

50376
1985
263

50376
1985
263

N° d'ordre 1236

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

THESE

PRÉSENTÉE À L'UNIVERSITÉ DE LILLE I

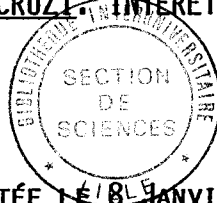
POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR DE 3ÈME CYCLE

EN BIOCHIMIE

PAR

JEAN-LOUP LEMESRE

ETUDE BIOCHIMIQUE DU COMPOSANT "5" SPECIFIQUE DE
TRYPANOSOMA CRUZI, INTERET DIAGNOSTIQUE



PRÉSENTÉE LE 18 JANVIER 1985

DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

JURY : PRÉSIDENT : M.J. MONTREUIL
RAPPORTEURS : M.A. CAPRON
M.Y. CARLIER
EXAMINATEUR : Mlle G. SPIK

A MA FILLE ELODIE,

A MON EPOUSE BRIGITTE, que chaque page de ce travail ne soit
qu'un très modeste témoignage de mon profond amour pour toi.

A MES PARENTS, en témoignage de ma profonde affection.

A MA SOEUR ET A MON FRERE.

A TOUTE MA FAMILLE ET A MES AMIS.

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Immunologie Parasitaire de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude à LA PAZ, en Bolivie, sous la direction du Professeur Yves CARLIER puis du Docteur Philippe DESJEUX.

Il a été poursuivi dans le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, à l'Institut Pasteur de LILLE, sous la direction du Professeur André CAPRON.

Au Professeur Jean MONTREUIL,

Vous me faites le grand honneur de présider le jury de cette Thèse. Je vous en suis infiniment reconnaissant.

Dès le début de mes études universitaires, vous avez guidé mes premiers pas dans la recherche scientifique. Vous m'avez formé à la biochimie et je voudrais que vous trouviez ici le témoignage de mon admiration et de ma vive reconnaissance.

Au Professeur André CAPRON,

Pour m'avoir permis de rédiger cette thèse dans les meilleures conditions et pour m'avoir accueilli avec la plus grande gentillesse au sein de son équipe de recherche, ce qui m'a considérablement facilité l'achèvement de ce travail. Depuis mon retour en France, j'ai pu acquérir dans votre laboratoire de nouvelles connaissances et approfondir ma formation scientifique. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse admiration et de ma vive gratitude.

Au Professeur Geneviève SPIK,

Je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail.

Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma respectueuse
admiration et ma sincère reconnaissance.

A mon Ami, le Professeur Yves CARLIER,
qui a, grâce à son enthousiasme et ses compétences scientifiques, mis
en place le laboratoire d'Immunologie Parasitaire de l'Institut Bolivien
de Biologie d'Altitude et développé le programme de coopération franco-
bolivienne sur la maladie de Chagas. Ses connaissances en matière
d'Immunologie, ses qualités d'analyse, son expérience ainsi que son
esprit fertile ont séduit tous ceux qui, comme moi, ont eu la chance
d'en bénéficier. Il m'a apporté un soutien permanent. Qu'il soit
assuré de ma vive reconnaissance et ma sincère amitié.

A mon Ami, le Docteur Philippe DESJEUX qui a remplacé, durant mon séjour en Bolivie, au poste de co-directeur de l'IBBA, le Professeur Yves CARLIER et a assuré la bonne continuité du programme initial. Ses compétences scientifiques, son dynamisme et ses qualités humaines exceptionnelles, ainsi que la confiance chaleureuse qu'il m'a témoignée lors de ce travail, ont été pour moi un soutien permanent. Qu'il trouve ici un gage de ma très vive reconnaissance et de ma sincère amitié.

A mon Ami, le Docteur es-sciences Daniel AFCHAIN qui a eu la bienveillance de s'intéresser à mon travail et de me diriger dans l'acquisition des connaissances nécessaires à la compréhension des différents aspects parasitologiques et immunologiques de la maladie de Chagas. Son enthousiasme, sa connaissance approfondie de la maladie de Chagas, son sens critique, ont permis de mener cette thèse à sa fin. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de ma sincère amitié.

A tous mes collègues de l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude de la Paz et du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire pour leur constante amitié et leur collaboration efficace.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

- Céleste RODRIGUEZ-QUEVEDO, Ana Maria MANJON, Roxana CARASCO, Hortensia MIGUEZ et Clara CAMACHO pour leur aide très efficace et amicale,

- Marc LOYENS qui, par son dynamisme, ses compétences professionnelles et ses grandes qualités humaines, a contribué très efficacement à la réalisation du présent travail,

- Frédérique Simone BRENIERE qui, par ses qualités de Chercheur, son enthousiasme et sa gentillesse, a apporté une contribution importante à l'élaboration de ce travail,

- Michel TIBAYRENC qui, par sa connaissance approfondie de la maladie de Chagas, son esprit critique et sa disponibilité de discussion d'échanges permanents, m'a beaucoup aidé dans l'acheminement de ce travail,

- Oscar OROZCO qui, lors de son travail réalisé à l'Institut Pasteur de Lille, a produit les anticorps monoclonaux anti-composant 5 et a donc participé activement à la partie appliquée de ce travail,

- Christian DROLEZ qui, avec beaucoup de compétence, a réalisé les travaux photographiques de cette thèse,

- Marie-France MASSARD et Claudine COLSON qui se sont acquittées avec compétence et gentillesse de la frappe et de la mise en forme définitive de cette thèse.

Merci infiniment.

Que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

Je remercie également vivement le Ministère Français des Affaires Etrangères et le Ministère de la Recherche et de l'Industrie (Grant n°PVD/81-L-1423) de m'avoir permis, grâce à son soutien financier, de réaliser ce travail.

Ce travail a aussi bénéficié d'un appui financier du Programme Spécial PNUD/Banque Mondiale/OMS de Recherche et de Formation concernant les Maladies Tropicales.

TABLE DES MATIERES

	Page
INTRODUCTION.....	1
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1. RAPPEL PARASITOLOGIQUE.....	8
1.1. Agent de la maladie.....	8
1.1.1. Taxonomie.....	8
1.1.1.1. Classement des souches selon des caractéristiques morphologiques et biologiques.....	8
1.1.1.2. Classement des souches selon des critères sérologiques.....	10
1.1.1.3. Classement des souches selon des critères biochimiques.....	10
1.2. Cycle évolutif.....	12
1.2.1. Cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire....	12
1.2.1.1. Le vecteur.....	12
1.2.1.2. Cycle évolutif.....	13
1.2.1.3. Mode de transmission.....	13
1.2.2. Cycle évolutif chez l'hôte définitif.....	14
1.2.2.1. Cycle évolutif.....	14
1.2.2.2. Mode de contamination.....	14

2. STRUCTURE ANTIGENIQUE DE <u>T. CRUZI</u>	15
2.1. Antigènes de constitution.....	16
2.1.1. Composants antigéniques somatiques.....	16
2.1.2. Composants antigéniques de surface.....	17
2.2. Antigènes métaboliques - Exoantigènes ou antigènes circulants.....	23
2.3. Conclusion - Complexité antigénique de <u>T. cruzi</u>	25
3. NIVEAU DE SPECIFICITE DES COMPOSANTS ANTIGENIQUES DE <u>T. CRUZI</u>	26
3.1. Antigène hétérospécifique.....	26
3.2. Antigènes parasitaires proprement dits.....	27
3.2.1. Parentés antigéniques avec certains tissus de mammifères.....	27
3.2.2. Relations interspécifiques.....	28
3.2.2.1. Communautés antigéniques.....	28
3.2.2.2. Spécificités d'espèce.....	29
3.2.3. Relations intraspécifiques.....	29
3.2.3.1. Spécificité de stade évolutif.....	29
3.2.3.2. Spécificité de souche.....	31
3.2.3.3. Spécificité de clone.....	31
3.3. Variation antigénique.....	32
4. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS.....	33
4.1. Introduction.....	33
4.2. Diagnostic parasitologique.....	33
4.2.1. Observation directe.....	33
4.2.2. Méthodes indirectes.....	34
4.2.2.1. Hémo-culture.....	34
4.2.2.2. Xénodiagnostic.....	34

(Table des matières - suite)	Page
- 4.3. Diagnostic immunologique.....	35
4.3.1. Réaction de fixation du complément (RFC)....	35
4.3.2. Réactions d'agglutination.....	36
4.3.2.1. Agglutination directe.....	36
4.3.2.2. Agglutination des particules de latex...	37
4.3.2.3. Hémagglutination indirecte.....	37
4.3.3. Techniques d'immunoprécipitation.....	39
4.3.4. Techniques utilisant des anticorps anti- immunoglobulines humaines marqués.....	40
4.3.4.1. Immunofluorescence indirecte (IFI).....	40
4.3.4.2. Technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	41
- 4.4. Spécificité du diagnostic immunologique de la maladie de Chagas.....	43
MATERIEL et METHODES	46
1. ORIGINE DU MATERIEL PARASITAIRE.....	47
1.1. <u>Trypanosoma cruzi</u>	47
1.1.1. Souche Tehuantepec.....	47
1.1.2. Souche Tulahuen.....	47
2. CULTURE IN VITRO DES PARASITES.....	47
2.1. Milieu de culture.....	47
2.2. Entretien des souches en routine et cultures massives.....	49

(Table des matières - suite)	Page
3. RECOLTE DES PARASITES ET PREPARATION DU MATERIEL ANTIGENIQUE.....	49
3.1. Récolte et lavages des parasites.....	50
3.2. Préparation des formes épimastigotes fixées pour la réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI)...	50
3.3. Préparation des extraits antigéniques solubles.....	50
4. SERUMS.....	51
4.1. Obtention d'immunsérums.....	51
4.2. Sérums humains.....	53
4-3 Anticorps monoclonaux	54
5. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES.....	54
5.1. Précipitation en gel.....	54
5.1.1. Double diffusion en gel (D.D.G.).....	55
5.1.2. Immunodiffusion radiale.....	55
5.1.3. Immunoélectrophorèse (I.E.P.).....	57
5.1.4. Immunoélectro-diffusion sur membrane d'acétate de cellulose.....	59
5.3. Immunofluorescence indirecte (IFI).....	62
5.4. Test de compétition ELISA.....	63
6. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.....	66
6.1. Dosage des protéines.....	66
6.2. Dosage des oses neutres.....	67
6.3. Préparation de fractions concentrées de surnageant de milieu de culture.....	67
6.4. Cinétique de culture.....	68

(Table des matières - suite)	Page
6.5. Préparation de fractions antigéniques par extraction chimique.....	68
6.5.1. Extraction phenol 44 % et précipitation à l'éthanol.....	68
6.5.2. Extraction à l'acide trichloracétique 20 et 30 %.....	69
6.5.3. Extraction à l'acide perchlorique 0,2 N.....	69
6.5.4. Extraction chloroforme-méthanol et précipitation à l'éthanol.....	69
6.6. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide SDS-PAGE.....	70
6.7. Chromatographie de tamisage moléculaire (gel filtration).....	71
6.8. Chromatographie d'affinité.....	73
RESULTATS.....	75
1. PURIFICATION DU COMPOSANT 5 A PARTIR DES FORMES EPIMASTIGOTES DE <u>T. CRUZI</u>	76
1.1. Choix d'un extrait antigénique total.....	76
1.1.1. Rendements, contenus en protéines et en glucides.....	77
1.1.2. Analyse polypeptidique.....	77
1.1.3. Analyse antigénique.....	78
1.1.4. Choix d'un extrait antigénique hydrosoluble de formes épimastigotes de <u>T. cruzi</u>	79
1.1.5. Recherche de la présence du composant 5 dans différentes souches de <u>T. cruzi</u>	79

(Table des matières - suite)

Page

1.2. Approche biochimique de la purification du composant 5.....	80
1.2.1. Préparation de fractions enrichies en composant 5.....	80
1.2.1.1. Obtention de fractions antigéniques....	80
1.2.1.2. Analyse antigénique.....	81
1.2.1.3. Analyse physicochimique des différentes fractions enrichies en composant 5.....	82
1.2.1.4. Caractère immunogénique des fractions enrichies en composant 5.....	83
1.2.1.5. Conclusion.....	84
1.2.1.6. Analyse moléculaire de la fraction FEC ₅ .	85
1.2.2. Fractionnement sur colonne de tamisage moléculaire (G75 SF) de la fraction FEC ₅	85
1.2.2.1. Analyse antigénique des différentes fractions obtenues.....	86
1.2.2.2. Analyse biochimique de la fraction IV...	87
1.3. Approche immunochimique de la purification du composant 5.....	88
1.3.1. Sérum anti-antigène 24 Kd.....	88
1.3.2. Isolement du composant 5 par chromatographie d'affinité (Immunoabsorbant).....	88
1.3.3. Analyse du composant 5 isolé à partir de l'extrait EC NaCl.....	89

