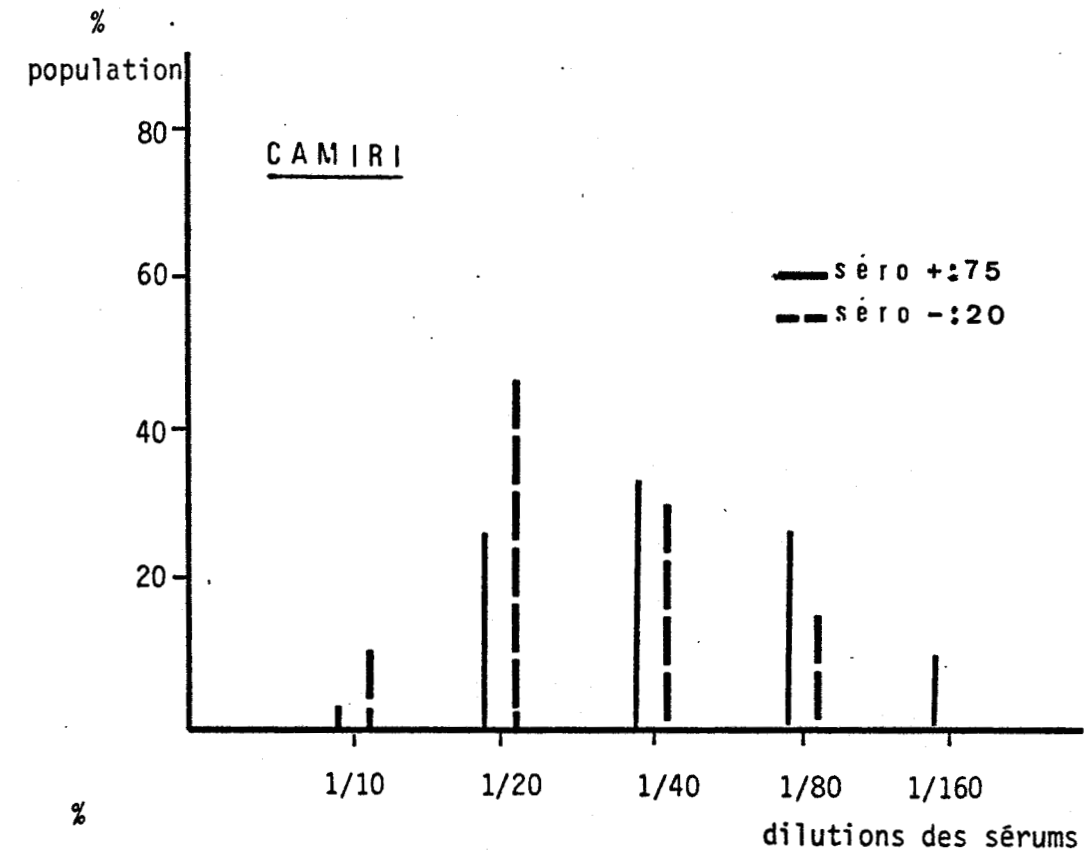


Tableau n°19: Analyse statistique des taux des anticorps EVI dans le sérum
de patients chagasiques ou non chagasiques.

		effectif	moyenne*1	p1*2	% $\geq 1/40$	p2*3
CHIWISIVI	séro*4 +	29	1,48 \pm 0,23	< 0,05	55,2 %	< 0,01
	séro -	24	1,23 \pm 0,20		12,5 %	
CAMIRI	séro +	75	1,64 \pm 0,31	< 0,05	70,6 %	< 0,01
	séro -	20	1,39 \pm 0,22		35 %	

*1 Moyenne arithmétique des $\log \frac{1}{\text{titre}}$

*2 Comparaison des moyennes selon le test du t de student

*3 Comparaison des effectifs par le test de χ^2

*4 3 techniques au moins positives ou négatives parmi les techniques d'IMF, RFC, ELISA, IEP.



Figure n°22 : Taux des anticorps EVI dans le sérum de patients
avec ou sans cardiopathie

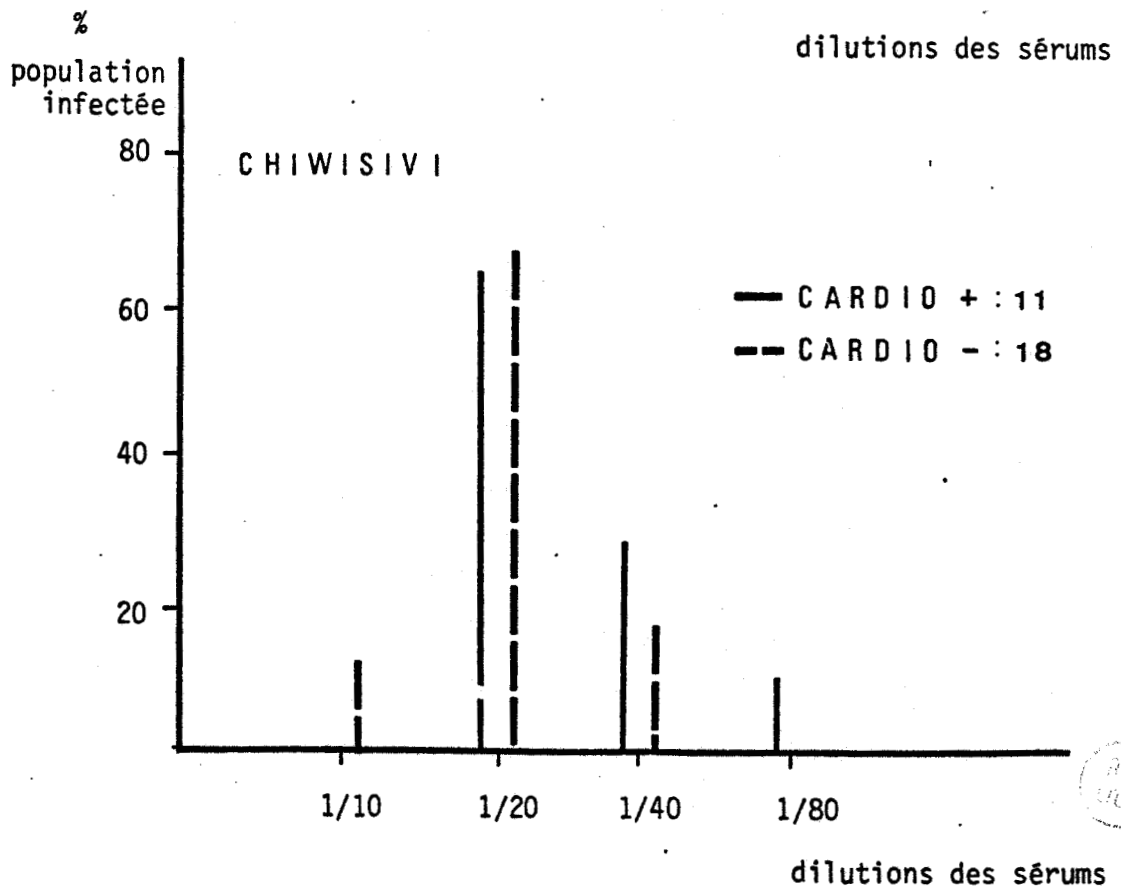
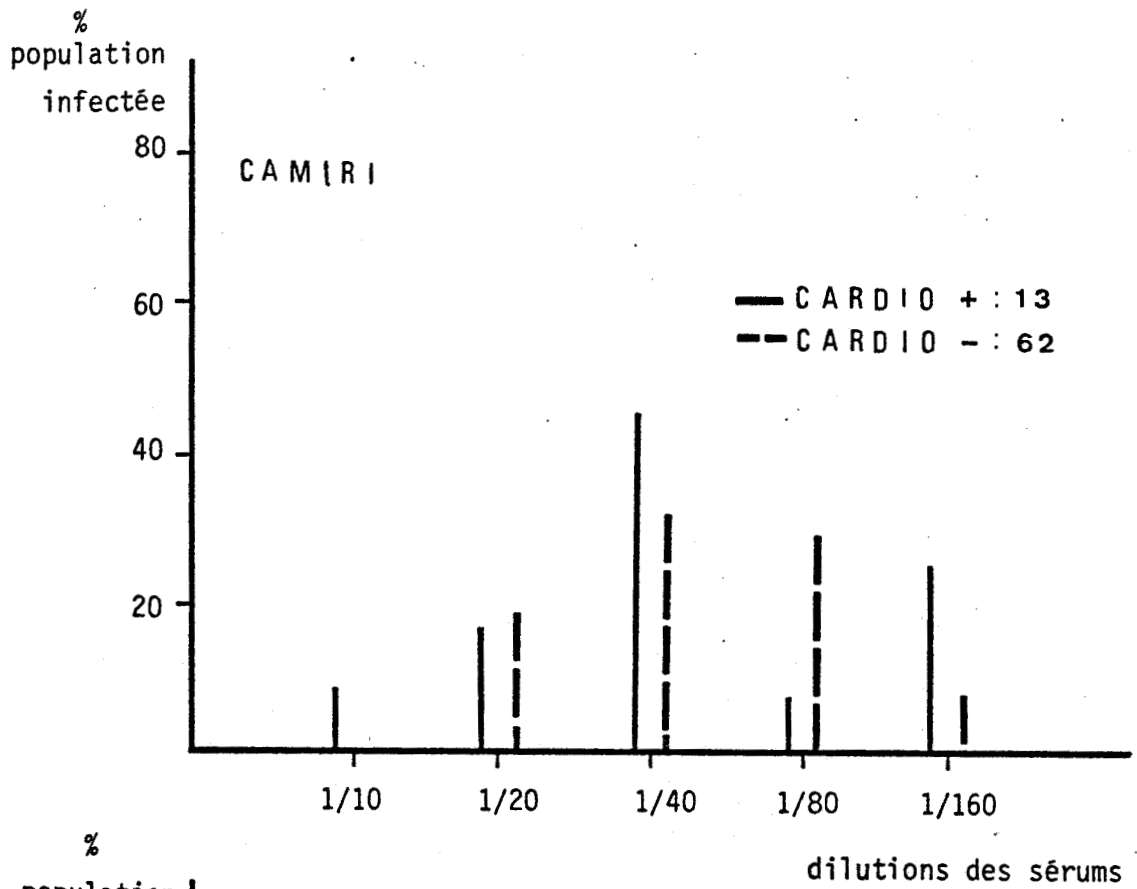


Tableau 20 : Analyse statistique du taux des anticorps EVI dans le sérum de chagasiques avec ou sans cardiopathie.

a)

	effectif	moyenne*1	p1*2
Chagasiques*3 de Chiwisivi			
cardio +	11	1,44 ± 0,21	>0,05
cardio -	18	1,50 ± 0,25	
Chagasiques*3 de Camiri			
cardio +	13	1,67 ± 0,37	>0,05
cardio -	62	1,64 ± 0,29	

*1 Moyenne arithmétique des $\log \frac{1}{\text{titre}}$ et écart type

* 2 Comparaison des moyennes selon le test du t de student

b)

Chiwisivi + Camiri	Effectif	Taux des anticorps EVI			
		$\geq 1/20$		$\geq 1/40$	
		Nombre	%	Nombre	%
Chagasiques*3 avec cardio	24	14	58.3 %	5	20.8 %
Chagasiques*3 sans cardio	80	55	68.7 %	25	31.25 %
Test de χ^2		p > 0.05		p > 0.05	

*3 Sérologie positive: 3 techniques au moins positives parmi l'IMF, RFC, ELISA, IEP.