2. PURIFICATION DU COMPOSANT 5 A PARTIR DU SURNAGEANT DE MILIEU DE CULTURE DE FORMES EPIMASTIGOTES DE <u>T. CRUZI</u>	91
2.1. Préparation de fractions concentrées de SMC.....	91
2.1.1. Rendements obtenus.....	91
2.1.2. Analyse antigénique des fractions U_{50} et U_{10}	92
2.2. Etude qualitative et quantitative de la présence du composant 5 dans la SMC.....	92
2.2.1. Cinétique d'apparition du composant 5 dans le SMC durant le processus de culture.....	93
2.2.2. Dosage du composant 5 au cours de la culture.....	94
2.3. Obtention d'une fraction enrichie en composant 5 à partir de la fraction U_{50}	95
2.3.1. Rendement, contenu en protéines et en glucides.....	95
2.3.2. Analyse antigénique de l'extrait E_{50}	95
2.3.3. Analyse polypeptidique de l'extrait E_{50}	96
2.4. Purification du composant 5 identifié dans le surnageant de milieu de culture par immuno-adsorbition.....	96
2.4.1. Approche de la purification.....	96
2.4.2. Analyse de l' "exoantigène" isolé par chromatographie d'affinité.....	97
3. RECHERCHE DE LA PRESENCE DES ANTICORPS ANTI-COMPOSANT 5 DANS LES SERUMS DE PATIENTS CHAGASIQUES. INTERETS DIAGNOSTIQUES.....	98
3.1. Microdouble diffusion en gel utilisant un sérum polyclonal anti-composant 5.....	98
3.2. Immunoélectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose.....	99

(Table des matières - suite)	Page
3.3. Test de compétition ELISA.....	100
3.3.1. Choix de la source antigénique à utiliser...	101
3.3.2. Etude de la sensibilité du test de compétition ELISA FEC ₅	102
3.3.3. Etude de la spécificité du test de compétition ELISA-FEC ₅	103
3.3.4. Mise en évidence d'infections mixtes (parasitoses associées).....	104
 DISCUSSION et CONCLUSION...	 105
1. COMPLEXITE MOLECULAIRE DU COMPOSANT 5.....	105
2. RELATIONS PHYSICOCIMIQUES ET IMMUNOLOGIQUES ENTRE LES DIFFERENTES MOLECULES MISES EN EVIDENCE.....	110
3. NATURE EXOANTIGENIQUE DU COMPOSANT 5.....	112
4. INTERET DIAGNOSIQUE.....	115
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

RESUME

Un composant antigénique majeur, appelé "5" de par sa localisation immunoélectrophorétique, a été précédemment démontré comme spécifique de Trypanosoma cruzi, ne présentant pas de réactions croisées, vis-à-vis d'autres Trypanosomatidés et provoquant l'apparition précoce d'anticorps précipitants lors d'immunisations expérimentales. Malgré l'intérêt évident de ce composant dans le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas, sa caractérisation biochimique n'avait pas été réalisée. C'est pourquoi notre travail a consisté à tenter différentes approches de la purification du composant 5 de T. cruzi afin d'une part d'en préciser les caractéristiques physicochimiques et d'autre part d'en disposer d'une source suffisamment abondante pour évaluer son intérêt dans le diagnostic immunologique spécifique de la maladie de Chagas.

Pour réaliser ce travail, deux sources antigéniques ont été utilisées:

- Différents extraits antigéniques totaux hydrosolubles, préparés à partir de formes épimastigotes de culture selon des techniques classiques, ont été comparés. Parmi eux, l'extrait antigénique obtenu après lyse des parasites en milieu hypotonique (NaCl 1 %) semblait le mieux préserver les propriétés physicochimiques et antigéniques des molécules qui le composaient ;
- Une autre source abondante de composant 5 est constituée par une fraction de surnageant de milieu de culture, concentrant des molécules ayant des poids moléculaires supérieurs à environ 50 Kd, dans laquelle une quantité non négligeable de composant 5 a pu être mise en évidence.

Des extraits chloroforme-méthanol insoluble et éthanol insoluble ont été respectivement préparés à partir de ces deux sources antigéniques. Ils correspondent à des fractions enrichies en composant 5 à partir des formes épimastigotes (FEC₅) et du surnageant du milieu de culture correspondant (E₅₀).

Le fractionnement de la FEC₅ sur colonne de tamisage moléculaire conduit à l'obtention d'un antigène 5 purifié correspondant à un poids moléculaire de 24 Kd, dont la pureté a été établie selon des critères biochimiques par analyse peptidique en gel de polyacrylamide SDS-PAGE et des critères immunologiques, par immunisation expérimentale chez le lapin. L'antigène 5, ainsi purifié, est constitué essentiellement de protéines. L'exoantigène 5, isolé à partir de l'extrait E₅₀ par immunoabsorption utilisant le sérum polyclonal anti-antigène 24 Kd, est composé d'une molécule majeure de 72 Kd et de deux autres molécules ayant respectivement des poids moléculaires de 51 et 43 Kd. De plus, il contient 62 % de protéines et 38 % de glucides. Ces résultats contradictoires obtenus au niveau du poids moléculaire du composant 5, nous ont conduit à envisager sa purification à partir de l'extrait antigénique total choisi par immunoabsorption utilisant le sérum polyclonal anti-antigène 24 Kd. Cette approche immuno-chimique permet d'isoler une molécule majeure de 72 Kd de trois autres molécules ayant des poids moléculaires respectifs de 90, 51 et 43 Kd. Sa composition en protéines et en glucides est analogue à celle révélée par l'exoantigène 5.

Tous nos résultats concordent donc pour dire que le composant 5 de T. cruzi ne représente pas une entité moléculaire mais correspond à une famille de protéines et/ou de glycoprotéines qui selon la voie de purification mise en jeu et la source antigénique utilisée sont différemment représentées. L'antigène 5 de 24 Kd conserve les propriétés antigéniques et immunogéniques du composant 5. Cette molécule semble correspondre à un produit de clivage de la GP 72.

L'existence de réactions croisées entre les structures antigéniques de T. cruzi et d'autres Trypanosomatidés ainsi que le recouvrement de la distribution géographique de ces infections parasitaires en Amérique du Sud, posent le problème du diagnostic spécifique de la maladie de Chagas.

Connaissant la spécificité du composant 5 pour T. cruzi, nous nous sommes attachés à mettre au point un test sérologique sensible, fondé sur

la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques. Différents tests de précipitation en gel, utilisant le sérum polyclonal anti-antigène 24 Kd, bien que spécifique de T. cruzi, ne se sont pas révélés suffisamment sensibles.

Par contre, l'utilisation de la fraction enrichie en antigène 24 Kd en comparaison avec un extrait antigénique total de T. cruzi, permet d'augmenter la sensibilité d'un test de compétition ELISA utilisant un anticorps monoclonal correspondant (II 190/30) marqué à la phosphatase alcaline. Ainsi nous pouvons proposer un test sérologique spécifique de phase chronique de la maladie avec une sensibilité de 96,6 %. La mise en évidence d'un nombre non négligeable d'infections mixtes, chez des patients leishmaniens et bilharziens provenant de zones géographiques où l'incidence de la maladie de Chagas est soupçonnée ou méconnue, démontre tout l'intérêt de ce test.

INTRODUCTION

La maladie de Chagas est une affection résultant de l'infestation par un protozoaire flagellé, Trypanosoma cruzi . Elle fut découverte en 1909 par Carlos Chagas dans le Minas Gerais (Brésil), à l'occasion d'une enquête épidémiologique sur le paludisme. La maladie est cantonnée au continent américain et plus particulièrement aux pays tropicaux et subtropicaux de l'Amérique du sud. Celle-ci fait partie des six maladies endémiques parasitaires reconnues comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (1981) ; elle arrive en quatrième position. Elle a été signalée dans pratiquement tous les pays d'Amérique du sud et d'Amérique centrale. Aujourd'hui plus de 65 millions de personnes vivent dans des zones d'endémie où existe un risque d'infestation. On estime à au moins 20 millions le nombre d'habitants des zones rurales ou urbaines d'Amérique Latine infesté par T.cruzi . La proportion des sujets infestés se situe entre 5,6 et 35 % de la population totale dans les pays où la prévalence est connue de façon précise. Par exemple, la Bolivie arrive en tête des pays d'Amérique Latine au point de vue de l'endémicité. Au Brésil, on estime à 120 000 cas annuels l'incidence de l'infestation. De plus, la migration des populations vers les zones endémiques, suite à l'effort de colonisation des zones forestières et des basses terres développé par les gouvernements, contribue à l'extension de la maladie.

Le parasite est transmis à l'homme par diverses espèces de triatomés, punaises tropicales hématophages de la famille des Triatomidae . Le cycle de transmission de T.cruzi revêt diverses formes:domestique, péri-domestique et sylvatique. Notamment, l'infestation peut se transmettre par voie congénitale et à l'occasion d'une transfusion sangui-

ne; ce second type de contamination a connu récemment une importance croissante dans les grandes villes où affluent des migrants venus de zones rurales où l'affection sévit à l'état endémique.

On peut distinguer deux phases dans la maladie : la phase aiguë et la phase chronique.

La phase aiguë se caractérise par une parasitémie élevée (où généralement le parasite peut être mis en évidence par observation directe dans une préparation de sang frais) et par la présence du parasite au niveau tissulaire. Sur le plan clinique, elle est marquée par de la fièvre, un malaise général, des adénopathies, une hépatomégalie et une splénomégalie. Comme autres manifestations cliniques de la phase aiguë il faut citer l'œdème de la face ou des membres inférieurs, une myocardite et une méningo-encéphalite qui peut être fatale, spécialement chez le jeune enfant (Romaña, 1935 ; Laranja et al, 1948 ; Koberle, 1968 ; Chapuis, 1974, 1979 ; Davalos et al, 1979). Habituellement, la phase aiguë est complètement terminée au bout de 4 à 8 semaines. Dans 10 % des cas, elle n'est marquée par aucun signe ou symptôme cliniquement décelable.

La phase chronique est caractérisée par une parasitémie faible ou absente (le parasite ne peut être mis en évidence dans le sang que dans 40 à 50 % des cas chez l'homme en utilisant des méthodes de concentration du parasite telles que le xénodiagnostic). A ce stade, le diagnostic parasitologique s'avère donc difficile, même impossible et le recours au diagnostic immunologique s'impose. Sur le plan clinique, la phase chronique peut rester asymptomatique toute la vie ou entraîner de graves lésions dont les formes les plus courantes

sont les suivantes :

- forme cardiaque : elle se manifeste par des troubles du rythme et de la conduction, notamment par un blocage auriculo-ventriculaire et un bloc de branche droit complet. L'insuffisance cardiaque et la mort subite sont les caractéristiques de cette forme de maladie.

- forme digestive : elle se caractérise par un affaiblissement du péristaltisme intestinal et une dilatation de l'oesophage et de la partie inférieure de l'intestin (mégaesophage et mégacolon).

Les mécanismes par lesquels s'installe la phase chronique sont encore mal connus et vraisemblablement multiples (génétique, immunologique et nutritionnel...).

Cependant, il semblerait que les formes cardiaques et digestives de la maladie soient d'origine auto-immunitaire.

Du point de vue pharmacologique, les drogues trypanocides actuellement commercialisées par les firmes pharmaceutiques Roche (Rochagan ou Raçonil) et Bayer (Lampit) ne sont actives que dans environ 50 % des cas aigus et pratiquement inefficaces en phase chronique de la maladie. De plus, elles sont relativement toxiques. Ces arguments justifient l'importance d'une prophylaxie. La meilleure passerait par l'interruption du cycle vecteur-hôte au niveau domestique et au niveau péri-domestique (en faisant usage d'insecticides pour détruire l'insecte vecteur) et par l'amélioration du niveau de vie (modification de l'habitat et une meilleure hygiène générale). Mais les mesures nécessaires pour aboutir à ces résultats sont loin d'avoir été prises dans les pays en voie de développement concernés. La prophylaxie d'avenir

en vue de combattre efficacement la maladie de Chagas semble donc être, comme pour certaines autres parasitoses, la vaccination.

L'intérêt fondamental de disposer de moyen diagnostique immunologique sensible et spécifique de la phase chronique de la maladie de Chagas ainsi que les perspectives d'une prophylaxie, apparaissant de plus en plus comme un moyen efficace de lutter contre la maladie, justifie pleinement l'étude de la structure antigénique de T. cruzi.

L'étude immunostructurale comparative réalisée par Afchain et al. (1973), a permis de mettre en évidence chez les formes épimastigotes de culture de T. cruzi, un composant antigénique majeur très caractéristique de l'espèce que les auteurs ont appelé composant 5 d'après la localisation immunoélectrophorétique de l'arc de précipitation correspondant. Ce composant, décrit comme spécifique de T. cruzi et donc, ne présentant pas de réactions croisées vis-à-vis d'autres Trypanosomatidae étudiés, provoque l'apparition précoce d'anticorps précipitants dans les infections expérimentales et naturelles ainsi que lors d'immunisations chez l'animal (indépendamment des conditions d'immunisation). D'autre part, l'approche de la purification de ce composant réalisée par Afchain et al. (1978) par immunoabsorption n'a pas permis d'obtenir des quantités d'antigène purifié suffisantes et donc d'en faire une application diagnostique.

Le but de notre travail a donc consisté à tenter différentes approches de la purification du composant 5 de T. cruzi afin de disposer d'une source abondante de composant 5 permettant d'évaluer son intérêt dans le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas.

Dans une première partie, après un rappel parasitologique, nous présentons une révision bibliographique concernant la structure antiqénique de T. cruzi ainsi que le diagnostic biologique (parasitologique et immunologique) de la maladie de Chagas.

Après un chapitre consacré au matériel et à la méthodologie utilisée, nous présentons les résultats de nos expériences personnelles concernant :

- 1 - Les approches biochimiques et immunochimiques de la purification du composant 5 à partir des formes épimastigotes de culture, ainsi que sa caractérisation physicochimique ;
- 2 - La détection de ce composant dans le surnageant de milieu de culture correspondant, qui pourrait être une source alternative de composant 5 plus facile à obtenir ; son analyse qualitative et quantitative au cours de la culture ; sa purification et sa caractérisation biochimique
- 3 - L'évaluation des différentes fractions antiqéniques obtenues dans des tests sérologiques de sensibilités croissantes dont l'immunodiffusion en gel d'agarose, l'immunoélectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose et un test de compétition ELISA utilisant un anticorps monoclonal anti-composant 5.

Enfin, la confrontation de nos résultats avec ceux d'autres auteurs nous amènera tout d'abord à discuter d'une part de la structure moléculaire du composant 5 et, d'autre part, de sa présence dans le surnageant de milieu de culture (exoantiqène in vitro), et enfin à proposer une technique sérologique permettant le diagnostic spécifique de la phase chronique de la maladie de Chagas basé sur la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE DES THEMES DE RECHERCHE

1. RAPPEL PARASITOLOGIQUE

1.1. Agent de la maladie

Trypanosoma cruzi (Chagas, 1909), agent de la maladie de Chagas est un protozoaire flagéllé de la famille des Trypanosomatidae, ordre des Kinétoplastidae, classe des Zoomastigophorea.

1.1.1. Taxonomie.

D'après la classification de Hoare (1966) qui divise les trypanosomes en Stercoraria et en Salivaria selon des critères de transmission, T. cruzi fait partie du groupe Stercoraria. Cette classification a été confirmée par les études immunostructurales d'Alchain (1976).

A l'heure actuelle, les études de souches de T. cruzi révèlent de nombreuses variations au sein du taxon T. cruzi selon des critères morphologiques, biologiques, sérologiques et biochimiques.

1.1.1.1. Classement des souches selon des caractéristiques morphologiques et biologiques

La morphologie des parasites dans la circulation périphérique, l'évolution de la parasitémie au cours de l'infection et l'affinité pour certains tissus ont permis d'établir différents classements.

Selon la morphologie des trypomastigotes sanguicoles de l'hôte, Brener et Chiari (1963) et Brener (1973) décrivent deux types principaux, à savoir:

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

En fonction de l'évolution de la parasitémie, Brener (1965) démontre que selon les souches de T. cruzi, la distribution de ces différentes formes au cours de l'infection diffère. Par exemple, pour la souche Y, les formes fines prédominent du début jusqu'à la fin de l'infection. Par contre, pour la souche CL, les formes fines prédominent aux premiers jours de l'infection mais elles sont progressivement remplacées par les formes trapues qui arrivent à constituer 90 % de la population parasitaire. Les formes trapues sont moins infectantes que les formes fines (Howells et Chiari, 1975) mais semblent mieux adaptées à réaliser le cycle évolutif chez le vecteur.

Selon l'affinité pour certains tissus, Taliaferro et Pizzi (1955), Andrade et al (1966) et Bice et al (1970) montrent que les souches n'ont pas la même affinité pour les tissus et les auteurs les classent en myotropes et réticulotropes. Melo et Brener (1978) montrent que la souche Y présente chez l'animal infecté, une affinité particulière pour les macrophages de la rate, du foie et de la moëlle osseuse alors que la souche CL infecte préférentiellement le tissu musculaire.

Plus récemment, selon ces 3 critères, Andrade (1979) établit 3 types parmi les différentes souches de T. cruzi (voir Tableau 1).

Tableau n° 1 : caractéristiques des trois types de souches de T. cruzi classés par Andrade (1979).

Type de souche	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	Souche Y et Péruvienne	São Felipe	Souche CL et Colombienne



1.1.1.2. Classement des souches selon des critères sérologiques

Certains auteurs mettent en évidence, selon les souches, des différences de sensibilité à la réponse immune de l'hôte vertébré. Celles-ci peuvent indiquer l'existence d'une hétérogénéité antigénique entre les différentes souches. Mais aucune preuve directe n'a été rapportée.

Nussenzweig et al (1962, 1963) décrivent à partir de 36 souches de T. cruzi trois sérotypes en étudiant la capacité d'agglutination des parasites par un sérum d'animal infecté. Ces trois sérotypes ne sont associés ni à une pathogénicité particulière, ni à une distribution géographique donnée (Nussenzweig et Goble, 1966). Krettli et Brener (1976) classent également les souches en trois types en utilisant un test d'agglutination des formes trypanomastigotes sanguicoles in vitro et des antisérums homologues et hétérologues. Krettli et al. (1980) confirment ces résultats avec deux souches types de T. cruzi : la souche Y et la souche CL.

Kloetzel et Camargo (1976) démontrent en immunofluorescence des différences entre deux souches qui correspondraient à deux des types décrits par Nussenzweig et Goble (1966).

1.1.1.3. Classement des souches selon des critères biochimiques

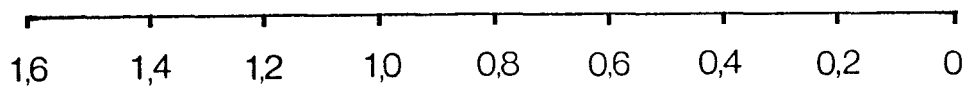
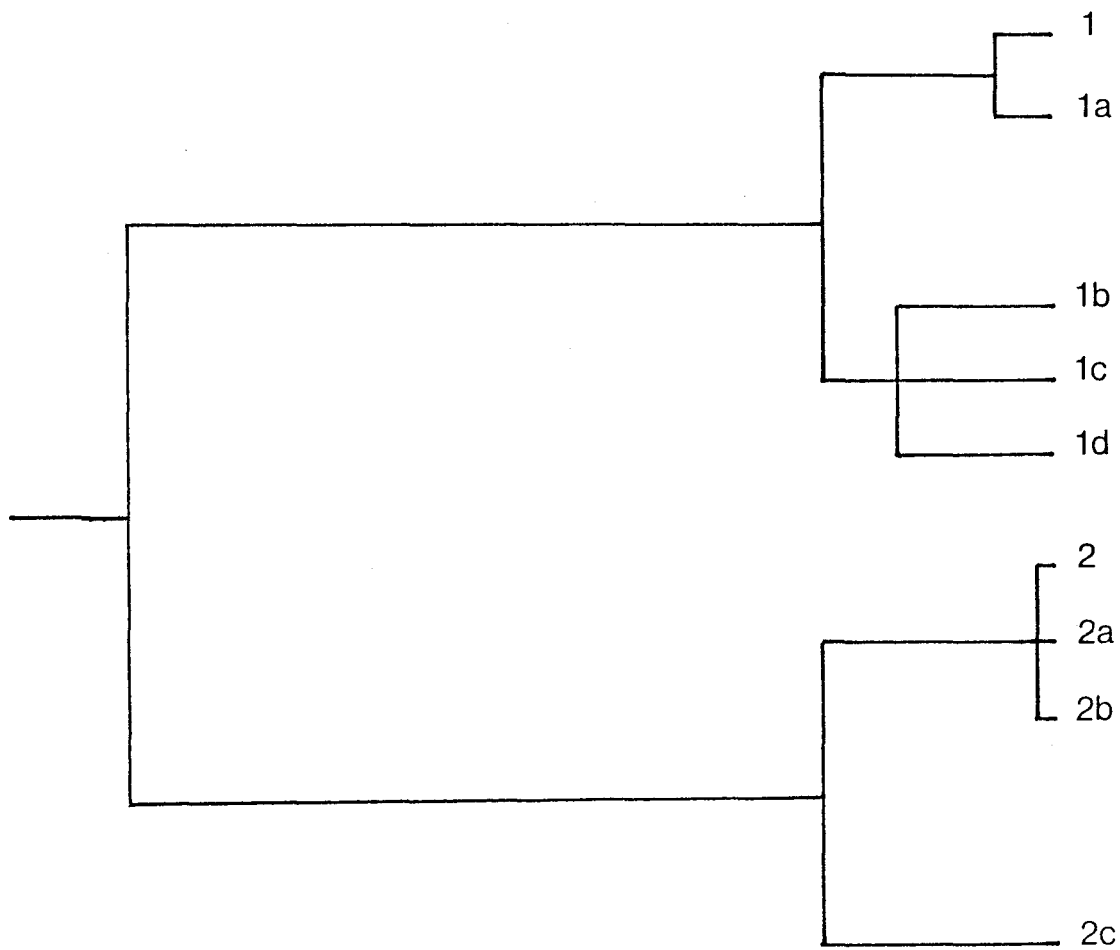
L'analyse comparative, sur différentes souches de T. cruzi, de la mobilité électrophorétique des isoenzymes (enzymes ayant une affinité pour le même substrat, mais possédant une mobilité électrophoré-

tique différente) confirment l'hétérogénéité intraspécifique de cet ensemble de parasites. Les travaux de Miles et al (1980), au Brésil ont permis l'identification de trois groupes majeurs de zymodèmes de T. cruzi. Les calculs de distances génétiques pour 45 isolats boliviens de T. cruzi, provenant de localités aux conditions écologiques variées, ont permis de mettre en évidence l'existence de 2 subdivisions principales du taxon T. cruzi (Tibayrenc et al, 1983). L'hypothèse d'une diploïdie chez ce parasite (Tibayrenc et al, 1981; Lanar et al, 1981) semble pouvoir être étendue à toutes les souches isoenzymatiques du parasite (Lemesre et Tibayrenc, 1983). La figure n°1 représente l'analyse comparative isoenzymatique (Tibayrenc et Miles, 1983) des différents types enzymatiques (brésiliens et boliviens) mis en évidence avec des souches de T. cruzi.

D'autres travaux ont montré que les différentes souches de T. cruzi pouvaient aussi être classées selon le profil de dégradation de leur ADN kinétoplastique (Morel et al, 1980) ou le comportement de leur ADN nucléaire traité par les endonucléases de restriction (Borst et al, 1980).

La classification biochimique du taxon T. cruzi (Zymodèmes et ADN), apporte de nouveaux éléments au problème de la variabilité génétique de ce parasite et ouvre de nouvelles perspectives très importantes du point de vue taxonomique et épidémiologique. Il faut aussi souligner qu'elle ne permet pas de prévoir à priori la distribution parmi les zymosouches de caractères médicaux importants tels que résistance aux drogues, pathogénie ou particularités épidémiologiques.

L'ensemble de ces travaux semble montrer que T. cruzi doit donc



Distances
génétiques*

Figure n° 1 : Dendrogramme de l'analyse isoenzymatique comparative des différents types de souches brésiliennes et boliviennes de Trypanosoma Cruzi (Tibayrenc et Miles, 1983).

- 1 = Souche n° 1 de Bolivie, apparentée au zymodème 1 brésilien et à la souche Tehuantepec.
- 2 = Souche n° 2 de Bolivie.
- 2 a = Variant ne différant de 2 que par 1 allèle = souche Tulahuen = souche CL
- 2 c = Variant proche de la souche Y, apparenté au zymodème 2 brésilien.

* nombre moyen de codons différents par gène entre 2 populations.

être considéré comme un complexe de populations parasites plutôt qu'une espèce homogène et que les classements proposés, encore insuffisants, devraient servir de référence à toutes études appliquées concernant ce parasite.