Tableau 21 : Taux des anticoprs EVI et pathologie

Pathologies	effectif	moyenne*1	p1*2	% \geq 1/40	p2*3
Gastrique non associée	31	1,61 \pm 0,3	>0,05	71 %	>0,05
Cardiaque non associée	7	1,47 \pm 0,24	>0,05	42,9 %	
Mixte	10	1,51 \pm 0,2	>0,05	50 %	
Toutes pathologies	48	1,57 \pm 0,2	>0,05	62,5 %	>0,05
Asymptomatiques	24	1,5 \pm 0,2		54,2 %	

*1 moyenne arithmétique des $\log \frac{1}{\text{titre}}$

*2 Comparaison des moyennes avec le groupe des asymptomatiques selon le test du t de Student.

*3 Comparaison des effectifs avec le groupe des asymptomatiques par le test de χ^2 .



DISCUSSION

I. TAUX DES IMMUNOGLOBULINES DANS LE SERUM DE CHAGASIQUES EN PHASE CHRONIQUE DE L'INFECTION

1. Immunoglobulines de classes IgG, IgM, IgA

Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur la présentation du sujet, les résultats des différents travaux, sur les dosages des immunoglobulines totales IgG, IgM, IgA, sont discordants. Un point important est à souligner : la nécessité de sélectionner une population témoin du même endroit comme l'ont noté Marsden et al. (1970) qui ont travaillé sur une population brésilienne d'un même village. Dans le cadre de notre étude, les trois groupes de chagasiques sont comparés à des groupes témoins du même endroit. Les conditions d'expérience étant semblables pour tous les sérums, nous obtenons des résultats différents selon la population étudiée.

Les individus infectés de Chiwisiwi présentent des taux moyens d'IgG et d'IgM significativement plus élevés que les témoins, ceux de Camiri, par contre, ne montrent aucune différence significative comparés aux témoins et l'âge moyen de ces deux populations n'est pas significativement différent.

L'altitude peut être évoquée pour justifier cette différence. Comme nous le reprendrons ci-dessous, cette hypothèse est infirmée par les résultats obtenus sur la population de La Paz composée de personnes vivant à 3500 m depuis au moins 5 ans. Remarquons cependant, que la population de Chiwisiwi, composée d'agriculteurs, est en contact étroit avec le vecteur, alors que celle de Camiri, citadine, et de catégorie socio-économique moyenne, n'est plus en contact permanent avec le vecteur grâce à l'amélioration de l'habitat en ville. Ces résultats restent en contradiction avec ceux de Marsden et al. (1970), dont la population sélectionnée au Brésil était paysanne et les auteurs ne montrent aucune différence significative des taux des immunoglobulines de classes IgG, IgM, IgA, entre les chagasiques et les témoins.

D'autre part, l'existence de souches différentes dans les deux zones n'est pas à écarter. En effet, Tibayrenc montre que les types I et II (décrits par typage enzymatique) présentent des fréquences différentes dans la zone de Santa-Cruz et celle de Chiwisivi (communication personnelle). Cette situation pourrait également se présenter entre Camiri et Chiwisivi.

Le taux moyen des IgG totales dans le sérum de patients chagasiques de La Paz est significativement plus élevé que celui des témoins, mais ces valeurs restent dans les limites normales des taux sériques d'européens.

La comparaison des taux moyens des différentes classes d'immunoglobulines parmi les populations témoins vivant à des altitudes différentes (voir tableau) ne permet pas de conclure à une stimulation ou suppression polyclonale des immunoglobulines en altitude. En effet si les IgG totales sont plus élevées à Camiri (800 m) qu'à Chiwisivi et La Paz, il n'y a aucune différence significative entre ces deux dernières populations (3500 m - 2500 m). L'environnement parasitaire à Camiri pourrait justifier cette augmentation. Pour les IgM et IgA totales, il n'y a pas de différence notable entre les populations.

Sujets non chagasiques	Taux moyens Ig totales			
	IgG	IgM		IgA
		Hommes	Femmes	
La Paz (3500 m)	125 ± 40	163 ± 90	226 ± 114	143 ± 59
Chiwisivi (2500 m)	121 ± 30	131 ± 50		162 ± 60
Camiri (800 m)	187 ± 62		231 ± 98	136 ± 56

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation des IgG et des IgM totales au cours de la phase chronique de l'infection, est faible, indépendante de l'altitude et variable selon les régions.

2. Immunoglobulines de classe IgE

Les taux des IgE totales de patients en phase chronique de l'infection et de sujets non infectés ne sont pas significativement différents quelle que soit la population étudiée. Il faut noter que le nombre de sujets avec des IgE dépassant 920 UI/ml, est beaucoup plus grand à Camiri que dans les deux autres populations. Cette augmentation globale des IgE pour cette population est probablement due aux nombreuses infections par des helminthes dans cette zone. Geller et al. (1978c) comparent les taux moyens d'IgE totales de patients chagasiques et de leurs témoins de la même zone; leurs résultats sont comparables à ceux de Camiri mais ne permettent pas de conclure en la non augmentation des IgE totales au cours d'une infection par T. cruzi. L'augmentation des IgE par des infections à helminthes peut masquer une certaine augmentation due à l'infection par T. cruzi. Par contre, si on considère les deux groupes réunis de personnes non infectées (52) de Chiwisivi et de La Paz, 4% présentent des taux élevés en IgE (>920 UI/ml) et parmi les chagasiques 3%. Nous pouvons donc conclure qu'au cours de la phase chronique de l'infection par T. cruzi il n'y a pas d'augmentation des IgE totales.

L'étude des IgE spécifiques réalisée sur des sérums de patients de Camiri montre une différence significative des taux moyens entre les chagasiques et les témoins. Remarquons cependant que le nombre de patients chagasiques, en phase chronique de l'infection, présentant des IgE spécifiques est faible. Un travail récent de Martin et al. (proposé pour publication) effectué dans le même laboratoire, sur des sérums d'enfants en phase aiguë de l'infection montre un nombre important de sérums avec des IgE spécifiques. L'allergène responsable de la production d'IgE spécifiques semble être lié à la phase aiguë de l'infection et il pourrait y avoir un rapport avec la présence de parasites circulants.

L'intérêt diagnostique de cet allergène, semble être réduit en phase chronique par le peu de cas présentant des IgE spécifiques, d'autre part il ne

semblerait pas spécifique de T.cruzi. Des sérums de patients infectés par Leishmania brasiliensis présentent des IgE spécifiques de Leishmania donovani (Afchain et al., 1981). Des études en cours (Afchain et al.) montreraient qu'il s'agit d'un allergène commun à de nombreux Trypanosomatidae, et son application pour le diagnostic précoce des infections par T.cruzi, ne serait réalisable que dans des zones où les infections par Leishmania brasiliensis seraient absentes.

La question reste posée quant au rôle de ces IgE spécifiques : contrôle de la parasitémie en phase aiguë et peut-être en phase chronique dans certaines circonstances immunologiques.

II. IMMUNS COMPLEXES

Comme nous l'avons présenté dans le premier chapitre, quelques études d'infections expérimentales et humaines par T. cruzi montrent la présence d'immuns complexes en phase aiguë et chronique de l'infection. Nos résultats des dosages des immuns complexes en phase chronique de l'infection confirment les précédents et la différence des taux moyens d'immuns complexes des patients avec cardiopathie et sans cardiopathie n'est pas significative. Remarquons toutefois que le groupe de patients avec cardiopathie est très réduit et que les non-cardiopathiques peuvent présenter une pathologie digestive. L'étude de l'incidence des immuns complexes en fonction de la pathologie de la maladie de Chagas nécessite un groupe d'asymptomatiques vrais atteints d'aucune pathologie.

De nombreuses pathologies sont associées à des dépôts d'immuns complexes dans les tissus et à des immuns complexes circulants, ces deux facteurs immunologiques existent en phase chronique de l'infection mais la nature de ces immuns complexes est discutable : les dépôts d'immunoglobulines mis en évidence au niveau de cellules musculaires pourraient être d'origine parasitaire ou d'origine autoimmune. La connaissance du mécanisme impliqué passe par l'identification d'antigène complexé ou d'antigène circulant. Les arguments en faveur de l'origine

parasitaire de ces dépôts sont en premier lieu la nature parasitaire des immuns complexes démontrée dans les cas aigus d'infection (Martin et al., 1981) et dans les cas chroniques de patients vénézuéliens (Fruit et al., 1979). De plus, quelques travaux montrent la présence d'antigènes circulants de T. cruzi dans les sérums expérimentaux en phase aiguë de l'infection (Siqueira et al., 1966 ; Dzebenski, 1974 ; Araujo et al., 1976, 1977) et également un travail montre la présence d'antigène circulant dans le sérum de patients en phase aiguë ou chronique de l'infection (dosage réalisé par la technique d'ELISA), (Araujo et al. 1981).

Enfin, remarquons que les anticorps complexés observés en phase aiguë de l'infection sont de nature IgM (Martin et al., 1981) et ne correspondent probablement pas aux mêmes antigènes que ceux détectés en phase chronique où les IgM spécifiques de T. cruzi sont très faibles. En phase chronique de l'infection, les formes amastigotes intracellulaires sont très abondantes et des immuns complexes de nature parasitaire, spécifiques de stade évolutif doivent être aussi recherchés.

Certains travaux sont en faveur de l'origine autoimmune des dépôts d'immunoglobulines dans les tissus nous y reviendrons à propos de la réponse humorale autoimmune.

III - FACTEURS DU COMPLEMENT

Les dosages du C3 activateur, C3c, C4 permettent d'avoir une mesure de l'état d'activation du complément par la voie classique (C4) et par la voie alterne (C3 activateur, C3c). Aucune différence significative des taux moyens de ces trois facteurs n'est observée entre le groupe de chagasiques et celui des témoins et les valeurs moyennes restent dans les limites normales établies pour des sérums européens. Des variations anormales des concentrations sériques de certains facteurs du complément ont été montrées dans d'autres infections à

trypanosomes (maladie du sommeil), (Shirazi et al., 1980; Rurangirwa et al., 1980) au moment de fortes parasitémies avec retour à des taux normaux quand la parasitémie baisse. En phase chronique de l'infection, le complément pourrait participer au contrôle de la parasitémie mais, les variations des facteurs du complément seraient faibles car le contrôle se ferait progressivement.

IV - DOSAGE DES ANTICORPS ANTI-T. CRUZI ET LE DIAGNOSTIC

Le choix des techniques de diagnostic dépend de l'objectif recherché : diagnostic précoce de la phase aiguë ou diagnostic de la phase chronique, enquêtes épidémiologiques ou diagnostic de consultation médicale. Le diagnostic immunologique précoce est basé sur la mise en évidence d'anticorps anti-T. cruzi de classe IgM deux à trois semaines après l'infection mais la mise en évidence d'antigène circulant à ce stade de la maladie pourrait permettre un diagnostic encore plus précoce. Dans le cas d'enquêtes épidémiologiques, les techniques à préconiser sont celles d'un emploi facile, demandant peu de moyens économiques, d'une bonne spécificité même si elles manquent de sensibilité (ex : agglutination au latex, Pellegrino, 1971).