1.2. CYCLE EVOLUTIF

Le cycle évolutif de T. cruzi se partage entre un insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un mammifère (hôte définitif : l'homme et la plupart des espèces mammifères domestiques et sauvages). Au cours de celui-ci, le parasite se rencontre sous différentes formes (cf. figure n°2).

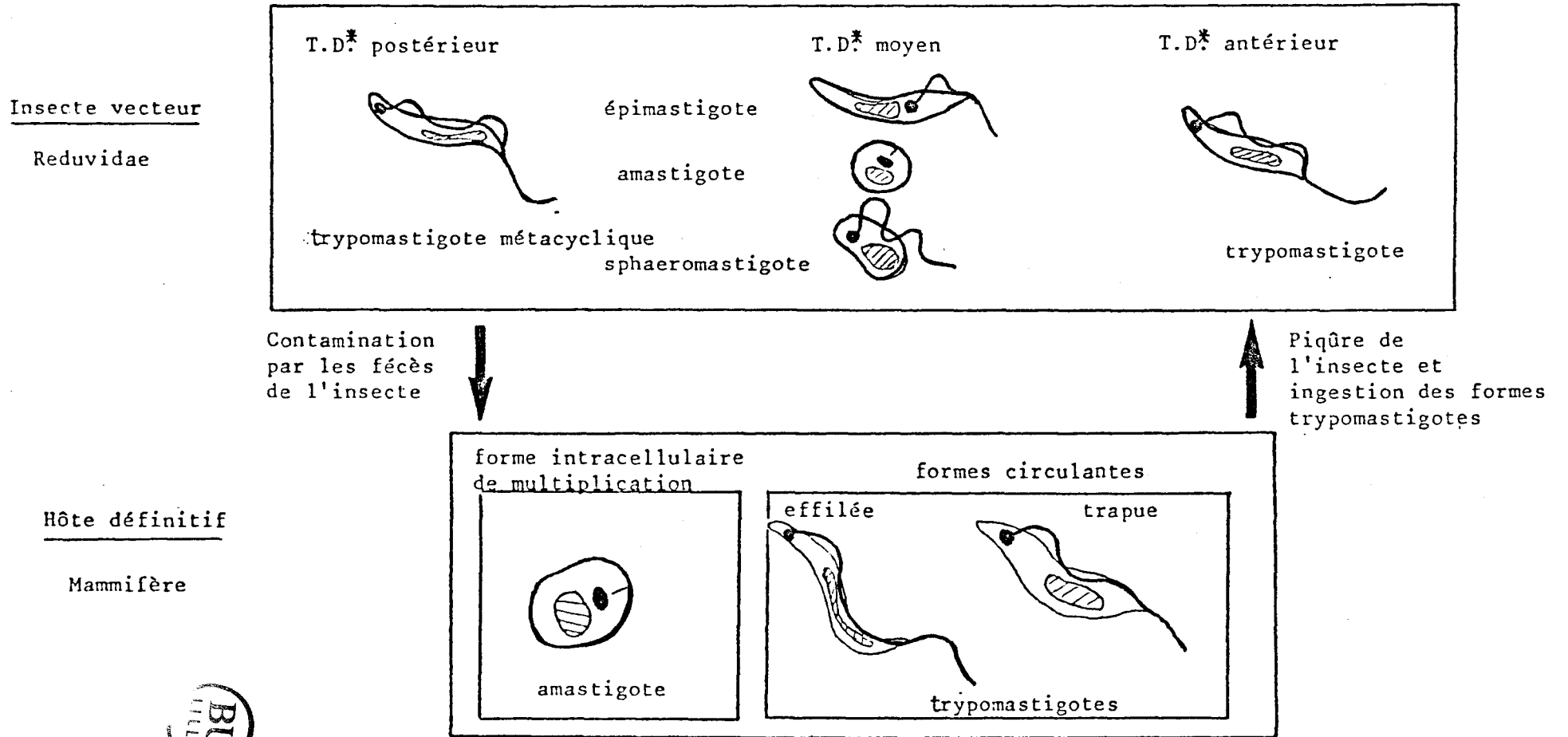
1.2.1. Cycle évolutif chez l'hôte intermédiaire

1.2.1.1. Le vecteur

La maladie de Chagas est transmise par un insecte domestique hématophage : un reduvidé (Triatomidae) dont il existe une centaine d'espèce en Amérique Latine.

Du point de vue épidémiologique, les espèces vectrices les plus importantes qui interviennent dans les cycles de transmission sont Triatoma dimidiata (Mexique et pays d'Amérique Centrale, Ouest de la Colombie, Equateur) ; Triatoma barberi (Mexique) ; Triatoma infestans (Argentine, Bolivie, Brésil, Chili, Nord-Ouest du Paraguay, Sud du Pérou et Vénézuéla) ; Triatoma sordida (Ouest de la Bolivie, Brésil,

Figure n° 2 : Cycle évolutif de Trypanosoma cruzi



* Tube digestif

Nord-Ouest du Paraguay) ; Rhodnius prolixus (Nord-Ouest de la Colombie, Panama, Venezuela) ; Rhodnius pallescens (Panama) ; et Panstrongylus megistus (Brésil) ; la proportion des triatomes naturellement infestés par Trypanosoma cruzi peut atteindre 80 à 100 % (Andrade, 1979).

1.2.1.2. Cycle évolutif

Chez le vecteur, la transmission s'effectue lors de la piqûre par régurgitation du sang de l'hôte infecté. Les trypomastigotes sanguicoles atteignent le tube digestif moyen de l'insecte où ils se transforment en épimastigotes et amastigotes, formes de multiplication non infectantes. Au niveau de la partie terminale du tube digestif moyen les épimastigotes prédominent. Dans le tube digestif postérieur, ils se différencient en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes.

1.2.1.3. Mode de transmission

Lors de la piqûre nocturne ou directement au niveau des muqueuses l'insecte défécite et les formes trypomastigotes métacycliques, contenues dans les fécés sont transmises à l'hôte définitif par contamination.

Du fait de leur médiocre qualité, les matériaux de construction de la plupart des habitations rurales et des bidonvilles de la périphérie des grandes villes d'Amérique Latine constituent un abri idéal

pour la prolifération et le développement des vecteurs. L'environnement péri-domestique (poulaillers et clapiers proches de l'habitation ou même à l'intérieur de celle-ci) entretient également la transmission.

1.2.2. Cycle évolutif chez l'hôte définitif

1.2.2.1. Cycle évolutif

Chez l'hôte définitif, le parasite circule dans le sang périphérique sous la forme trypanostigote sanguicole. Directement exposée aux mécanismes effecteurs de la réponse immune, elle va pénétrer dans certaines cellules et notamment dans les cellules musculaires pour s'y transformer en forme amastigote. Les amastigotes, formes intracellulaires du parasite, vont se multiplier puis se différencier en formes trypanostigotes, qui seront libérées à nouveau dans le sang périphérique après rupture des cellules infectées.

1.2.2.2. Mode de contamination

Le mode de contamination peut se faire par :

- contamination par les fécès de l'insecte vecteur contenant les formes trypanostigotes métacycliques. Celles-ci pénètrent par la peau, les muqueuses buccales, nasales ou conjonctivales ;
- passage du parasite à travers le placenta (Dao, 1949 ; Salemece et al 1971 ; Bittencourt et al , 1972) ;
- transfusion sanguine (Dias, 1949 ; Amato-Neto et Dias, 1969 ;

Coura, 1966 ; Baldy et al. , 1979). L'importance accrue de la transfusion sanguine dans la transmission de la maladie constitue un véritable fardeau en matière de santé publique dans les zones urbaines ; les chiffres concernant le Brésil montrent au'au moins 20 % des donneurs de sang sont parasités (Amato-Néto, 1977). Aussi, cette source de contamination n'est pas négligeable .

2. STRUCTURE ANTIGENIQUE DE T. CRUZI .

D'une manière générale, l'utilisation de protocoles expérimentaux très divers en ce qui concerne la caractérisation, l'isolement et la purification des composants antigéniques de T. cruzi (souche parasitaire, extrait antigénique utilisé, stade de développement du parasite, méthode biochimique et/ou immunochimique), rend difficile la comparaison des résultats obtenus. De plus, le manque de caractérisation complète de beaucoup de composants antigéniques identifiés à partir d'un extrait antigénique total de T. cruzi rend difficile la réalisation d'une classification des structures antigéniques.

En ce qui concerne leur localisation parasitaire, on a longtemps considéré à tort qu'un extrait hydrosoluble total de T. cruzi était plus représentatif des composants antigéniques somatiques. Plus récemment, les nouvelles technologies (marquage de surface, marquage métabolique, production d'anticorps monoclonaux, etc...) ont permis de distinguer les déterminants antigéniques exposés à la surface du parasite de ceux s'exprimant plutôt à l'intérieur de celui-ci.

Concernant leur activité biologique, beaucoup de travaux sont

restés au stade de la caractérisation physicochimique d'un composant antigénique. Par ailleurs, d'autres travaux suggèrent un rôle biologique important d'un composant antigénique décelé sans décrire exactement une entité moléculaire.

Dans un premier temps, nous avons choisi de présenter les différents travaux concernant la structure antigénique de T. cruzi en classant les composants antigéniques parasitaires en antigènes de constitution, constitutifs du corps du parasite, soit cytoplasmiques ou somatiques, soit membranaires ou de surface (interface hôte-parasite privilégié) et en antigènes métaboliques, d'excrétion-sécrétion du parasite, pouvant constituer des exoantigènes ou des antigènes circulants. Dans un deuxième temps, après avoir décrit les connaissances acquises sur la composition antigénique de T. cruzi, nous avons essayé de donner un aperçu des différents niveaux de spécificité des antigènes parasitaires soulignant d'une part l'extrême complexité de la structure antigénique de T. cruzi, déjà révélée dans la première partie, d'autre part la notion d'hétérogénéité antigénique au sein du taxon T. cruzi et enfin l'importance des réactions croisées pouvant exister avec d'autres parasitoses.

2.1. Antigènes de constitution

2.1.1. Composants antigéniques somatiques

En ne tenant pas compte des travaux identifiant des composants antigéniques à partir d'un extrait antigénique total hydrosoluble, où aucune indication quant à la composition et la localisation de ces

antiqènes n'est donnée (Bergendi et al , 1970 ; Gonzalez-Cappa et Kagan, 1973), peu de travaux décrivent la mise en évidence de composants antigéniques somatiques. Seule, une étude détaillée portant sur 6 fractions subcellulaires de formes trypomastigotes et amastigotes, provenant de culture de tissus infectés par T. cruzi (souche Ernestina), a été réalisée par Teixeira et Santos-Buch (1974). Les sérums de lapin immunisés avec la fraction cytosolique, contenant 50 % des protéines de l'homogénat initial, objectivent les plus hauts titres d'anticorps en réaction d'héماغglutination.

2.1.2. Composants antigéniques de surface

L'analyse immunostructurale comparative réalisée par Afchain (1976) a mis en évidence chez T. cruzi un composant antiqénique majeur très caractéristique de l'espèce, appelé composant 5 de par sa localisation immunoélectrophorétique. Il est à souligner que le composant 5 a été défini par rapport à un système précipitant remarquable par son intensité, son aspect bilobé et sa position anodique intermédiaire en immunoélectrophorèse faisant réagir un extrait antiqénique total de forme épimastigote de culture vis-à-vis d'un hyperimmunsérum de lapin homologue. Démontré spécifique de T. cruzi par Afchain et al. (1979) (cf paragraphe 3.2.2.), il suscite l'apparition précoce d'anticorps précipitants chez le lapin et se caractérise par sa remarquable immunogénicité dans les infections expérimentales et naturelles (cf paragraphe 4.3.3.). Le mauvais rendement obtenu lors de la purification du composant 5 par immunoabsorption réalisée par Afchain et al. (1978) n'a pas permis sa caractérisation biochimique. Sa distribution à la surface des formes trypomastigotes sanguicoles et des formes épimastigotes de culture (souche tehuantepec), utilisant un sérum polyclonal anti-composant 5 marqué à la fluorescéine et à la peroxydase, a été démontré par Fruit et al. (1978).

Alves et Colli (1974) observent l'agglutination des formes épimastigotes et trypomastigotes de T. cruzi en présence de concanavale A suggérant l'existence de molécules de nature glucidique à leur surface. En 1975, les mêmes auteurs décrivent la purification partielle et quelques propriétés d'un complexe macro-moléculaire de nature glycoprotéique.

Les travaux de Lederkremer et al (1976, 1977) aboutissent à l'isolement d'un lipopeptidophosphoglycane provenant de ce complexe macromoléculaire. Ce composant antigénique qui inhibe l'agglutination des formes épimastigotes en présence de concanavale A, contient 60 % de glucides (mannose, galactose, glucose dans les proportions 35-22-1), 9,5 % de protéine et 12,6 % d'acide gras. Il se trouve concentré dans la fraction subcellulaire enrichie en fragments membranaires. L'augmentation de l'activité adényl cyclase, détectée dans cette fraction enrichie, suggère une localisation de surface pour ce composant antigénique.