Le diagnostic de la phase chronique de l'infection peut être assuré par un diagnostic immunologique basé sur la mise en évidence d'anticorps spécifiques de T. cruzi dans le sérum des patients. Ce diagnostic permet au clinicien de confirmer l'étiologie des troubles cardiaques ou digestifs qu'il constate, et de prescrire la poursuite des examens cliniques ainsi qu'un examen parasitologique (xénodiagnostic). En général, le diagnostic immunologique ne permet pas au clinicien de traiter car les médicaments spécifiques de la maladie de Chagas sont des agents trypanocides des formes circulantes trypomastigotes et le traitement ne s'effectue qu'en cas de mise en évidence de parasites circulants (xénodiagnostic positif). Dans certaines régions d'Amérique Latine, il est important de pouvoir faire un diagnostic différentiel entre l'infection par T. cruzi et l'infection par T. rangeli ou les leishmanioses cutanéomuqueuses du nouveau-monde. En effet, les travaux d'Alchain (1976) montrent qu'environ 3/10ème

des structures antigéniques communes entre les Stercoraria et les Leishmania et 6/10ème sont partagées entre T. cruzi, T. rangeli, T. dionisiï, à l'intérieur du groupe Stercoraria.

Parmi les nombreuses réactions sérologiques de dosage des anticorps, nous en avons utilisé quatre dont nous discuterons la valeur.

1. Techniques quantitatives de dosage des anticorps

La réaction de fixation du complément, décrite en 1913 par Guerreiro et Machado fut la première utilisée et est encore de nos jours la technique considérée de référence en Amérique Latine. La culture en masse des formes épimastigotes, a permis l'amélioration des tests en utilisant différentes préparations ou extractions antigéniques. Le groupe d'étude "sérologie Chagas" de la PAHO en 1966, a sélectionné 7 antigènes comme les plus utilisés dont un antigène aqueux soluble (Cerisola et al., 1960; Maekelt, 1966) qui est semblable à l'antigène que nous avons utilisé. Bien que cette technique soit celle de référence, les techniques d'hémagglutination, d'ELISA, d'IMF, mises au point postérieurement ont été généralement plus sensibles.

D'autre part, la réaction de fixation du complément est limitée dans un certain nombre de cas, par le pouvoir anticomplémentaire des sérums. Toutefois, parmi 259 sérums de boliviens, aucun n'a été trouvé anticomplémentaire.

La réaction d'immunofluorescence indirecte est simple à réaliser, plus rapide (quelques heures) que celle de la fixation du complément et l'emploi de formes épimastigotes sur lames introduit par Girola en 1965 a donné de bons résultats (96 % de corrélation avec la RFC). Plusieurs travaux montrent qu'elle est plus sensible que la RFC et qu'elle donne une bonne corrélation

(Girola et al., 1965 ; Alvarez et al., 1969 ; Petana, 1975 ; Camargo et al., 1977 ; Fuch et al., 1980).

Choisie dans notre travail comme technique de référence, pour sa sensibilité et sa spécificité, cette technique nous a permis de définir les seuils de spécificité des autres techniques après avoir déterminé son propre seuil de spécificité à l'aide de sérums témoins.

En sérologie, il est toujours recommandé de prendre comme témoins sains d'une maladie, des sérums des populations locales et, si la maladie de Chagas n'existe pas en Europe, l'emploi de témoins européens n'est pas idéal ; en effet, des facteurs d'environnement sanitaire ou des facteurs génétiques peuvent être responsables de fausses réactions.

La meilleure population témoin en Bolivie, semble être la population vivant sur l'altiplano (4000 m) et n'ayant jamais voyagé en dehors de l'altiplano : selon les médecins, le Ministère Bolivien de la Santé et les habitants eux-mêmes de l'altiplano, la maladie de Chagas n'existe pas à cette altitude ; cependant Lent et al. (1979) signalent la présence de Triatoma infestans à une altitude de 4100 m. Mais la présence de vecteurs de la maladie de Chagas à cette altitude serait occasionnelle et n'implique pas la réalisation du cycle. Aucun sérum européen et aucun témoin de l'altiplano ne donnent un titre $\geq 1/40$. Il en est de même pour les patients atteints de leishmaniose cutanéomuqueuse mais le groupe de patients est réduit et l'étude incomplète, doit être poursuivie.

Enfin, parmi des chagasiques avec un xénodiagnostic positif, c'est-à-dire parasitologiquement confirmés, la figure n°14 montre que plus de 10 % de la population présente un titre de 1/40ème et 0% un titre inférieur à 1/40ème.

La technique d'ELISA est moderne, très employée, et les publications internationales appliquant cette méthode à des antigènes parasitaires sont actuellement très nombreuses. Sa sensibilité et sa spécificité dépendent de l'antigène employé, mais elle est en général de sensibilité égale à celles d'IMF, d'hémagglutination, de radio-immuno-essais. Cette technique est de nos jours appliquée en microméthode et automatisée. Elle permet d'utiliser des quantités très faibles d'antigène et ne demande pas, comme l'utilisation des réactions radioimmunologiques, de personnel spécialisé et de locaux spéciaux ; c'est une bonne technique pour l'utilisation de fractions antigéniques purifiées ou semi-purifiées et ses diverses applications permettent des dosages d'anticorps ou d'antigènes dans le sérum.

Elle n'est pas encore systématisée pour le diagnostic de l'infection par T. cruzi mais Voller et al. (1975) qui l'ont adaptée au modèle T. cruzi obtiennent 98 % des sérums positifs en IMF, positifs également en ELISA. Fuch et al. (1980) confirment ces résultats et les sensibilités respectives obtenues pour l'IMF et l'ELISA sont de 95,2 % et 98,5 % tandis qu'elles sont de 73,1 % et 75,2 % pour la RFC et l'hémagglutination. Ces derniers résultats sont en contradiction avec ceux de Alvarez et al. (1969) qui montrent une sensibilité analogue entre l'hémagglutination et l'IMF ; la qualité des antigènes peut être à l'origine de ces divergences.

Les travaux de Anthony et al. (1979) montrent que 33 chagasiques boliviens testés en ELISA présentent des anticorps contre T. rangeli à des taux deux fois moins élevés que ceux dirigés contre T. cruzi. Aucun travail n'ayant été réalisé sur la prévalence des infections par T. rangeli en Bolivie, il peut s'agir de réactions croisées ou d'infections mixtes.

Guimares et al. (1981) montrent qu'un extrait salin antigénique des formes épimastigotes de culture donne moins de réactions croisées, avec des sérums de leishmaniose cutanéomuqueuse que l'antigène délipidé standard de Maekelt, (1960). En Bolivie, la répartition des leishmanioses dans le pays n'est

pas parfaitement connue. Les travaux de Desjeux et al. (1974) ont montré leur importance dans la région des Yungas (vallées).

La sensibilité d'une technique est définie par le pourcentage d'individus parasitologiquement confirmés qui donnent un test positif. Ce test parasitologique permet de sélectionner une population dont l'infection est assurée, mais ne sélectionne pas les chagasiques chroniques pour lesquels la parasitémie est faible. D'autre part, l'étude des anticorps anti-T. cruzi chez des chagasiques avec xénodiagnostic positif montre en moyenne des taux plus élevés que chez des chagasiques avec un xénodiagnostic négatif. Ceci explique les sensibilités des techniques d'IMF, de RFC et d'ELISA qui atteignent 100 % dans le cas de patients avec un xénodiagnostic positif.

D'autres auteurs sélectionnent, pour l'étude comparative de techniques sérologiques, comme critère de population infectée, la clinique (Fuchs et al. 1980). Mais, en aucun cas la clinique ne peut servir de diagnostic de certitude à cause de sa non spécificité.

Nous avons essayé d'aborder d'une autre manière cette étude, en considérant infectés, les individus présentant 3 tests sérologiques positifs sur 4 et non infectés ceux présentant 3 tests sérologiques négatifs sur 4

Selon ce critère, les sensibilités des techniques d'IMF, de RFC et d'ELISA sont très élevées et tout à fait comparables entre elles ; ceci peut-être dû à l'homogénéité de l'antigène utilisé, qu'il soit particulaire ou soluble. Dans environ 97 % des cas, l'association de deux de ces techniques confirme le diagnostic établie à l'aide des quatre et les deux techniques sont à la fois positives ou négatives. Bien que chacune de ces techniques soit très sensible, l'emploi de deux techniques donne une plus grande sécurité de diagnostic.

Toutefois, dans la plupart des pays d'Amérique latine, les zones d'infections par T. rangeli ou par Leishmania ne sont pas toujours connues et il est nécessaire d'avoir un diagnostic spécifique de l'infection par T. cruzi afin d'écartier tout type de réaction croisée.

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, l'étude qualitative des anticorps anti-T. cruzi permet de résoudre ce problème.

2. Techniques qualitatives de dosage des anticorps

L'immunoélectrophorèse (IEP), proposée par Afchain et al., (1970) n'a jamais été appliquée en zone endémique. Le nombre moyen d'arcs de précipitation que nous avons obtenu dans le sérum de 201 chagasiques boliviens en phase chronique de l'infection atteint 5,6 arcs \pm 2,7. Le nombre de précipitines est donc important; si cette technique est moins sensible que les autres, elle est plus spécifique puisque aucun sérum négatif dans les trois techniques quantitatives n'est positif en IEP.

Son intérêt réside aussi dans la reconnaissance de l'arc 5 spécifique de T. cruzi; mais, dans un certain nombre de cas, seule la réaction d'identité en double diffusion permet de le mettre en évidence. En effet, la double diffusion est plus sensible puisqu'elle révèle à Camiri et Salinas 78 % et 87 % de patients avec des anticorps anti-5 contre 70 % et 67,4 % en immunoélectrophorèse.

A l'aide de ces techniques de précipitation, l'utilisation du seul critère de la présence des anticorps anti-5 dans le sérum n'est pas aussi sensible que l'utilisation de 2 techniques sérologiques. Les techniques de précipitation sont d'une sensibilité limitée, mais l'étude qualitative de la réponse humorale que nous avons faite montre bien que les anticorps anti-Ag.5 sont majeurs au cours de la phase chronique de l'infection (Chiwisivi : 64 % ; Cmairi : 78 % ; Salinas : 87 %) et l'utilisation d'antigène 5 purifié ou peut être seulement semi-purifié ou d'anticorps monoclonaux anti-antigène 5

aussi dissemblables que les techniques d'ELISA et RFC. Ce résultat semble montrer que les anticorps dosés par plusieurs techniques ne sont pas équivalents même si ils sont dirigés contre le même antigène total.

Pour ces raisons, l'étude quantitative de la réponse immune humorale a été faite, dans la mesure du possible, pour chaque technique et les résultats montrent que si ces techniques sont en corrélation, lors de l'analyse quantitative des anticorps en fonction d'un critère donné, les résultats peuvent être différents selon la technique étudiée.

L'analyse statistique menée pour chaque technique est de deux types : la comparaison de la moyenne arithmétique des taux et la comparaison des effectifs présentant des taux d'anticorps élevés, c'est-à-dire des taux supérieurs à une limite choisie arbitrairement. Ces deux approches permettent de voir si en moyenne, les taux sont significativement différents en fonction d'un critère donné mais également si la répartition de ces taux est équivalente dans les deux populations étudiées. Deux moyennes de taux d'anticorps peuvent être analogues, alors que la répartition des taux peut être différente et inversement.

L'étude quantitative des anticorps anti-T. cruzi des chagasiques de Chiwisivi, Camiri, Salinas, montre une différence notable entre les populations de Salinas et de Chiwisivi pour les 3 techniques. Les chagasiques de Salinas présentent en IMF un nombre d'individus avec des taux $\geq 1/160$ significativement plus élevé qu'à Chiwisivi, en RFC la moyenne des taux et le nombre d'individus avec des taux $\geq 1/16$ est également plus élevé enfin en ELISA le nombre d'individus avec des taux $\geq 0,40$ est significativement plus grand.

Dans la mesure où de façon isolée une technique donne des résultats significativement différents pour l'une des deux méthodes

statistiques aucune interprétation ne peut être faite. Dans le cas précédent, l'ensemble des trois techniques marquent la différence entre les taux des anticorps des sérums de Chiwisivi et de Salinas.

Les populations de Chiwisivi et Salinas sont formées d'agriculteurs, qui font partie de communautés paysannes isolées de tout centre médical et la sélection a été faite au hasard. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une enquête épidémiologique, le nombre de personnes chagasiques dans ces deux endroits donne une idée des taux d'endémicité. Le nombre de chagasiques (sérologie positive) à Salinas est significativement plus élevé qu'à Chiwisivi. D'autre part les données épidémiologiques du Ministère Bolivien de la Santé (enquête épidémiologique, 1980 ; Dr Valencia) nous montre que le nombre de réduves infectées par maison est plus élevé à Salinas qu'à Chiwisivi.

Les habitants de Salinas seraient plus fréquemment réinfectés et il est possible qu'un état de réinfection permanent augmente la réponse humorale spécifique. Il est aussi possible que des souches différentes de T. cruzi provoquent des réponses humorales plus ou moins fortes. Notons cependant qu'il n'y a pas de différence significative des taux des anticorps entre les populations de Chiwisivi et celle de Camiri, composée de patients infectés dans la même région que Salinas. La comparaison de ces deux populations reste difficile dans la mesure où l'une est citadine et l'autre paysanne.

Les personnes examinées à Camiri faisaient partie du personnel de l'hôpital ou de personnes de la ville répondant à un appel radiophonique. Une sélection c'est ainsi effectuée et le pourcentage de malades observée n'est pas strictement représentatif du taux d'endémicité dans la ville, il n'a qu'une valeur orientatrice.

de T. cruzi, dans des techniques d'ELISA éliminerait les réactions croisées avec les sérums de leishmaniens ou d'infection par T. rangeli. Le diagnostic immunologique du dosage des anticorps anti-T. cruzi serait alors sensible et spécifique.

V. ANALYSE QUANTITATIVE DE LA REPOSE IMMUNE HUMORALE ANTI-T. CRUZI

Les trois techniques d'IMF, de RFC et d'ELISA, permettent un dosage quantitatif des anticorps anti-T. cruzi. Le calcul des droites de corrélation montre (figure n°11) qu'elles sont proportionnelles et présentent des indices de corrélation plus ou moins grands. Certains sérums présentent toutefois des taux élevés ou faibles en anticorps pour seulement une technique.

Ce résultat n'est pas surprenant car chaque technique fait appel en plus d'une spécificité anticorps, à une propriété physicochimique différente.

L'immunofluorescence utilise un antigène figuré (le parasite) et indépendamment du mode de fixation de l'antigène, elle dose des anticorps capables de réagir directement avec le parasite fixé. La réaction de fixation du complément nécessite des anticorps anti-T. cruzi capables de fixer le complément. Tandon et al. (1979) adaptent un test enzymatique à la RFC en utilisant comme conjugué, un sérum anti-C₃ (CELISA = Complement Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ; ils comparent les taux des anticorps obtenus par cette technique, avec ceux obtenus par les techniques de RFC, d'hémagglutination et d'ELISA. Ils obtiennent la meilleure corrélation entre les techniques de RFC et de CELISA avec une plus grande sensibilité de cette dernière comparée à la précédente.

Les techniques d'ELISA et de CELISA donnent des résultats

La comparaison des âges moyens des populations a montré que celle de Salinas est significativement plus jeune que les autres. Le tableau ci-dessous présente les taux des anticorps chez des chagasiques de Chiwisivi en fonction de l'âge.

Chagasiques de Chiwisivi	Effectif	IMF		ELISA	
		moyenne	% $\geq 1/160$	moyenne	% $\geq 0,40$
20 - 30 ans	21	2,26 \pm 0,33	76,2	0,41 \pm 0,09	71,4
45 ans et plus	24	2,17 \pm 0,38	62,5	0,40 \pm 0,09	45,8

Il n'y a pas de différence significative en IMF par contre, le nombre d'individus avec des taux $\geq 0,40$ en ELISA est significativement plus grand ($p < 0,05$) pour la classe d'individus la plus jeune.

Ce résultat ne permet pas de conclure de façon catégorique que le taux des anticorps est plus élevé chez des chagasiques jeunes.

Enfin, ces deux populations habitent à des altitudes différentes (2500 m, 800 m), mais l'hypothèse d'une immunosuppression due à l'altitude n'est pas vérifiée car d'une part les patients de Camiri (800 m) ne présentent pas des taux d'anticorps significativement différents de ceux de Chiwisivi (2500 m) et aucune différence notable ne se dégage entre la population de La Paz (3500 m) et Camiri, Salinas (800 m) plutôt qu'entre La Paz et Chiwisivi (2500 m).

Le deuxième point analysé est celui du rapport entre le taux des anticorps et le xénodiagnostic. Parmi les patients examinés à La Paz, 61 % présentent un xénodiagnostic positif et parmi eux quelques chagasiques n'ayant jamais voyagé dans des zones endémiques depuis plus de 10 ans présentent également un xénodiagnostic positif. Dans la mesure où un xénodiagnostic positif n'est pas le fait d'un hasard mais significatif d'une augmentation des parasites circulants, nous pouvons dire que, indépendamment de réinfections, la parasitémie se manifesterait par vagues au cours de la phase chronique de l'infection. Cette hypothèse reste à confirmer.

La comparaison des taux des anticorps chez des patients avec un xénodiagnostic positif ou négatif montre en IMF et RFC un nombre significativement plus grand d'individus avec un taux supérieur à $\geq 1/160$ et $\geq 1/16$ et présentant un xénodiagnostic positif; en ELISA le taux moyen des anticorps est significativement plus élevé. Pour chaque technique, soit la moyenne générale des taux soit la répartition des taux, marquent la différence entre les patients avec un xénodiagnostic positif ou négatif et le taux des anticorps anti-T. cruzi des patients avec un xénodiagnostic positif peut être considéré comme significativement plus élevé que celui des patients avec un xénodiagnostic négatif. L'apparition de trypomastigotes au cours de la phase chronique susciterait une synthèse d'anticorps spécifiques qui permettrait peut être le contrôle de cette parasitémie mais la mise en évidence d'un facteur immunologique témoin de la parasitémie comme un antigène circulant permettrait une meilleure approche.

Le deuxième point analysé est celui du rapport entre la pathologie et le taux des anticorps. Si les taux des anticorps ont un rapport probable avec l'endémicité et la parasitémie, ils n'en ont aucun avec la pathologie cardiaque ou gastrique. Dans le cas de pathologie mixte, nous observons une différence significative du taux moyen des anticorps comparé aux asymptoma-

tiques en ELISA seulement, mais le groupe de patients avec une pathologie mixte est très réduit et cette étude mérite d'être poursuivie.

La pathologie de la maladie de Chagas ayant une origine probablement auto-immune, il est logique de ne trouver aucune corrélation entre les anticorps spécifiques et la pathologie.

VI. ETUDE QUALITATIVE DE LA REPONSE HUMORALE ANTI-T. CRUZI

Les résultats exposés dans le chapitre précédent montrent d'une part que les anticorps anti-antigène 5, identifiés dans le sérum de chagasiques par la technique de double diffusion en gel, se rencontrent dans un grand pourcentage de sérums de chagasiques en phase chronique de l'infection (Chiwisivi : 63,93 % ; Camiri : 78,02 % ; Salinas : 86,66 % ; La Paz : 77,3 %) et d'autre part, parmi les 6 types d'anticorps sélectionnées, par leur localisation immunoélectrophorétique, les anticorps anti-antigène 5 sont majeurs.

La fraction 5 est donc très immunogène dans l'infection humaine. Comme nous l'avons cité dans le chapitre de la présentation du sujet, cette fraction est spécifique de T. cruzi (Afchain, 1976). Cette propriété importante présente un intérêt diagnostique évident étant donné l'immunogénicité de cette fraction au cours de l'infection humaine (mais l'intérêt fonctionnel de ces anticorps est encore à l'état d'hypothèses). Quelle place tiennent les anticorps anti-antigène 5 dans la protection de l'infection provoquée par des transferts expérimentaux de sérum ?

Snary et al. (1979) isolent un antigène de T. cruzi d'un poids moléculaire 90 000, glycoprotéinique, que Afchain identifierait comme la fraction 5. Cette fraction 90 000, protège de la phase aiguë de l'infection, des souris infectées par T. cruzi (Scott et al., 1979). L'antigène 5 aurait peut-être un certain rôle vaccinant en suscitant probablement une immunité de type humorale capable de contrôler la parasitémie. Ces animaux

ne sont pas protégés contre la phase chronique mais le protocole expérimental de vaccination des souris est peut-être en cause.

Existe-t-il une corrélation entre le taux des anticorps anti-T. cruzi et la présence d'anticorps anti-antigène 5 majeur. Les résultats sont contradictoires. En effet, si les sérums de chagasiques de Camiri, avec des anticorps anti-antigène 5, présentent pour les trois techniques (IMF, RFC, ELISA) des taux d'anticorps significativement plus élevés, ce n'est pas le cas des sérums de chagasiques de Chiwivisi et de La Paz. La technique de double diffusion en gel utilisée est plus sensible et n'est pas une technique de dosage quantitatif, ce qui peut expliquer les résultats discordants. La présence d'anticorps anti-antigène 5 n'est pas non plus en rapport avec le xénodiagnostic.