Teixeira et Santos Buch (1974), en plus des travaux déjà mentionnés précédemment, montrent que la réponse humorale à médiation cellulaire la plus importante, induite chez l'animal d'expérimentation (évaluée par l'inhibition de la mobilité des cellules mononucléaires) est observée avec la fraction enrichie en composants antigéniques membranaires.

Cinq fractions subcellulaires, obtenues par centrifugations différentielles de formes épimastigotes (souche Tulahuen) et caractérisés par analyse enzymatique ainsi qu'en microscopie électronique, ont été décrites par Segura et al. (1974, 1977). La fraction enrichie en flagelles confère 90 % de protection lors de l'infection expérimentale chez la souris.

Pereira et al. (1978) isolent deux fractions enrichies flagellaires et membranaires par fractionnements subcellulaires à partir de formes épimastigotes de T. cruzi (souche Y). Les polysaccharides thermorésistants, extraits par le formamide à partir de la fraction enrichie en flagelles, semblent être relatés à des composants de surface.

Marcipar et al. (1981) isolent une fraction glycoprotéinique à partir d'un extrait insoluble de formes épimastigotes. Un composant cathodique majeur, purifié par chromatographie d'affinité utilisant comme ligand la lectine Peanut Agglutinine, révèle une spécificité marquante pour T. cruzi vis-à-vis d'autres Trypanosomatidae (T. rangeli, T. brucei, T. gambiense, L. donovani et L. braziliensis). Ce composant antigénique, présentant un poids moléculaire de 10.000 daltons et de nature polysaccharidique, est présent à la surface des formes épimastigotes et trypomastigotes mais est absent au niveau des formes amastigotes (Afchain, communication personnelle).

Plus récemment, Scharfstein et al. (1983) isolent une glycoprotéine (60 % de protéine et 40 % de glucides) sur colonne de tamisage moléculaire à partir d'un extrait antigénique total de formes épimastigotes préalablement chauffé à 100°C pendant 15 mn. Cet antigène présente un poids moléculaire de 25.000 daltons. Il est présent à la surface du parasite et s'exprime à tous les stades du cycle évolutif de même que chez de nombreuses souches de T. cruzi. De plus, il est reconnu par 96,5 % des sérums de 173 patients chaqasiques chroniques provenant de zones géographiques diverses.

Snary et Hudson (1979) identifient une glycoprotéine majeure de surface, décelable au niveau des différents stades du cycle évolutif parasitaire (souche Y de T. cruzi). Ce composant a été purifié par chromatographie d'affinité utilisant comme ligand la lectine Lens culinaris. La molécule isolée présente un poids moléculaire de 90.000 daltons et contient 18 % de glucides. Scott et Snary (1979) démontrent que cette glycoprotéine majeure de surface est capable de protéger contre les infections léthales. L'injection préalable de 100 µg de cette molécule, en présence de saponine comme adjuvant, protège les souris contre la phase aiguë de l'infection induite par les trypanomastigotes de culture et sanguicoles. Mais l'utilisation d'un autre adjuvant (adjuvant de Freund complet, par exemple) ne permet pas d'induire un tel niveau de protection. Un deuxième antigène protecteur décrit par Snary et al (1981), de nature glycoprotéinique et de localisation de surface n'est décelable qu'au niveau des formes épimastigotes de culture et des formes trypanomastigotes métacycliques (issues du vecteur). La production d'un anticorps monoclonal contre cet antigène a conduit à sa purification et à sa caractérisation biochimique. La molécule isolée présente un poids moléculaire de 72 000 daltons et contient 52 % de glucides. Sa composition en glucides est intéressante puisque aucun résidu d'acide sialique ni de galactosamine n'est détecté alors que trois pentoses différents (ribose, xylose et fucose) le sont. L'injection préalable de 100 µg de cet antigène, en présence de saponine comme adjuvant ne protège pas contre l'infection léthale chez la souris (infection induite par les formes trypanomastigotes sanguicoles ou de culture) mais semble protéger les souris contre la phase aiguë de l'infection induite par les formes métacycliques infectantes (Snary et Ferguson, 1982).

Sher et Snary (1982) décrivent l'inhibition in vitro de la différenciation des formes épimastigotes en formes trypomastigotes métacycliques par les anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre le déterminant antigénique porté par la fraction glucidique du composant ayant un poids moléculaire de 72 000 daltons. D'après les mêmes auteurs, cette molécule, localisée à la surface des formes épimastigotes pourrait être considérée comme un récepteur, contrôlant la différenciation du parasite chez l'insecte vecteur et ainsi réguler la multiplication et l'accumulation des formes épimastigotes dans la partie moyenne du tube digestif de l'hôte intermédiaire.

L'analyse des composants antigéniques de surface réalisés par Nogueira et al. (1981) sur les souches Y et CL de T. cruzi montre que seules les formes trypomastigotes sanguicoles expriment à leur surface une glycoprotéine majeure correspondant à un poids moléculaire de 90 000 daltons et à un point isoélectrique égal à 5. Cette molécule semble donc différente de celle décrite par Snary et Hudson (1979). Ce composant antigénique, absent chez les formes trypomastigote et épimastigotes de culture, pourrait être responsable de l'effet anti-phagocytaire observé avec plusieurs souches de T. cruzi, étant donné sa grande sensibilité à la dégradation par la trypsine (Nogueira et Cohn, 1978 ; Nogueira et al., 1980). Ces mêmes auteurs identifient de la même façon une autre glycoprotéine majeure correspondant à un poids moléculaire de 75 000 daltons et ayant un point isoélectrique de 7,2 qui s'exprime uniquement chez les formes trypomastigotes métacycliques et épimastigotes de culture. Ce composant antigénique est insensible à la dégradation par la trypsine. Nogueira et al. (1982) établit que ces deux glycoprotéines majeures ne présentent aucun polypeptide apparenté à la vue d'une analyse peptidique après

traitement à la trypsine et à la chymotrypsine de ces deux molécules. De plus, aucune relation immunologique entre ces deux composants antigéniques (75 000 et 90 000 daltons) n'est observée.

Zingales et al (1982) observent des différences de profils protéiniques et antigéniques après radioiodination des protéines membranaires des trois formes parasitaires de T. cruzi (épimastigotes, trypomastigotes de culture et trypomastigotes sanguicoles). Deux molécules correspondant à des poids moléculaires de 95 000 et 80 000 daltons sont communes à toutes les formes parasitaires étudiées. Une molécule de poids moléculaire de 70 000-72 000 daltons semble être spécifique des formes épimastigotes de culture. Enfin, une molécule de poids moléculaire de 85 000 est spécifique des formes trypomastigotes sanguicoles. Les auteurs suggèrent ainsi que les antigènes spécifiques des formes trypomastigotes inhiberaient leur pénétration dans les cellules Hela. La molécule de 95 000 daltons pourrait être relationnée à celle de 90 000 daltons décrite par Snary et Hudson (1979) ; la molécule de 80 000 daltons à celle de 75 000 daltons identifiée par Nogueira et al , 1981 ; et la molécule de 70 000-72 000 daltons devrait être équivalente à celle décrite par Snary et al (1980).

Plus récemment, Manso Alver (1983) décrivent la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la surface des formes épimastigotes de culture de T. cruzi , capable d'inhiber leur mobilité et leur synthèse d'acide nucléique in vitro .

2.2. Antigènes métaboliques - Exoantigènes ou antigènes circulants

Dès 1965, Tarrant et al détectent un exoantigène dans le surnageant de milieu de culture de formes épimastigotes de T. cruzi. Mais Gonzales - Cappa et al (1975) ne peuvent confirmer ce résultat, suggérant que le composant antigénique détecté par Tarrant et al n'était pas un exoantigène mais un antigène provenant de la lyse des formes épimastigotes.

Dzbenki (1974) fut le premier à décrire la présence d'un antigène circulant dans le sang de souris infectées par T. cruzi par double-diffusion en gel, immunoélectrophorèse et chromatographie d'affinité. Cet antigène circulant présente un poids moléculaire de 70 000 daltons et n'est pas sans ressemblance avec l'exoantigène décrit chez T. brucei (Siqueira et al, 1966).

Gottlieb (1977) confirme la présence d'antigènes circulants au cours de l'infection expérimentale par T. cruzi. Cet auteur détecte une fraction circulante de nature polysaccharidique dans les sérums d'animaux infectés, grâce à l'utilisation d'un antisérum de lapin préparé à partir d'une fraction polysaccharidique, issue des formes épimastigotes de T. cruzi (souche Y). L'existence d'oses neutres communs (tels que le mannose et le galactose) à cet antigène circulant et au lipopeptidophosphoglycane décrit par Lederkremer et al (1976), suggère la possibilité d'une relation entre ces deux molécules. Cependant, Alves et al (1979) montre que le lipopeptidophosphoglycane n'est pas immunoogénique chez l'animal d'expérimentation. Considérant que cet antigène circulant est précipité par la concanavaleine A, que les parasites présentent des récepteurs pour cette lectine et que finalement des polysaccharides sont identifiés à la surface du parasite par des méthodes cytochimiques, Gottlieb (1977) suggère que cet antigène circulant est plutôt d'origine membranaire.

Araujo (1976) met en évidence des antigènes circulants dans les sérums de souris en phase aiguë de l'infection par des tests de fixation du complément et par immunoélectrosynérèse. Ces composants antigéniques sont aussi détectés chez des souris en phase chronique de l'infection ainsi que chez des patients chagasiques chroniques. Ce même auteur (Araujo, 1982) développe un test immunoenzymatique permettant de détecter, chez la souris et le lapin expérimentalement infectés (souche Y), des antigènes circulants même quand la parasitémie est très faible ou non détectable par un examen direct du sang en microscopie optique. Ces antigènes sont aussi présents dans le surnageant de culture de cellules infectées par T. cruzi. Quatre composants antigéniques détectés dans ce surnageant ne sont pas décelés dans la circulation. Plus récemment, Araujo et al (1982) décrivent quatre anticorps monoclonaux reconnaissant des antigènes circulants dans les sérums de souris infectées par T. cruzi.

Bongertz et al (1981) mettent ainsi en évidence la présence de quatre antigènes circulants dans les sérums de souris expérimentalement infectées par T. cruzi, en double diffusion en gel utilisant des sérums homologues de phase aiguë et de phase chronique de la maladie. 96 % des sérums de patients chagasiques sont positifs en immunoélectrodifusion vis-à-vis d'un sérum de souris en phase aiguë de l'infection et 28 % sont positifs vis-à-vis d'un sérum de souris en phase chronique de l'infection. Un de ces antigènes circulants, détectés dans le surnageant de milieu de culture de formes épimastigotes est aussi identifié dans l'urine de souris et de chien en phase aiguë de l'infection. La caractérisation biochimique de ces antigènes reste encore à réaliser.

Le rôle des antigènes circulants de T. cruzi au cours de l'infection et dans le développement de la maladie n'a pas encore été établi. Par contre, des travaux explorant leur éventuel rôle pathogène, révèlent que certains antigènes circulants sont capables de se lier à la surface des cellules en culture, infestées ou non par les parasites. De nombreux auteurs pensent qu'ils pourraient jouer un rôle dans des phénomènes auto-immuns, comme sites de reconnaissance pour des cellules T cytotoxiques et/ou des anticorps, intervenant ainsi dans la destruction des cellules de l'hôte (Kuhn et Murnane, 1977 ; Texeira et al , 1978 ; Ribeiro dos Santos et Hudson, 1980 ; Araujo, 1982).

2.3. Conclusion

Complexité antiqénique de T. cruzi

Les différents travaux réalisés sur la composition antiqénique de T. cruzi montrent la complexité de la structure antiqénique de ce parasite. Déjà, une analyse immunoélectrophorétique détaillée d'un extrait antigénique soluble de formes épimastigotes de T. cruzi objectivent au moins trente composants antiqéniques vis-à-vis d'un hyper-immunsérum de lapin homologue (Afchain, 1976). Les nouvelles technologies (marquages de surface et biosynthétique, anticorps monoclonaux) permettent actuellement une analyse plus fine de la mosaïque antiqénique de T. cruzi . Elles ont contribué à l'identification et la caractérisation des immunoqènes majeurs (notamment de surface) de T. cruzi et à la mise en évidence de leur rôle important dans l'immu-

nité de la maladie de Chagas. Le degré de cette complexité est accru par la présence de composants antigéniques de niveaux de spécificité variables et par le problème de la modulation de l'expression de certains antigènes par le parasite lui-même (problème de la variation antigénique de surface démontré chez certains protozoaires, mais apparemment absent chez T. cruzi).