L'antigène 5 n'est pas spécifique de stade et les formes amastigotes intracellulaires pourraient être directement, ou par l'intermédiaire d'antigène circulant, responsable de la production d'anticorps; les antigènes complexés mis en évidence dans les sérums de chagasiques en phase aiguë ou chronique de l'infection ne correspondent pas à la fraction 5. signalons que nous avons retrouvé la fraction antigénique 5 dans le surnageant de milieux de culture de 8 jours obtenu après centrifugation à 2000, 4000, 10 000, 18 000 t/min, suivie d'une filtration sur membrane millipore (1,2 μ) et concentration sur une membrane amicon (XM 50) et testés contre un hyperimmunsérum total, un sérum anti-antigène 5 et des sérums humains présentant des anticorps anti-antigène 5. La lyse de formes de culture épimastigotes est réduite à 8 jours et il est possible que l'antigène 5 soit libéré dans le milieu de culture indépendamment de cette lyse ; ce résultat est un argument en faveur de sa nature circulante in vivo.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la présence d'anticorps anti-antigène 5 et la pathologie de la maladie de Chagas. Martin et al. (1981, communication personnelle) signalent une faible incidence des anticorps anti-antigène 5 dans le sérum de patients en phase aiguë de l'infection (20 %). La production des anticorps anti-antigène 5 serait tardive ce qui pourrait permettre en phase aiguë, une flambée de la parasitémie et l'induction précoce des mécanismes auto immuns responsables de la pathologie (voir présentation du sujet).

Dans l'hypothèse où les anticorps anti-antigène 5 ont un certain rôle sur le contrôle de la parasitémie, le transfert d'anticorps de la mère au foetus ou de la mère à l'enfant durant la lactation peut avoir un rôle important. Nous avons retrouvé des anticorps anti-antigène 5 dans le sang du cordon ombilical de nouveaux nés ne présentant aucun signe clinique de Chagas congénital et nés de mères infectés.

Une approche préliminaire de l'ensemble de la réponse humorale qualitative a été tentée en sélectionnant 5 anticorps produits lors de l'infection humaine, selon leur position immunoélectrophorétique.

L'antigène correspondant à l'arc cathodique ne serait pas partagé avec T. rangeli. Un arc cathodique de même position immunoélectrophorétique est retrouvé dans une extraction des glycoprotéines (chloroforme, méthanol suivie d'une précipitation à l'éthanol) (Lemesre, communication personnelle).

L'antigène correspondant à l'arc neutre présente la même localisation immunoélectrophorétique que l'arc correspondant à un antigène polysaccharidique de T. cruzi (TCA 20 %). Son analogie avec l'EF facteur (Marcipar et al. 1981) en ferait un antigène spécifique de T. cruzi.

L'antigène cathodique et l'antigène neutre suscitent dans un faible pourcentage de sérums, la production d'anticorps qui n'est dépendante ni du xénodiagnostic, ni de pathologies gastriques non associées, ni

de l'ensemble des pathologies (étude faite sur l'ensemble des malades de La Paz). L'intérêt diagnostique de ces deux antigènes en phase chronique de l'infection est réduit par leur faible immunogénicité. Toutefois, la présence d'antigène circulant leur correspondant doit être recherchée dans le sérum des patients.

La fréquence de l'arc anodique 1 est faible mais elle est supérieure pour les sérums de patients atteints d'une pathologie. 27,6 % et 18,1 % des cardiopathiques de Camiri et de Salinas présentent cet arc, alors que 14 % et 0 % des non cardiopathiques le présentent. D'autre part, seulement 4 % des chagasiques asymptomatiques le présentent alors que 19 % des pathologies gastriques non associées, 42,8 % des cardiopathiques non associées et 40 % des pathologies mixtes présentent cet arc. Les anticorps dirigés contre l'antigène anodique 1 seraient associés à un état pathologique mais ce résultat doit être confirmé sur un plus grand nombre de patients.

Les deux antigènes anodiques 2 et 3 suscitent la production d'anticorps pour près de 50 % des chagasiques en phase chronique, mais il n'y a pas de corrélation entre les fréquences de ces arcs et le xénodiagnostic et la pathologie.

Des antigènes anodiques de localisation semblable sont retrouvés dans l'extraction au chloroforme méthanol suivie d'une précipitation à l'éthanol et dans l'antigène TCA 20 %.

L'approche qualitative de la réponse humorale par l'immunoélectrophorèse est limitée par la sensibilité de la technique mais permet d'orienter des recherches vers l'étude de certaines fractions antigéniques. L'étude de la spécificité de ces fractions, de leur nature, de leur application pour le diagnostic, de leur rôle fonctionnel passé par la purification de ces

fractions. La mosaïque des parasites est si complexe que seules des purifications peuvent permettre une approche rationnelle de l'étude de la réponse immune de l'hôte.

VII. REPOSE HUMORALE AUTOIMMUNE

Nos résultats concernant l'incidence des anticorps EVI dans le sérum de chagasiques chroniques confirment les résultats de Szarfman et al., (1979). Ces anticorps autoimmuns se rencontrent à des titres faibles chez des sujets non infectés et ceci de façon variable selon la population étudiée (Sadiguški, 1979), mais les taux de ces anticorps sont plus élevés chez des patients chagasiques. Parmi les populations boliviennes nous n'observons aucune corrélation entre l'incidence des EVI et la pathologie. Ceci confirme les travaux de Szarfman et al. (1981).

La pathologie de la maladie de Chagas, qu'elle soit cardiaque ou digestive est dépendante du nombre de cellules ganglionnaires détruites au niveau des organes : à partir de 20 % de destruction apparaît une pathologie cardiaque, de 55 % une pathologie du colon, de 85 % une pathologie de l'oesophage (Koberle, 1968). Les anticorps dirigés contre la gaine de Schwann pourraient être impliqués dans des mécanismes de destruction mais Szarfman(1979)montre que ces anticorps sont associés aux EVI et non associés aux états pathologiques de la maladie de Chagas.

La présence de ces autoanticorps peut être expliquée par l'existence de réactions croisées entre des antigènes tissulaires et l'antigène T. cruzi mais le niveau de destruction ganglionnaire ne semble pas dépendre de cette réponse humorale autoimmune.

Plusieurs travaux sont en faveur de la participation de l'immunité cellulaire aux mécanismes de destruction des tissus. Santos-Buch et al. (1974) montrent la destruction de cellules allogéniques de coeur de lapin infectées ou non infectées par des lymphocytes de lapin en phase chronique de l'infection.

Selon Teixeira et al. (1975), l'injection répétée d'antigène T. cruzi à des lapins, provoque des lésions cardiaques semblables à celles provoquées par une infection par T. cruzi. Teixeira et al. (1978) confirment ces résultats au cours de l'infection humaine ; des lymphocytes de patients chagasiques sont capables de lyser in vitro des cellules foetales de coeur non infectées alors que des cellules de rein ne sont pas détruites. Un état d'hypersensibilité de type retardé à des antigènes de tissus est mis en évidence au cours de l'infection humaine (Cossio et al., 1976 ; Teixeira et al., 1974) et Vega et al. (1976) ne montrent aucune relation entre cet état d'hypersensibilité de type retrardé et la présence d'anticorps EVI dans le sérum des patients.

L'état des recherches actuelles encore peu avancé ne permet pas d'écarter la participation de la réponse humorale autoimmune dans les mécanismes responsables de la pathologie mais l'immunité de type cellulaire doit y jouer un rôle important.

CONCLUSION

Les travaux expérimentaux de transferts passifs de sérums, de cytotoxicité anticorps dépendante des formes trypomastigotes et des réactions d'ADCC (Antibody Dependent Cell Cytotoxicity) montrent le rôle important de la réponse immune humorale dans l'infection à T. cruzi. Jusqu'à présent les essais de vaccination, comme les transferts de sérums, protègent aiguë de l'infection par un contrôle de la parasitémie mais aucun travail expérimental ne montre une guérison totale.

La phase chronique est caractérisée par une parasitémie faible ou absente et la réponse humorale anti T. cruzi est en général très importante. La situation immunologique est alors telle, qu'il y a un contrôle des parasites circulants (formes trypomastigotes) sans élimination des formes amastigotes intracellulaires .

La réponse humorale non spécifique n'est pas très importante au cours de la phase chronique. Une augmentation faible des immunoglobulines de classes IgG et IgM est possible, il n'y a pas d'activation du complément.

La réponse humorale spécifique se caractérise par une production importante d'anticorps anti-antigène 5 spécifiques de T. cruzi. La présence de ces anticorps peut donner aux tests immunologiques, utilisés pour le diagnostic; une grande spécificité, ce qui permet d'éliminer les réactions croisées avec les sérums de leishmaniens ou de patients infectés par T. rangeli. Ces anticorps pourraient être impliqués dans les mécanismes humoraux de contrôle de la parasitémie et l'antigène 5 avoir un certain rôle vaccinant. Les IgE spécifiques pourraient également participer aux mécanismes de contrôle de la parasitémie mais leur intérêt diagnostique en phase chronique de l'infection reste réduit.

Par ailleurs, l'existence d'immuns complexes d'origine parasitaire est en faveur de la participation d'antigènes circulants aux mécanismes

d'évasion de la réponse immune: l'isolement et la caractérisation des antigènes correspondants à ces immuns complexes devraient permettre une meilleure connaissance de l'équilibre hôte-parasite, établie au cours de la phase chronique de l'infection.

L'étude qualitative de la réponse humorale nous a permis de sélectionner les fractions antigéniques remarquables très immunogènes au cours de la phase chronique de l'infection; la fraction anodique 1 pourrait être associée à des états pathologiques mais ceci est à confirmer sur un plus grand nombre de cas.

Enfin, la poursuite de l'étude de la réponse humorale passe obligatoirement par la purification de fractions antigéniques.

L'altitude n'a aucune influence sur la qualité et la quantité des anticorps anti T. cruzi produits au cours de la phase chronique. Les variations quantitatives observées, d'une population à une autre, pourraient par contre dépendre d'infections provoquées par des souches différentes. Cette dernière notion de l'existence de souches différentes est déterminante dans l'étude de la maladie. En effet, l'étude de la pathologie en dépend puisque certains travaux montrent une répartition géographique différente des pathologies observées au cours de la maladie de Chagas ; les antigènes intéressés seraient alors des antigènes spécifiques de souches.

L'existence d'antigènes communs entre T. cruzi et des antigènes tissulaires peut être à l'origine de la production d'autoanticorps ; ces autoanticorps ne sont pas associés à des états pathologiques et les mécanismes cellulaires autoimmuns seraient les plus importants. La purification et la caractérisation des antigènes communs reste à faire et doivent être envisagées selon le concept de l'existence de plusieurs souches de T. cruzi.

REFERENCES

REFERENCES

- ABRAHAMSOHN, I.A., KLOETZEL, J.K. (1980). Presence of Trypanosoma cruzi antigen on the surface of both infected and uninfected cells in tissue culture. *Parasitology*, 80 : 147-152.
- AFCHAIN, D. (1976). Le caractère antigénique des Trypanosomatidae hétéroxènes, Trypanosoma (T.) B. gambiense et Leishmania donovani. Thèse de doctorat es-Sciences, Université des Sciences et Techniques de Lille.
- AFCHAIN, D., DESJEUX, P., LAFUENTE, C., LERAY, D., NEYRINCK, J.L., CAPRON, A. (1981). Quantification of specific IgE antibodies to Leishmania braziliensis antigens and serum IgE levels in patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Zeitschrift für Parasitenkunde* (in press).
- AFCHAIN, D., CAPRON, A., PRATA, A. (1970). Les anticorps précipitants dans la trypanosomiase américaine humaine. *Gaz. Méd. Bahia*, 3 : 141-147.
- ALCANTARA, F.G., OLIVEIRA, J.A.M., OLIVEIRA, J.S.M. (1965). Parasimpatico do trato digestivo no camundongo com infecção chagásica aguda experimental. *O Hospital*, 68 : 1189-1199.
- ALVAREZ, M., CERISOLA, J.A., ROHWEDDER, R.W. (1969). Test de inmunofluorescencia para diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasit.*, 23 : 4-9.
- ALVES, M.J.M., COLLI, W. (1975). Glycoproteins from Trypanosoma cruzi : partial purification by gel chromatography. *Febs. Lett.*, 52 : 188-190.
- AMATO NETO, V., DIAS, A.F. (1969). Comentarios sobre caso de transmissão da doença de Chagas por transmissão de sangue e largo período de incubação. *Rev. Soc. Brasil Med. Trop.*, 3 : 273-275.
- ANDRADE, S.G. (1979). Biological characterization of strains of Trypanosoma cruzi. *Anais. Cong. Int. Doença de Chagas (Rio de Janeiro)* p N9-N13.
- ANDRADE, S.G., ANDADE, Z.A. (1966). Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach. *Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo*, 8 : 219-224.

- ANTHONY, R.L., JOHNSON, C.M., SOUSA, O.E. (1979). Use of micro-ELISA for quantitating antibody to Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. Am. J. Trop. Med. Hyg., 28 (6) : 969-973.
- ARAUJO, F.G. (1976). Immunology of Chagas'disease. I. Circulating antigens in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 18 : 433-439.
- ARAUJO, F.G., CHIARI, E., DIAS, J.C.P. (1981). Demonstration of Trypanosoma cruzi antigen in serum from patients with Chagas'disease. Lancet, 8214 : 246-249.
- ARAUJO, F.G., NASCIMENTO, E., MORATO, M.J.F. (1977). Studies on the circulating antigens of Trypanosoma cruzi. Resumos IV. Reuniao Anual sobre Pesquisa Basica em Doença de Chagas, p. 69, Caxambu, MG, Brasil.
- BALDY, S.L., TAKAOKA, L., CHIEFFI, P.P., MOCELIN, A.J., BRANDINA, L. (1979). Doença de chagas por transfusao de sangue em Londrina ? Parana. Relato de dois casos agudos tratados con Nifurtimox. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 21 : 155-159.
- BICE, D.E., ZELEDON, R. (1970). Comparison of infectivity of strains of Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 56 : 663-670.
- BITTENCOURT, A.L., BARBOSA, H.S. (1972a). Incidencia da transmissao da doença de Chagas em abortos. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 14 : 257-259.
- BITTENCOURT, A.L., BARBOSA, H.S., ROCHA, T., SANTOS, I., SODRE, A. (1972b). Incidencia da transmissao congenita da doença de chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 14 : 131-134.
- BOUT, D., DUGIMONT, J.C., FARAG, H., CAPRON, A. (1975). Immunodiagnosis of human parasitic diseases by the Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay. First International Symposium on Immunoenzymatic techniques, INSERM Symposium, Editors : Feldmann et al., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, p. 175-182.
- BOUT, D., CARLIER, Y., CAPRON, A. (1979). Immunodiagnosis of hydatidosis using monospecific immune serum anti-ag 5. Biomedecine, 31 : 214-215.
- BOUT, D., SANTORO, F., CARLIER, Y., BINA, J.C., CAPRON, A. (1977). Circulating immune complexes in schistosomiasis. Immunology, 33 : 17-22.
- BRACK, C. (1968). Elektronenmikroskopisch untersuchungen zum lebeunszyklus von Trypanosoma cruzi. Acta Tropica, 25 (4) : 289-356.
- BRENER, Z. (1973). Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol., 27 : 347-382.

- BRENER, Z., CHIARI, E. (1963). Observações sobre a fase crônica da doença de Chagas experimental no Camundongo. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 5 : 128-132.
- BRUMPT, E. (1912). Le Trypanosoma cruzi évolue chez Cornorhinus megistus, Cimex lectularius, Cimex boueti et Ornithodonus moubata. Cycle évolutif de ce parasite. Bull. Soc. Path. exot., 5 : 360-367.
- BRUMPT, E. (1939). Mode de transmission de la maladie de Chagas. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 17 : 320-
- BUTTERWORTH, A.F., DAVIS, J.R., FRANKS, D., MAHMOUD, A.A.F., DAVID, P.H., STURROCK, R.F., HOUBA, V. (1977). Antibody-dependent eosinophil mediated purified eosinophils. J. Exp. Med., 145 : 136-146.
- CHAGAS, C. (1909). Neue Trypanosomen, T. minasense n. sp., T. cruzi n. sp. Arch. Schiffs. Tropenhyg., 13 : 120-122.
- CHAGAS, C. (1911). Molestia de chagas on tireoidite parazitaria Tipografia Leuzinger, Rio de Janeiro.
- CAMARGO, M.E., AMATO NETO, V. (1974). Anti-T. cruzi antibodies as serological evidence of recent infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 16 : 200-202.
- CAMARGO, M.E., HOSHINO-SHIMIZU, S., MACEDO, V., PERES, B.A., CASTRO, C. (1977). Diagnostico serologico da infeccao humana pelo Trypanosoma cruzi estudo comparativo de testes de fixação do complemento imunofluorescencia, hemaglutinacao e floculacao em 3624 soros. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 19 (4) : 254-260.
- CAPBERN, A., MATTERN, P., PAUTRIZEL, R. (1974). 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.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P. (1977). IgE et immunité. Rev. franç. Allergol., 17 : 75.
- CAPRON, A., DESSAINT, J.P., PESTEL, J. (1982). Complexes immuns et activation des cellules effectrices. in press.
- CAPRON, M., CAPRON, A., TORPIER, G., BAZIN, H., BOUT, D., JOSEPH, M. (1978). Eosinophil-dependent cytotoxicity in rat schistosomiasis. Involvement of IgG2a antibody and role of mast cells. Europ. J. Immunol., 8 : 127.



- CERISOLA, J.A., ALVAREZ, M., BOCK, M., WEGNER, D. (1971). 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.
- CERISOLA, J.A., ROHWEDDER, R.W., DI CORLETO, C. (19). Estimacion de la especificidad de reacciones serologicas para enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasit., 23 : 2-3.
- CERISOLA, J.A., ROSENBAUM, M., LUGONES, H., RABINOVICH, L.B. (1973). Diagnostico de la enfermedad de Chagas. I. Resenas de diagnostico Lepetit, SAQIC, 6 (1), Buenos Aires, Argentina.
- CHAPUIS, Y. (1974). "Enfermedad aguda en la infancia". Primera reunion nacional sobre enfermedad de Chagas. La Paz.
- CHAVES, J., FERRI, R.G., KLIEMANN, A.E., IRULEGUI, I., SOUZA, H.B.W.T. (1979). Complexos imunes circulantes na doenca de Chagas experimental Identificacao de antigenos parasitarios nos complexos. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 21 (2), 77-81.
- COONS, A.H. (1951). Fluorescent antibodies as histochemical tools. Federation Proceeding 2 : 558-559.
- COSSIO, P., DAMILANO, G., VEGA, M.T., LAGUENS, R.P., MECKERT, P.C., DIEZ, C., ARANA, R.M. (1976). In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. Medicina (Buenos Aires), 36 : 287-293.
- COSSIO, P., DIEZ, C., SZARFMAN, A., KREUTZER, E., CANDIOLO, B., ARANA, R.M. (1974). Chagasic cardiopathy : Demonstration of a serum gamma globulin factor with reacts with endocardium and vascular structures. Circulation, 49 : 13-21.
- COSSIO, P., LAGUENS, R.P., KREUTZER, E., DIEZ, C., SEGAL, A., ARANA, R.M. (1977). Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies, chagasic cardiopathy. Am. J. Pathol., 86 (3) : 533-539.
- COURA, J.R. (1966). Contribuicao ao estudio da doenca de chagas no estado da Guanabara. Rev. Brasil. Malariol. Doencas Trop., 18 : 9-98.
- COVER, B., GUTTERIDGE, W.E. (1981). Comparison of drug sensitivation of three strains of T. cruzi inbred A/JAX mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 75 (2) : 274-281.

- DAO, L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guarico, (Venezuela). Formas agudas e cronicas. Observacion sobre enfermedad de Chagas congenita. Revista Policlinica Caracas, 18 : 17-22.
- DARMAN, M. (1941). Multiplication du Trypanosoma cruzi dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la pr emuniton vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. Ann. Parasitol. (Paris), 18 : 166-179.
- DA SILVA, L.H.P. (1959). Observa  es s obre o ciclo do Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 1 : 99-118.
- DAVALO, A.R., GARCIA, J.A., ARANO, R., MOSCOSO, E. (1979). Formas clinicas de la enfermedad de Chagas. Enfermedad de Chagas, p. 319-333, Ed Los Amigos del Libro, Bolivi e.
- DESJEUX, P., QUILICI, M., LA PIERRE, J. (1974). A propos de 113 cas de leishmaniose cutanée et cutanéo-muqueuse observ es en Bolivie. Etude s ero-immunologique de 71 cas. Bull. Soc. Path. Exot., 67 (4) : 387-395.
- DIAS, E. (1934). Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi. Men. Inst. Oswaldo Cruz, 28 : 1-110.
- DIAS, E. (1949). Os riscos de propagacao da doença de Chagas pelos serviços de transfusao de sangue. Bol. Sanit. Panam., 28 : 910-911.
- DIEZ, C., SZARFMAN, A., KREUTZER, E., CANDIOLLO, B., ARANA, R.M., COSSIO, P. (1976). Asociacion entre cardiomiopatia y serologia positiva para tripanosomiasis americana en un area de la Argentina endemica para enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires), 39 : 229-233.
- DOS SANTOS, R.R., HUDSON, L. (1980). Trypanosoma cruzi : binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Parasite immunology, 2 : 1-10.
- DOS SANTOS, R.R., HUDSON, L. (1981). Denervation and the immune response in mice infected with Trypanosoma cruzi. Clin. Exp. Immunol., 44 : 349-354.
- DOS SANTOS, R.R., OLIVEIRA, J.C.R., ROSSI, M.A. (1976). Antibodies to neurons in chronic Chagas' disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 70 : 167.
- DZEBENSKI, T.H. (1974). Exantigen of Trypanosoma cruzi "in vivo". Tropenmed. Parasitol., 25 : 485-491.
- FERREIRA-SANTOS, R. (1961). A peristalsis of the esophagus and colon (megaesophagus and mega-colon) etiologically related to Chagas' disease. Am. J. Dig. Dis., 6 : 700-726.
- FIFE, E.H., KENT, J.F. (1961). Protein and carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58 (9) : 512-517.