3. NIVEAU DE SPECIFICITE DES COMPOSANTS ANTIGENIQUES DE T. CRUZI

Comme chez de nombreux parasites, on distingue chez T. cruzi les structures antigéniques dépourvues de spécificité parasitaire (antigènes hétérospécifiques) des composants antigéniques parasitaires proprement dits. Les antigènes hétérospécifiques sont représentés par des antigènes provenant de l'"environnement" (hôte infecté, milieu de culture) ou des antigènes ubiquistes, correspondant à des composants très largement répandus chez les microorganismes. Parmi les antigènes proprement dits, il est possible d'identifier différents niveaux de spécificité : les parentés antigéniques avec certains tissus de mammifères, les relations interspécifiques et les relations intraspécifiques.

3.1. Antigènes hétérospécifiques

Au niveau des formes épimastigotes et trypomastigotes de culture de T. cruzi, des antigènes en provenance du milieu de culture ont été décelés (Afchain et Capron, 1969 ; Afchain, 1976). Malgré la disparition des contaminants sériques de veau du milieu dans les eaux de lavage lors de la récolte des parasites, les extraits antigéniques

préparés à partir de ces formes de culture contiennent des traces de protéines sériques. Ces dernières sont très immunogéniques chez le lapin lors de la préparation des hyperimmunsérums.

En ce qui concerne les antigènes ubiquitaires, la présence de polysaccharides du type de la substance C dans les extraits antigéniques de T. cruzi, nécessite une incubation préalable des immunoélectrophorégrammes dans un bain de citrate trisodique lors d'études comparatives et diagnostiques. Ceci permet d'éliminer de fausses réactions positives (Biguet et al , 1965 ; Afchain, 1976).

3.2. Antigènes parasitaires proprements dits

3.2.1. Parentés antigéniques avec certains tissus de mammifères

Les travaux de Cossio et al (1974) et de Khoury et al (1979) ont permis de montrer que T. cruzi exprime au moins un déterminant antigénique présent aussi dans certains tissus de mammifères. Malheureusement, la caractérisation biochimique des molécules portant ce déterminant antigénique commun reste encore à établir.

Plus récemment, Wood et al (1982) décrivent un anticorps monoclonal (CE5) qui reconnaît de la même façon un déterminant antigénique exprimé par T. cruzi (souche Y) et des neurones de ganglion dorsal spinal. Cet anticorps monoclonal immunoprécipite plusieurs composants antigéniques parasitaires présentant des poids moléculaire s'échelonnant entre 50 000 et 100 000 daltons. Les populations de neurones reconnues par cet anticorps CE5 sont différentes de celles reconnues

par les sérums "autoimmuns" de malades chagasiques (Khoury et al , 1979). De plus, Scott et al (1982) démontrent que la glycoprotéine protectrice 90 000 daltons n'exprime pas le déterminant antigénique décelable par l'anticorps CE5. Cet argument est en faveur de l'utilisation potentielle de cet antigène 90 000 dans l'immunoprophylaxie de la maladie.

On pense actuellement qu'une bonne partie de la pathologie de la maladie de Chagas pourrait provenir de phénomènes autoimmuns déclenchés par ces déterminants antigéniques présents dans certains tissus de l'hôte (et notamment au niveau cardiaque) en induisant la production d'autoanticorps.

3.2.2. Relations interspécifiques

3.2.2.1. Communautés antigéniques

Au sein de la section Stercoraria , des travaux préliminaires, en immunoélectrophorèse, avaient montré des relations étroites entre T. cruzi et T. vespertilionis (Bice et Zeledon, 1970) au niveau de six composants antigéniques.

Les travaux d'Affchain (1976), étudiant les parentés immunochimiques entre T. cruzi , T. dionisii et T. rangeli montrent que celles-ci intéressent en fait les six dixièmes de leurs composants antigéniques. Le degré d'isologie observé entre ces trois Stercoraria est comparable à celui des trypanosomes salivaria . Ce même auteur a aussi montré que T. cruzi et T. brucei (Trypanosome Africain) partagent entre eux

ainsi qu'avec L. donovani (leishmaniose viscérale) près de quatre dixièmes de leurs structures immunochimiques. L'apparement de T. cruzi - T. brucei est qualitativement et quantitativement plus marqué que leur apparement respectif à L. donovani .

3.2.2.2. Spécificité d'espèce

Les travaux d'Afchain et al. (1979) montrent que quatre dixièmes des composants antigéniques sont spécifiques de T. cruzi comparativement à d'autres Trypanosomatidae .

La spécificité du composant 5 de T. cruzi vis-à-vis d'autres Trypanosomatidae a été démontrée en immunoélectrophorèse en opposant un extrait antigénique total de T. cruzi à un hyperimmunsérum de lapin homologue absorbé respectivement par des extraits antigéniques totaux de T. rangeli , T. donovani , T. dionisi , T. brucei , T. gambiense , L. donovani et L. mexicana et en double diffusion en gel utilisant un sérum polyclonal anti-composant 5 (Afchain et al. , 1979).

Plus récemment, les travaux d'Anthony et al (1981) ont permis l'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques soit de T. cruzi (souche Tulahuen), soit de T. rangeli (souche vénézuélienne); ce résultat confirme donc les différences antigéniques existantes entre ces deux espèces apparentées.

3.2.3. Relations intraspécifiques

3.2.3.1. Spécificité de stade évolutif

Des études comparatives préliminaires, utilisant le test d'immunofluorescence indirecte, ont permis à Kloetzel et al (1975) de sug-

gérer l'existence d'antigènes spécifiques pour chacun des 3 stades de développement du parasite.

Les travaux de Snary et Hudson (1979) analysent la disposition polypeptidique de surface des différents stades du cycle évolutif de T. cruzi. Bien que les profils protéiniques obtenus soient caractéristiques de chaque stade morphologique, aucune protéine spécifique des formes épimastigotes de culture n'a été identifiée. Cependant, des polypeptides spécifiques des formes amastigotes et des formes trypomastigotes, présentant respectivement des poids moléculaires de 30 000 et 180 000 daltons, ont été identifiés.

Les travaux de Santiago et al (1981) révèlent l'existence de composants antigéniques spécifiques de stade de culture amastigote et trypomastigote à 37°C et d'un antigène spécifique des formes amastigotes (formes intracellulaires chez l'hôte vertébré) de localisation de surface.

Plus récemment, les travaux de Campos Neto et al (1982) ont abouti à la production d'anticorps monoclonaux anti- T. cruzi (souche colombienne) présentant une spécificité de stade évolutif. Par chromatographie d'affinité utilisant comme liqand l'anticorps monoclonal correspondant, ils parviennent à séparer les différentes formes parasitaires du cycle évolutif (amastigote, épimastigote, trypomastigote). L'étude des déterminants antigéniques reconnus par ces anticorps monoclonaux est en cours de réalisation.

Parmi les anticorps monoclonaux produits par Araujo et al (1982) et dirigés contre les formes amastigotes et épimastigotes de culture de

T. cruzi (souche Y), certains ne reconnaissent que les formes amastigotes, d'autres sont spécifiques des formes épimastigotes ou reconnaissent des déterminants antigéniques exprimés par les deux formes parasitaires. Là encore, la nature de ces déterminants antigéniques n'est pas révélée.

3.2.3.2. Spécificité de souche

Le fait que T. cruzi puisse être considéré comme un complexe de populations parasitaires, manifestant des comportements biologiques différents, permet de supposer l'existence de déterminants antigéniques spécifiques d'une population parasitaire donnée.

Nussenzweig et al. (1962, 1963) établissent pour la première fois l'existence d'une hétérogénéité antigénique chez différentes souches de T. cruzi d'origine diverse. Deux types A et B ont pu être identifiés, les composants antigéniques spécifiques d'une population parasitaire, qui semblent être des polysaccharides membranaires, présentent entre eux des réactions croisées, suggérant donc une similarité de structure. Les deux types identifiés n'ont aucune relation avec la distribution géographique des populations de parasites étudiées.

3.2.3.3 . Spécificité de clone

Plus récemment, l'analyse comparée en immunoelectrophorèse bidimensionnelle utilisant des hyperimmunsérums de lapin homologues de

deux souches de T. cruzi (Y et Tulahuen) et de 6 clones isolés, révèle l'existence de composants antigéniques spécifiques de clone (Bongertz et Dvorak, 1982). En conséquence, la population des organismes que constitue une souche de T. cruzi est antigéniquement hétérogène.

3.3. Variation antiqénique

Des études portant sur la structure antiqénique des protozoaires ont montré que certaines espèces exprimaient des molécules présentant un phénomène de variation antiqénique. Celui-ci a été décrit largement chez les trypanosomes Africains : T. brucei et T. gambiense (Vickerman et Lucking, 1969 ; Le Ray, 1975), les Babesia (Curnow, 1973) et les Plasmodium (Brown, 1977). En ce qui concerne T. cruzi, il a été postulé que ce parasite subissait aussi une variation antiqénique (Doyle, 1977) alors qu'aucune évidence de cette variation n'a pu être montrée au cours de l'infection (Gonzalez Cappa, 1975) ou pour une glycoprotéine majeure de surface commune à tous les stades de développement du parasite (Snary et Hudson, 1979). Cependant, la diversité des composants de surface, révélés par les stades du cycle évolutif de T. cruzi, permet de confirmer qu'un manteau de nature glycoprotéique rencontré chez les trypanosomes Africains n'existe pas chez T. cruzi (Snary, 1980). Pour l'instant, bien que le problème ne soit pas complètement résolu, aucun des composants antiqéniques, actuellement identifiés, ne présente cette caractéristique de variation antiqénique.

4. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS

4.1. Introduction

Le diagnostic biologique des affections parasitaires, suspectées sur leurs caractéristiques cliniques, repose sur des examens biologiques. La découverte du parasite dans les selles, le sang ou tout autre liquide biologique est bien-entendu, le moyen le plus direct d'affirmer l'existence d'une parasitose. Mais, bien souvent, cette confirmation parasitologique qui doit systématiquement être recherchée s'avère négative, difficile ou impossible. Dans ce cas, les méthodes immunologiques doivent alors prendre le relais.

En phase aiguë de la maladie de Chagas, les parasites circulants sont nombreux et le diagnostic peut reposer sur des méthodes parasitologiques. En phase chronique, la parasitémie est généralement très faible et le recours au diagnostic immunologique est indispensable. Dans la revue bibliographique qui suit, seront discutées la sensibilité et la spécificité des principales techniques utilisées dans le diagnostic parasitologique et immunologique de la maladie de Chagas.

4.2. Diagnostic parasitologique

4.2.1. Observation directe

Pour identifier le parasite dans le sang d'un patient, la technique la plus simple et la plus rapide est l'observation entre lame et lamelle d'une

goutte de sang frais. Mais elle n'est positive qu'en cas de forte parasitémie, exceptionnelle chez les malades.

L'observation directe d'une goutte épaisse de sang, après hémolyse et coloration, permet toutefois d'établir un diagnostic parasitologique dans environ 50 % des cas en phase aiguë (Cerisola et al. , 1974).

4.2.2. Méthodes indirectes

4.2.2.1. Hémoculture

Elle présente un intérêt important car le xénodiagnostic (voir paragraphe 4.2.2.2) est très lourd d'utilisation et tous les laboratoires n'ont pas la capacité de le mener à bien. Le sang du malade est inoculé sur différents milieux de culture dans le but d'obtenir une multiplication parasitaire alors facile à observer. Différents auteurs indiquent que cette technique permet de détecter les parasites circulants chez 40 à 50 % des malades atteints de phase aiguë et seulement 8 % des patients atteints de phase chronique (Cerisola et al. , 1974 ; Mourão et Mello, 1975 ; Chiari et Dias, 1975).

4.2.2.2. Xénodiagnostic

Cette méthode consiste à faire multiplier les parasites provenant du sang d'un patient, chez des triatomes (hôte intermédiaire) non infectés, élevés en laboratoire. Dès 1914, Brumpt préconise ce test diagnostique. De nos jours, il reste le meilleur diagnostic de certitude de la maladie de Chagas. Son emploi est cependant très lourd et nécessite une certaine

standardisation (Salgado et al., 1970). De plus, le résultat ne peut être donné qu'un mois au moins après la réalisation du test (examen des fécès de réduves à 30, 60 et 90 jours). Le xénodiagnostic permet de détecter les parasites circulants dans 40 à 50 % des cas chroniques de la maladie (Maekelt, 1973 ; Coura, 1976) et dans pratiquement 100 % des cas aigus (Cerisola, 1972 ; Schenone et al., 1974).

Le xénodiagnostic est incontestablement le diagnostic parasitologique le plus sensible.