- FRUIT, J., AFCHAIN, D., PETITPREZ, A., CAPRON, A. (1970). Trypanosoma cruzi : Localization of a specific antigen on the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. *Exp. Parasitol.*, 45 : 183-189.
- FRUIT, J., MOSCA, W., AFCHAIN, D., YARZABAL, L., SANTORO, F., CAPRON, A. (1979). Circulating immune complexes in human Chagas'disease. *Cong. Int. Doença de Chagas, Rio de Janeiro.*
- FUCHS, A.P., FIORATTI, V.L., MELLO, V.A., BOAINAIN, E. (1980). Diagnostico serologico na doença de chagas estudos comparativo de diferentes tecnicas. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 22 (5) : 242-245.
- GAM, A.A., NEVA, F.A. (1977). Comparison of cell culture with epimastigote antigens of Trypanosoma cruzi. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26 : 47-57.
- GELLER, M., GELLER, M., FLAHERTY, D.K., BLACK, P., CAPANEMA-SOUZA, A.P. (1978a). Serum IgE levels in Giardiasis. *Clin. Allergy*, 8 : 69-71.
- GELLER, M., GELLER, M., FLAHERTY, D.K., BLACK, P., CAPANEMA-SOUZA, A.P. (1978b). Serum IgE levels in amoebiasis. *Clin. Allergy*, 8 : 565-567.
- GELLER, M., GELLER, M., FLAHERTY, D.K., BLACK, P., CAPANEMA-SOUZA, A.P. (1978c). Serum IgE levels in Chagas'disease. *Clin. Allergy*, 8 : 383-385.
- GIROLA, R.G., MILIC, A. (1965). La reaction al inmunofluorescencia en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Segundas Jornadas Entomoe-pidem Argentina Salta.*
- GOBLE, F.C. (1951). Studies on experimental Chagas disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. *J. Parasitol.*, 37 : 408-414.
- GONZALEZ CAPPA, S.M., VATTUONE, N.H., MENES, S., SCHMUNIS, G.A. (1973). Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental Amercian Trypanosomiasis. *Exp. Parasit.*, 34 : 32.
- GOTTLIEB, M. (1977). A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.*, 119 : 465-470.
- GRABAR, P., BURTIN, P. (1964). *Immuno-electrophoretic analysis. Applications to human biological fluids.* Amsterdam, Elsevier, 302 pp.
- GUERREIRO, C., MACHADO, A. (1913). Da reação de Bordet e Gengcoj na molestia de Carlos Chagas como elemento de diagnostico. *Brasil Médico*, 27 : 223-226

- GUIMARAES, M.C.S., CELESTE, B.J., AYRES, E.C., MINEO, J.R., DINIZ, J.M.P. (1981). Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis Kala-Azar, and Chagas'disease : an epimastigote Trypanosoma cruzi antigen able to distinguish between anti-Trypanosoma and anti-Leishmania antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 (5) : 942-947.
- HABERKORN, A., GONNERT, R. (1972). Animal experimental investigations in the activity of Nifurtimox against T. cruzi. Arznein. Forsch., 22 : 1570-1581.
- HANSON, W.L. (1977). Immune response and mechanisms of resistance in Trypanosoma cruzi. Pan. Amer. Health Org., 347 : 22-34.
- HARRIS, W.G., FRIEDMAN, M.J., BRAY, R.S. (1978). Serial measurement of total and parasite-specific IgE in an African population infected with Entamoeba histolytica. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 72 (4) : 427-430.
- HAUSCHKA, T.S. (1949). Persistence of strain. Specific behaviour in two strains of T. cruzi after prolonged transfer through inbred mice. J. Parasitol., 35 : 593-599.
- HAUSCHKA, T.S., GOODWIN, M.B. (1948). T. cruzi endotoxin (K.R.) in treatment of malignant mouse tumor. Sciences, 107 : 600-607.
- HAUSCHKA, T.S., GOODWIN, N.B., PALHQUIST, J., BROWN, E. (1950). Immunological relationship between seven strains of Trypanosoma cruzi and its application in the diagnosis of Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 : 1-16.
- HERBIG-SANDREUTER, A. (1957). Further studies on Trypanosoma rangeli 1920. Acta Trop., 14 : 193-207.
- HOARE, C.A. (1966). The classification of mammalian trypanosomes. Ergeton. Mikrobiol., 39 : 43-57.
- HOSHINO-SHIMIZU, S., CAMARGO, M.E., NAGASSE, T.K. (1978). A stable polysaccharide hemagglutination reagent for the diagnosis of acute or recent Trypanosoma cruzi infections. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 20 : 208-212.
- HOWELLS, R.E., CHIARI, C.A. (1975). Observations on two strains of Trypanosoma cruzi in laboratory mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., 69 : 435-438.

- HUBSCH, R.M., SULSER, A.J., KAGAN, I.G. (1976). Evaluation of an autoimmune type antibody in the sera of patients with Chagas'disease. *J. Parasitol.* 62 (4) : 523-527.
- ISHIZAKI, T. (1973). Fundamental studies on the skin test by parasitic antigens and their application. *Jap. J. Parasitol.*, 22 (I) : 13-33.
- JADIN, J.B., LERAY, D. (1969). Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Méd. Trop.*, 40 : 903-906.
- JADIN, J.B., PIERREUX, G. (1960). Un milieu de culture pour trypanosomatidés. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 40 : 903-906.
- JARETT, E.E. (1973). Reaginic antibodies and helminth infection. *Vet. Rec.*, 93 : 480-483.
- KAPLAN, M.H., MEYESERIAN, M., KUSHNER, I. (1961). Immunologic studies of heart tissue. IV. Serologic reactions with human heart tissue as revealed by immunofluorescent methods. Isoimmune Wasserman and autoimmune reactions. *J. Exp. Med.*, 113 :
- KELSER, R.A. (1937). A complement-fixation test for chagas'disease employing an artificial culture antigen. *Am. J. Trop. Med.*, 16 : 405-415.
- KENT, J.F., FIFE, E.H. (1963). Precise standardization of reagents for complement fixation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12 : 103-116.
- KHROURY, E.L., RITACCO, V., COSSIO, P., LAGUENS, R.P., DIEZ, C., ARANA, R.M. (1979). Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis. *Clin. Exp. Immunol.*, 36 : 8-15.
- KIERSZENBAUM, F., HOWARD, J.G. (1976). Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection : The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.*, 116 (5) :
- KIERSZENBAUM, F., IVANYI, J., BUDZKO, D.B. (1976). Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to Trypanosoma cruzi infection. *Immunology*, 30 (1) :
- KLOETZEL, J., CAMARGO, M. (1976). Immunological typing of Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 18 : 142.
- KLOETZEL, J., CAMARGO, M.E., GIOVANNINIS, V.L. (1975). Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. *J. Protozool.*, 22 : 259-261.

- KÖBERLE, F. (1956). Patogêneses dos "Megas". Rev. Goiana de Med., 2 : 101-110.
- KÖBERLE, F. (1957). Zur lehre von der Herzhypertrophie. Münch med. Münch. 99 : 247-249 & 296-298.
- KÖBERLE, F. (1968). Chagas'disease and Chagas'syndrome : the pathology of American Trypanosomiasis. Adv. Parasitol., 6 : 63-116.
- KÖBERLE, F., ALCANTARA, F.G. (1960). Mecanismo da destruição neuronal do sistema nervoso periférico na moléstia de Chagas. O Hospital (Rio de Janeiro), 57 : 1057-1064.
- KOTOTANI, K., KANBARA, H., FUKUMA, T., NAKABAYASHI, T. (1979). Electron-microscopic observations on lysis of Trypanosoma cruzi epimastigote by normal rabbit serum. Biken. J., 22 (4) : 109-115.
- KRAFT, D., WIDE, L. (1976). Clinical patterns and results of radioallergo-sorbent test (RAST) and skin tests in penicillin allergy. Brit. J. Dermatol., 94 : 593-601.
- KRETTLI, A.V., BRENER, Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J. Immunol., 116 (3) :
- KUHN, R.W., MURNANE, J.E. (1977). Trypanosoma cruzi immune destruction of parasitized mouse fibroblasts "in vitro". Exp. Parasitol. 41 : 66-73.
- LAGUENS, R., COSSIO, P., DIEZ, C., SEGAL, A., VASQUEZ, C., KREUTZER, E. KHOURY, E., ARANA, R.M. (1975). Immunopathologic and morphologic studies of skeletal muscle in Chagas'disease. Am. J. Pathol., 80 (1) : 153-159.
- LAMBERT, P.H., HOUBA, V. (1968). Clin. Exp. Immunol., 26 : 38
- LAMBERT, P.H., BERNEY, M.I., KAZYUMBA, L. (1981). J. Clin. Invest., in press.
- LARAJA, F.S., DIAS, E., NOBREGA, G. (1948). Clinica e terapeutica da doença de Chagas. Rev. Bras. Med., 5 (1) :
- LEDERKREMER, R.M., TANACA, C.T., ALVES, M.J.M., COLLI, W. (1977). Lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi. Eur. J. Biochem., 74 : 263-267.

- LELCHUK, R., DALMASSO, A.P., INGLESINI, C.L., ALVAREZ, M., CERISOLA, J.A. (1970). Immunoglobulin studies in serum of patients with American Trypanosomiasis (Chagas'disease). Clin. Exp. Immunol., 6 : 548-555.
- LENT, H., WYGODZINSKY, P. (1979). Revision of the Triatominae (Hemiptera) Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas'disease. Bull. Am. Mus. Nat.Hist. N.Y., 163 (3) : 123-520.
- Mc. HARDY, N. (1980). Passive protection of mice against infection with Trypanosoma cruzi with plasma : the use of blood- and vector bug-derived trypomastigote challenge. Parasitology, 80 : 471-478.
- MAEKELT, G.A. (1960). Die Komplement bindus reaktion der chagaskrankheit Z. Tropenmed. Parasitol., 11 : 152-168.
- MAEKELT, G.A. (1964). Diagnostico de laboratorio de las triptanosomiasis Americanas. Rev. Venez. Sanid. Asist. Soc., 29 : 1-18.
- MALISSOF., W.M. (1947). The action of the endotoxin of Trypanosoma cruzi (KR) on malignant mouse tumors. Science, 106 : 591-594.
- MARCIPAR, A.J., LENTWOJT, E., SEGARD, E., AFCHAIN, D., FRUIT, J., CAPRON, A. (1981). PNA affinity chromatography of Trypanosoma cruzi glycoproteins. Parasite Immunology, in press.
- MARSDEN, P.D., SEAH, S.K.K., MOTT, K.E., PRATA, A., PLATT, D. (1970). Immunoglobulins in Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 73 : 157-161.
- MARTIN, U., MAIDANA, C., FERNANDEZ, H. (1981) Anticuerpos especificos anti T. cruzi en ninos con enfermedad de Chagas aguda. Medicina, in press.
- MAYER, M., PIFANO, F. (1941). O diagnostico da molestia de Chagas por intradermo-reaccao com cultura de Schizotrypanum cruzi. Bras. Med., 38 (55) : 317-319.
- MAYER, M., ROCHA LIMA, H. (1912). Zur entwicklung von Schizotrypanum cruzi in Säugetiennen. Arch. Schiffs. Tropen. Hyg., 16 : 90-94.
- MAYER, M., ROCHA-LIMA, H. (1914). Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. Arch. Schiffs. Tropen. Hyg., 18 : 101-136.
- MILES, M.A., TOYE, S.C., GODFREY, D.G. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain groups of T. cruzi, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 71 : 217-225.
- MUNIZ, J., FREITAS, G. (1944). Contribuição para o diagnostico da doença de Chagas pelas reações de imunidade. II. Isolamento de polissacari-deos de Schizotripanum cruzi e de outros tripanosomideos, sen comportamentos nas reações de precipitacao, de fixacao do complemento e de hipersensibilidade. Rev. Brasil. Biol., 4 : 421-438.