4.3. Diagnostic immunologique .

De nombreuses techniques sérologiques reposant essentiellement sur la détection d'anticorps anti-parasites dans les sérums des patients, ont été mis au point au fil des années.

4.3.1. Réaction de fixation du complément (RFC)

Décrite en 1913 par Guerreiro et Machado, cette technique fut la première utilisée. Elle reste considérée surtout en Amérique du Sud comme la technique de référence dans les laboratoires de diagnostic. Les premières préparations antigéniques utilisées furent des broyats de foie ou de rate de chien infectés (Mayer et Richa Lima, 1914 ; Leão, 1923 ; Patto, 1931). En 1937, Kelser introduit comme nouvelle source antigénique, les formes épimastigotes de culture de T. cruzi , ce qui permit la préparation massive d'extrait antigénique davantage standardisé et ne contenant plus de contaminants provenant de tissus d'hôtes. Différents auteurs s'attachèrent alors à améliorer le test en utilisant différentes préparations

antigéniques à partir de ces formes de culture (Almeida et al. , 1956 ; Maekelt, 1960, 1964 ; Tarrant et al. , 1965 ; Knierim et Saavedra, 1966 ; Fife et Kent, 1960). Ces travaux montrent que la spécificité et la sensibilité du test, sont conditionnées par le choix de la préparation antigénique. L'extrait benzénique hydrosoluble de Maekelt présentait le moins de réactions croisées vis-à-vis d'autres parasitoses. Mais actuellement, la technique de fixation du complément tend à être moins utilisée du fait de sa faible sensibilité par rapport à d'autres tests sérologiques.

4.3.2. Réactions d'agglutination

4.3.2.1. Agglutination directe

Les sérums d'individus parasités réagissent directement avec les formes épimastigotes de T. cruzi produisant une agglutination visible macroscopiquement. Mais des sérums frais de personnes non parasitées avaient aussi un certain pouvoir agglutinant. Seuls, les sérums des patients atteints de phase aiguë de la maladie présentaient un taux d'anticorps agglutinant significativement plus élevé que celui des non chagasiques (Muniz et Freitas, 1946 ; Pifano, 1960 ; Maekelt, 1964). De plus, Senekjie et Lewis (1944) mettaient en évidence l'existence de nombreuses réactions croisées avec des sérums de patients leishmaniens.

Deux types d'amélioration de la technique ont été proposés. Vattuone et Yanovsky (1971) montrent que le traitement enzymatique des formes épimastigotes démasque de nouveaux déterminants antigéniques membranaires qui modifient l'agglutination. Gonzalez Cappa et al. (1973) montrent que les IgM et certains composants sériques comme la protéine C réactive (CRP)

de sérum d'individus non parasités provoquent une réaction d'agglutination, alors que seuls les IgG des sérums de chagasiques étaient responsables de l'agglutination. Ainsi la destruction des IgM du sérum par le 2-mercapto-éthanol (Schmunis et al., 1975 ; Storni et al., 1975) a rendu ce test plus spécifique pour le diagnostic de la maladie de Chagas.

4.3.2.2. Agglutination des particules de latex (sensibilisées avec un extrait antigénique de *T. cruzi*)

Les particules de latex servent ici de support inerte aux composants antigéniques solubles. En présence des anticorps correspondants, la réaction se manifeste par une agglutination visible macroscopiquement.

Ce test d'agglutination aux particules de latex, de part sa simplicité d'utilisation peut être utilisée selon Pellegrino et Katz (1971) pour des enquêtes épidémiologiques mais sa sensibilité et sa spécificité sont inférieures à celles observées avec la technique d'immunofluorescence indirecte (Camargo et al. , 1972) et avec les réactions de fixation du complément et d'hémagglutination indirecte (Baruffa et Alcantara Filho, 1975). De plus, la stabilité de la liaison latex-composants antigéniques n'est pas toujours optimale.

4.3.2.3. Héماغglutination indirecte

Dans certaines conditions, la membrane des globules rouges de mouton peut fixer des composants antigéniques parasites ; ces globules rouges sensibilisés, en présence des anticorps correspondants, s'agglutinent.

Muniz (1950) applique pour la première fois la technique d'héماغglutination indirecte au modèle Trypanosoma cruzi. Il sensibilise directement des globules rouges avec un extrait antigénique polysaccharidique ; mais le test révèle de nombreux faux positifs. Le traitement des globules rouges à l'acide tanique a permis une meilleure adsorption des composants antigéniques à leur surface, améliorant le test de façon importante (Bouisset et al., 1960). Cerisola et al. (1962) introduisent la réaction en routine en sensibilisant les globules rouges, traités à l'acide tanique, par un broyat isotonique de formes épimastigotes de culture. Suivant cette technique, ces auteurs obtiennent 99 % de corrélation avec le test de fixation du complément. La même année, Maekelt montre que le test d'héماغglutination indirecte présente une plus grande spécificité et sensibilité si l'extrait benzénique de T. cruzi est utilisé.

Neal et Miles (1970) expérimentent la spécificité de ce test vis-à-vis d'autres parasitoses à l'aide de sérums de patients atteints de malaria, tuberculose, syphilis et amibiase. Aucune réaction croisée n'est observée. Sur 152 patients cliniquement et parasitologiquement confirmés, utilisant le même test, Camargo et al. (1971) obtiennent 100 % de sensibilité et 98,5 % de spécificité. Dans les travaux du même type, Knierim (1972) trouve pour ce test 98,2 % de sensibilité et 98,8 % de spécificité.

La réaction d'héماغglutination indirecte est encore aujourd'hui très utilisée dans le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas. Elle est sensible et le problème des réactions croisées lors de l'utilisation d'un extrait antigénique total de T. cruzi, peut être limité par le choix d'un titre, seuil de spécificité.

4.3.3. Techniques d'immunoprécipitation

Afchain et al. (1970) proposent l'immunoélectrophorèse comme possibilité de diagnostic de la maladie de Chagas. Les sérums, concentrés trois fois, sont testés contre un extrait antigénique hydrosoluble de T. cruzi (formes épimastigotes de culture). Sur 27 sérums de malades cliniquement et sérologiquement confirmés dont 10 en phase aiguë et 17 en phase chronique, tous objectivement en immunoélectrophorèse des précipitines (1 à 2 arcs en phase aiguë et jusqu'à 9 arcs en phase chronique). La présence relativement constante des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de malades révélait déjà l'importance de ce composant antigénique dans le diagnostic immunologique de la maladie de Chagas (60 % en phase aiguë sur 10 sérums étudiés et 94 % en phase chronique sur 17 sérums analysés).

En 1976, Knight et al. comparent la technique de fixation du complément (RFC) avec le test d'immunoélectro-diffusion (IED) pour la détection d'anticorps circulants dans la maladie de Chagas. Sur 103 sérums étudiés, la comparaison des deux techniques montre que l'IED ne détecte seulement que 77 % de sérums positifs alors que la RFC arrive à un pourcentage de 95 %. La RFC semblerait donc plus sensible que l'IED. Mais ces résultats pourraient aussi indiquer que l'IED est plus spécifique que la RFC, en considérant les faux positifs dus à d'autres parasitoses (leishmaniose, malaria, lèpre, etc...).

D'une manière générale, les techniques d'immunoprécipitation (immuno-diffusion, immunoélectrophorèse, immunoélectrodiffusion) utilisant un extrait antigénique hydrosoluble sont réputées peu sensibles. Mais la concentration du sérum par lyophilisation peut limiter cet inconvénient. Elles sont, par contre, très analytiques, donc très spécifiques, permettant un repérage facile des systèmes précipitants spécifiques.

4.3.4. Techniques utilisant des anticorps anti-immunoglobulines humaines marqués

4.3.4.1. Immunofluorescence indirecte (IFI)

La méthode d'immunofluorescence indirecte, utilisant un antigène figuré (formes épimastigotes fixées), permet un dosage semi-quantitatif des anticorps présents dans un sérum de patient.

Fife et Muschel (1959) sont les premiers à adapter la méthode à T. cruzi. Biaqi et al. (1964) réalisent la technique sur des formes amastigotes contenues dans le myocarde de souris infectées. Les résultats obtenus sur 236 sérums présentent une bonne corrélation avec ceux obtenus par la réaction de fixation du complément. Cerisola et al., en 1970, utilisent des formes épimastigotes de culture fixées comme source antigénique. Ils obtiennent 96 % de corrélation avec la réaction de fixation du complément et une sensibilité de 99 à 100 % pour des sérums de malades chroniques.

De nombreux travaux se sont attachés à comparer la sensibilité de cette technique en fonction de l'évolution de la maladie. Alvarez et al. (1969) montrent une très bonne corrélation entre réaction de fixation du complément et le test d'immunofluorescence indirecte (IFI) pour des sérums de patients atteints de phase chronique. Mais en tout début d'infection, l'IFI est plus sensible et dépiste les cas précoces avant la RFC et la technique d'héماغglutination indirecte. Petana (1975) confirme ces résultats lors d'une enquête épidémiologique réalisée chez des enfants. Camargo et al. (1977) obtiennent également une très bonne corrélation entre RFC et IFI. Une étude sérologique comparative en fonction de la clinique,

réalisée par Fuchs et al. (1980), montre aussi que l'IFI est plus sensible que le RFC (respectivement 95,2 % et 73,1 % de positivité). Mais la spécificité de la RFC semble plus élevée que celle de IFI (respectivement 1,1 % de faux positifs pour 3,7 %).

Plus récemment, l'étude comparative de différentes techniques sérologiques (RFC, ELISA, IEP et IFI) réalisée par Brenière et al. (soumis pour publication) sur 263 sérums de patients provenant de diverses zones endémiques de Bolivie, montre une très bonne corrélation entre ces quatre techniques. 99,9 % de sensibilité relative est obtenue avec la technique d'IFI. Le pourcentage de co-négativité considéré comme un paramètre de la spécificité relative atteint 96,7 %. Il est égal à celui observé avec la RFC, inférieur à celui de l'IEP et supérieur au pourcentage obtenu avec le test ELISA.

La technique d'immunofluorescence indirecte utilisant des antigènes figurés est donc sensible, mais nécessite la détermination d'un titre, seuil de spécificité, pour être interprétée.

4.3.4.2. Technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

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'anticorps marqué entrant dans la réaction.

Voller et al. (1975) montre une très bonne corrélation du test ELISA avec l'IFI. 98 % de patients brésiliens présentent une sérologie positive

en IFI pour T. cruzi et donnent aussi un test ELISA positif (Etude portant sur 124 sérums). Fuchs et al. (1980) confirment ces résultats et les sensibilités respectives obtenues par IFI et l'ELISA sont de 95,2 % et de 98,5 %.

Les travaux d'Anthony et al. (1979) ont consisté à la mise au point d'un test micro ELISA pour le diagnostic de la maladie de Chagas. Les résultats sont comparés avec ceux obtenus en RFC et en IFI. Sur 302 patients 24,5 % sont positifs dans les 3 tests, 29,5 % le sont par la technique ELISA (microméthode), 29,5 % par IFI et 31 % avec la RFC. Ces auteurs confirment donc les résultats obtenus par Voller et al. (1975) et montre aussi la très bonne corrélation existante entre le test ELISA et la RFC.

Brenière et al. (soumis pour publication) comparant la sensibilité et la spécificité de quatre tests sérologiques (IFI, RFC, IEP et ELISA) montrent que le test ELISA utilisant un extrait antigénique soluble de T. cruzi se révèle être la technique la plus sensible (meilleur pourcentage de co-positivité) mais aussi la moins spécifique puisqu'elle présente le plus faible pourcentage de co-négativité.

Guimarães et al. (1981) montrent que le test ELISA, utilisant un extrait salin antigénique de formes épimastigotes de culture, détecte avec la même sensibilité les infections à T. cruzi et donne moins de réactions croisées avec des sérums de leishmaniose cutanéomuqueuse et viscérale que la même technique utilisant l'antigène délipidé standard de Maekelt (1960).

Plus récemment, Schechter et al. (1983) décrivent un test ELISA qui utilise comme source antigénique, la glycoprotéine de 90 000 daltons de poids moléculaire, décrite et purifiée par Snary et Hudson (1979). Celui-ci permet de distinguer les infections à T. cruzi de celles dues à Leishmania Braziliensis Braziliensis et à T. rangeli.

La technique ELISA, de par sa grande sensibilité est de plus en plus utilisée. De plus, elle peut être appliquée en microméthode et automatisée (Carlier et al. , 1979). Mais la très grande sensibilité de cette technique implique un choix rigoureux de la spécificité du matériel antigénique à utiliser, afin d'éviter des réactions faussement positives. Sa faible consommation d'antigène en fait un outil idéal pour l'étude des anticorps contre des antigènes purifiés.