- MUNIZ, J., FREITAS, G. (1946). Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. *Brasil-Med.*, 60 : 337-341.
- MUNIZ, J., FREITAS, G. (1946). Realização in vitro do ciclo do "Schizotrypanum cruzi". *Rev. Bras. Biol.*, 5 : 563-567.
- NAIR, R.C. (1969). *Fluorescent protein tracing*. Livingstone, Edinburgh and London, 3rd ed.
- NEVA, F.A., GAM, A.A. (1977). A complement fixing antigen from Trypanosoma cruzi grown in cell cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 26 : 37-46.
- NOGUEIRA, N., BIANCO, C., COHN, Z. (1975). Studies of the selective lysis and purification of Trypanosoma cruzi. *J. Exp. Med.*, 142 : 224-229.
- NUSSENZWEIG, V., AMATO NETO, V., MELLONE, O. (1959). Novos datos sobre emprego da violeta de Genciana na profilaxia de transmissao da doença de Chagas por transfusao de sangue. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 55 : 183-188.
- NUSSENZWEIG, J., DEANE, L.M., KLOETZEL, J. (1962). Diversidade na constituição antigênica de amostras de Trypanosoma cruzi isolados do homem e de gambas. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 4 : 409-410.
- NUSSENZWEIG, J., DEANE, L.M., KLOETZEL, J. (1963). Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. *Exp. Parasitol.*, 14 : 221-232.
- NUSSENZWEIG, V., SONNTAG, R., BIANCALANA, A., FREITAS, J.L.P., AMATO NETO, V., KLOETZEL, J. (1953). Ação do corantes tri- fênilmetânicos sobre T. cruzi in vitro. Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissao da doença de Chagas por transfusao de sangue. *O Hospital, Rio de Janeiro*, 44 : 731-744.
- NYDEGGER, V.E., LAMBERT, P.H., GERBER, H., MIESCHER, P.A. (1974). Circulating immune complexes in the serum in systemic lupus erythematosus and in carriers of hepatitis B antigen. Quantitation by binding to radiolabeled Clq. *J. Clin. Invest.*, 54 : 297.
- Pan American Health Organization (1974). Health conditions in the Americas, 1969-1972. *Pan Am. Hlth. Org. Sc. Public*, 287 : 34.
- PELLEGRINO, J., BRENER, Z., JACOMO, R. (1956). A reação de precipitina na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças trop.*, 8 : 247-252.

- PETANA, W.B. (1975). Sensitivity of the indirect fluorescence test for Chagas' disease in large scale serology surveys. Scientific Publ. Pan Am. Hlth. Org., 318 : 289-291.
- PERSON, D.A., LEATHERWOOD, C.M., SHARP, J.T. (1974). Antivascular antibody. Ann. Rheum. Dis., 33 : 371-375.
- PIFANO, C.F. (1960). Evaluacion de los procedimientos de laboratorio empleados en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. Bol. Ofic. Sanit. Pan am., 49 : 563-571.
- PIZZI, P.T. (1962). Inmologia de la enfermedad de Chagas : estado actual del problema. Bol. of. Sanit. Pan am., 51 : 450-464.
- PIZZI, T., RUBIO, M. (1955). Aspectos celulares de la inmunidad en la enfermedad de Chagas. Bol. Chile Parasitol., 10 : 4-9.
- RODRIGUEZ, A.M.R. (1981). Contribution à l'étude de la réponse immune à Trypanosoma cruzi chez le rat Fischer. Thèse de Doctorat de 3ème Cycle. Université des Sciences et Techniques de Lille.
- ROMANA, C. (1935). "Acerca de un simtoma inicial de valor para el diagnostico de la forma aguda de Chagas. La conjuntivis esquizo-tripanosomica unilateral. M.E.P.R.A., 16 (28) :
- ROSENBERG, E.B., OLMAR, S.H., WHALEN, G.E. (1971). Increased circulating IgE in trichinosis. Ann. Intern. Med., 75 : 565-578.
- RUBIO, M. (1956). Actividad litica de sueros normales sobre formas de cultivo y sanguinas de Trypanosoma cruzi. Bol. Chile. Parasitol., 11 : 62-69.
- RURANGIRWA, F.R., TABEL, H., LOSOS, G., TIZARD, I.R. (1980). Hemolytic complement and serum C3 levels in Zebu cattle infected with Trypanosoma congolense and Trypanosoma vivax and the effect of trypanocidal treatment. Infect. Immun., 27 (3) : 832-836.
- SADIGUSKI, J.P. (1979). Tesa de farmacia, San Salvador de Bahia.
- SALEME, A., YANICELLI, G.L., VALPERGA, S.M., ALONSO, E., ERIMBAUE, A., MORENO, A., ZERDAN, A., HATEM, J., TORO, A.G. (1971). Enfermedad de Chagas-Mazza congenita en Tucuman. Arch. Argent. Pediat., 69 : 162-169.
- SANTIAGO, A.R., AFCHAIN, D., CAPRON, A. (1981). Specific antigens of Trypanosoma cruzi amastigotes and Trypomastigotes. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 61 : 369-378.

- SANTOS-BUCH, C.A., TEIXEIRA, A.R.L. (1974). The immunology of experimental Chagas'disease. III. Reaction of allogenic heart cells in vitro. J. Exp. Med., 140 (1) : 38-53.
- SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., COARASA, L., VAINSTOK, C. (1978). Immunoglobulin concentration in treated human acute Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27 : 473-477.
- SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., COARA, L., YANOVSKI, J.F., BULL, A. (1975). El diagnostico de infeccion reciente por T. cruzi. Argentina - Chapadmalal oct., 22-25.
- SCOTT, M.T., SNARY, D. (1979). Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature (London), 282 : 73-74.
- SEGURA, E.L., VASQUEZ, C., BRONSINA, A., CAMPOS, J.M., CERISOLA, J.E., GONZALES-CAPPA, S.H. (1977). Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. II. Flagellar and membrane fraction. J. Protozool. 24 : 540-543.
- SENEKJIE, H.A., LEWIS, R.A. (1944). Diagnosis of leishmaniasis by slide agglutination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57 : 17.
- SHAW, J.J., LAINSON, R. (1974). An immediate intradermal reaction to leishmanial antigen in human cutaneous leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 68 : 168-169.
- SHIRAZI, M.F., HOLMAN, M., HUDSON, K.M., KLAUS, G.G.B., TERRY, R.J. (1980). Complment (C3) levels and the effect of C3 depletion in infections of Trypanosoma brucei in mice, Para. Immunol., 2 : 155-161.
- SIQUEIRA, A.F., FERRIOLI FILHO, CARVALHEIRO, S.R. (1966). Um antígeno splúvel presente no soro de ratos infectados com Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 8 : 148.
- SNARY, D., HUDSON, L. (1979). Trypanosoma cruzi cell surface proteins : identification of one major glycoprotein. Febs Lett., 100 : 166-170.
- SPITZ, E., GELFAND, E.W., SHEFFER, A.L., AUSTEN, K.F. (1972). Serum IgE in clinical immunology and allergy. J. Allergy, 49 : 337-347.
- STORNI, P.D., BOLSI, F.L., YANOVSKY, S.F. (1975). Reaccion de aglutinacion directa para diagnostico de la enfermedad de Chagas. Medicina (Buenos Aires), 35 : 67.
- SZARFMAN, A., COSSIO, P.M., ARANA, R.M., URMAN, J., KRENTZER, E., LAGUENS, R.P., SEGAL, A., COARASA, L. (1975). Immunological and immunopathological studies in congenital Chagas disease. Clin. Immunol. immunopathol., 4 : 489-499.

- SZARFMAN, A., COSSIO, P., DIEZ, C., ARANA, R.M. (1974). Antibodies against endocardium vascular structures and interstitium of striated muscle that cross-react with T. cruzi and T. rhodesiense. J. Parasitol., 60 (6).
- SZARFMAN, A., COSSIO, P., KROURY, E.L., RITACO, V., ARANA, R.H., SCHMUNIS, G.A. (1977). Tissue reacting Ig in children parasitaemic with Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 71 : 453.
- SZARFMAN, A., CARANJA, F.C., SOUZA, W., GALVAO QUINTAO, L., GERECHT, D., SCHMUNIS, G.A. (1978). Tissue reacting antibodies in a rhesus monkey with long-term Trypanosoma cruzi infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27 (4) : 832-834.
- SZARFMAN, A., LUQUETTI, A., RASSI, A., REZENDE, J.M., SCHMUNIS, G.A. (1981). Tissues-reacting immunoglobulins in patients with different clinical forms of Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 30 (1) : 43-46.
- TAIT, T. (1980) Evidence for diploidy and mating in trypanosome. Nature, 287 (9 oct.).
- TALIAFERRO, W.H., PIZZI, T. (1955). Connective tissue reaction in normal and immunised mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Inf. Diseases, 96 : 199-226.
- TANDON, A., ZAHNER, H., LAMMLER, G. (1979). CELISA (Complement-Enzyme Linked Immunosorbent Assay). A new method for the estimation of complement fixing antibodies : its use for Chagas'disease. Tropenmed. Parasitol., 30 : 189-193.
- TEIXEIRA, A.R.L., SANTOS-BUCH, C.A. (1974). The immunology of experimental Chagas'disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunology, 28 : 401-410.
- TEIXEIRA, A.R.L., TEIXEIRA, G., MACEDO, V., PRATA, A. (1978a). Trypanosoma cruzi-sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹C release from human heart cells in Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27 : 1097-1107.
- TEIXEIRA, A.R.L., TEIXEIRA, L., SANTOS-BUCH, C.A. (1975). The immunology of experimental Chagas'disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas'disease in man. Am. J. Pathol., 80 : 163-178.
- TIBAYRENC, M., BRENIERE, F., ECHALAR, L., CARLIER, Y. (1981b). Données iso-enzymatiques pour onze souches boliviennes de Trypanosoma cruzi. Interprétation génétique et calcul de distances. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol., V XIX, n°2 : 129-134.

- TIBAYRENC, M., CARIOU, M.L., SOLIGNAC, M. (1981a). Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres Trypanosoma et Leishmania. Compte-rendus Acad. Sci., in press.
- VATTUONE, N.H., SZARFMAN, A., GONZALES-CAPPA, S.M. (1973). Antibody-response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic Trypanosoma cruzi infections (Chagas'disease). Am. J. Trop. Med. Hyg., 76 : 45-47.
- VATTUONE, N.H., YANOVSKY, J.F. (1971). Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. Exp. Parasitol., 30 : 349-355.
- VEGA, M.T., DAMILANO, G., DIEZ, C. (1976). Leucocyte migration inhibition test with heart antigens in American Trypanosomiasis. J. Parasitol., 62 : 129-130.
- VOLLER, A., DRAPER, C., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A. (1975). Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas'disease. Lancet, 1 : 426-428.
- WELLER, T.H., COONS, A.H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. (.NY.), 86 : 789-794.
- W.H.O. (1960). Technical report series n°202. Chagas'disease report of a study group. Geneva.
- ZELEDON, R., PONCE, C. (1974). A skin test for the diagnosis of Chagas' disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 68 : 414-415.