4.4. Spécificité du diagnostic immunologique de la maladie de Chagas

Malgré les très nombreuses techniques sérologiques (cf paragraphe 4.3) dont la sensibilité a été démontrée dans de nombreuses études comparatives (Camargo et al. , 1977, 1979 ; Fuchs et al. , 1980 ; Brenière et al. , soumis pour publication), beaucoup de sérums humains présentant une sérologie positive pour T. cruzi révèlent aussi des réactions positives avec les antigènes d'autres parasites tel que T. rangeli (Anthony et al. , 1979), Leishmania donovani (Camargo et al. , 1966 ; Nery -Guimarães et al. , 1969 Safelder et Mannweiler, 1981 ; Guimarães et al. , 1981) ou L. braziliensis (Chaffee et al. , 1956 ; Duxbury & Sadun, 1964 ; Camargo & Rebonato, 1969 Nery-Guimarães, 1969 ; Gam et Neva, 1977 ; Guimarães et al. , 1981).

Ces résultats peuvent s'expliquer par les différents degrés de réactions croisées existantes entre les structures antigéniques de ces différents parasites et le recouvrement de la distribution géographique des infections parasitaires. En effet, des études immunostructurales réalisées chez T. cruzi montrent que 3/10 de ses composants antigéniques sont communs avec ceux de Leishmania (L. donovani , L. mexicana), 4/10 avec les trypanosomes africains (T. brucei) et 6/10 avec d'autres trypanosomes américains tel que T. rangeli , T. dionisii (Afchain et al. , 1979 ; Bronzina

et al. , 1980 ; Anthony et al. , 1981). De plus, la leishmaniose cutanéomuqueuse (Walton et al. , 1973 ; Desjeux et al. , 1974) ou la leishmaniose viscérale (Desjeux et al. , 1983) et l'infection humaine par T. rangeli (Sousa & Johnson, 1971 ; D'alessandro , 1974 ; Anthony et al. , 1979) ont été rencontrées dans des régions connues pour leur endémicité pour la maladie de Chagas, soulignant la superposition des distributions géographiques de certaines infections à flagellés et donc la possibilité d'infections concomitantes.

C'est pourquoi diverses méthodes ont été proposées pour augmenter la spécificité du diagnostic immunologique de la maladie de Chagas, utilisant :

- d'autres formes parasitaires comme les amastigotes ou les trypomastigotes présentant une meilleure spécificité que les formes épimastigotes (Cerisola et al. , 1971 ; Gam & Neva, 1977 ; Neva & Gam, 1977) ;
- d'autres procédés d'extraction antigénique comme la préparation d'un extrait de formes épimastigotes "vivantes" (Guimarães et al. , 1981) ;
- l'absorption des sérums humains avec des antigènes de parasites présentant des réactions croisées avec T. cruzi (Camargo & Rebonato, 1969) ;
- plus récemment, des antigènes spécifiques purifiés de T. cruzi telle que la GP90 (Schechter et al. , 1983) et l'antigène de 25 000 daltons décrit par Scharfstein et al. (1983). Ces deux tests permettent un diagnostic spécifique de la phase chronique de la maladie de Chagas avec une très bonne sensibilité.

La spécificité du composant 5 vis-à-vis de nombreux trypanosomatidae , (Afchain et al. , 1978, 1979) et le caractère remarquable de son immunogénicité dans les infections naturelles (Afchain et al. , 1970 ; Brenière et al. , soumis pour publication) justifient pleinement l'étude que nous avons

réalisée sur la recherche de la présence des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients infectés par T. cruzi en vue de disposer d'un diagnostic immunologique spécifique de la maladie de Chagas.

MATERIEL ET METHODES

1. ORIGINE DU MATERIEL PARASITAIRE

1.1. Trypanosoma cruzi

1.1.1. Souche Tehuantepec

La souche Tehuantepec de T. cruzi est la souche de référence la plus utilisée dans ce travail. Elle a été isolée en 1938 par E. Brumpt à partir du vecteur Triatoma sp., trouvé infecté naturellement dans la région de Tehuantepec au Mexique (Darman, 1941). La classification isoenzymatique réalisée par Tibayrenc et al. (1983) a permis de mettre en évidence l'existence en Bolivie de 2 subdivisions principales du taxon T. cruzi. La souche Tehuantepec est en relation étroite avec le zymodème-1 bolivien.

1.1.2. Souche Tulahuen

Cette souche a été isolée en 1945 à partir de Triatoma infestans à Tulahuen, Chili (Nord) (Galliard et al., 1962). Elle a été démontrée identique isoenzymatiquement au zymodème-2 de Bolivie (Tibayrenc et al., 1983).

2. CULTURE IN VITRO DES PARASITES

Le milieu liquide monophasique GLSH a été utilisée pour l'adaptation, l'entretien et la culture massive des différentes souches de T. cruzi.

2.1. Milieu de culture

Le milieu GLSH est un milieu monophasique acellulaire, décrit initialement par Jadin et Pierreux (1960) et légèrement modifié par Jadin et Le Ray (1969). Il a été appelé GLSH suivant les initiales de ses principaux constituants (glucose, lactalbumine hydrolysée, sérum, hémoglobine) et est composé de :

a) la solution de Hanks (formule pour un litre de milieu) :

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

b) Additionnée de :

Lactalbumine (hydrolysate) (Difco)	4,5 g
Sérum de veau décomplémenté ¹	100 ml (10 %)
Hémoglobine (solution stock) ²	150 ml
Pénicilline G	200 000 Unités
Streptomycine (sulfate)	100 000 ug

1. Sérum de veau ou sérum de veau foetal décomplémenté 20 mn à 56°C
2. Suspension de Bacto-Beef-Blood (Difco) à 3 % en eau distillée, portée à ébullition 1/4 heure, centrifugée 10 mn à 2800 g, filtrée, autoclavée puis stockée à 4°C.

Le pH de la solution est ajusté à 7,4 avec NaOH ou HCl 0,1 N. Le milieu est alors soumis à une filtration stérilisante s'effectuant sous pression sur membranes d'acétate de cellulose (Sartorius ou Millipore) à

l'aide d'une série de filtres de porosité décroissante : 4,0 - 1,2 - 0,8 - 0,45 et 0,22 microns.

Il est possible de conserver ce milieu stérile pendant 6 mois à + 4°C.

2.2. Entretien des souches en routine et cultures massives

L'entretien des souches de T. cruzi est réalisée en veintubes stériles contenant 3 à 4 ml de milieu GLSH à 28°C. Les subcultures sont effectuées systématiquement une fois par semaine. En vue d'une culture massive, il est souhaitable d'exalter préalablement la souche en veintube en le repiquant tous les deux jours. Les cultures massives s'effectuent progressivement selon le protocole expérimental schématisé dans la figure n°3.

Les cultures massives permettent, lors de la récolte, l'obtention d'une quantité importante d'organismes. Le rendement varie selon les espèces, mais il est en moyenne de l'ordre de 1 gramme de flagellés entiers (poids humide) par litre de milieu.

Du point de vue morphologique, les formes de culture sont équivalentes à celles rencontrées chez l'hôte intermédiaire, à savoir : les formes épimastigotes (95 %) et les formes trypomastigotes métacycliques (5 %).

3. RECOLTE DES PARASITES ET PREPARATION DU MATERIEL ANTIGENIQUE

La récolte et le lavage des organismes constituent deux étapes communes dans l'obtention des différentes préparations antiqéniques.

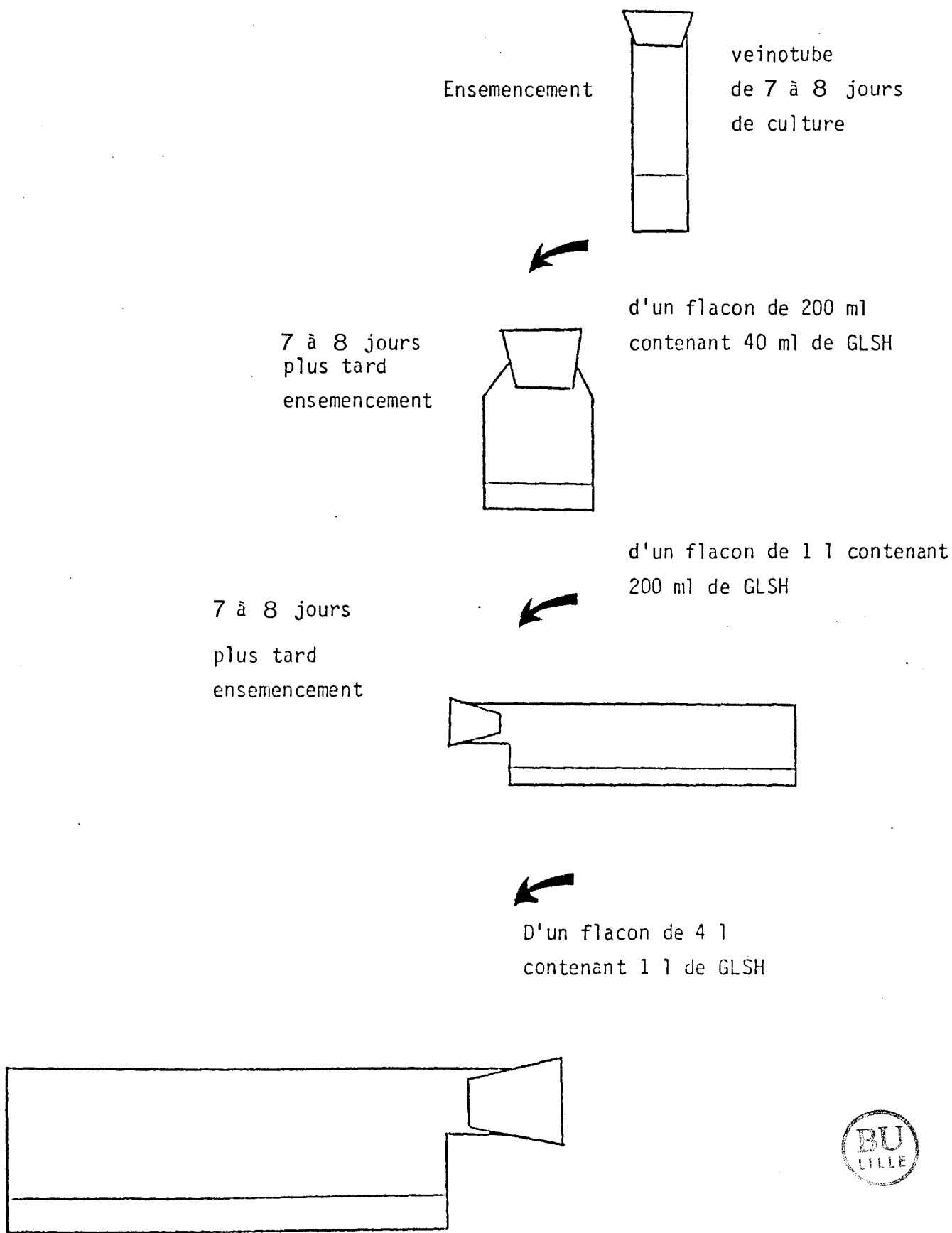


Figure n°3 : Protocole expérimental pour l'obtention de cultures massives.

3.1. Récolte et lavages des parasites

Des cultures massives de 7 à 8 jours sont homogénéisées puis centrifugées à faible vitesse (800 g) à + 4°C. Les culots correspondants sont lavés 3 fois dans une solution saline glucosée de Hanks Wallace, réfrigérée à + 4°C, pour réduire la lyse spontanée des parasites par centrifugations répétées. Les organismes ainsi récoltés et lavés servent de matériel de base pour la préparation des formes épimastigotes fixées et des différents extraits antigéniques.

3.2. Préparations des formes épimastigotes fixées pour la réaction d'immunofluorescence indirecte (IFI)

Environ 50 millions de parasites récoltés et lavés, sont remis en suspension dans 2 ml de tampon PBS, pH 7,4 auxquels on ajoute une goutte d'une solution à 2,5 % de glutaraldéhyde. Après fixation 10 mn à +4°C, la suspension est lavée 2 fois en tampon PBS, pH 7,4, par centrifugations successives à 2000 g à +4°C pendant 5 minutes. Le culot correspondant est repris dans un volume adéquat de tampon PBS de façon à obtenir 20 à 30 parasites par champs (microscope optique, grossissement x 400) en déposant 50 μ l (1 goutte) de la suspension sur une lame porte-objet. Les lames sont ensuite séchées à température ambiante pendant 2 heures et sont conservées à - 70°C jusqu'à utilisation.

3.3. Préparation des extraits antigéniques solubles

Différents extraits antigéniques de T. cruzi sont préparés. 3 grammes environ d'organismes (poids humide), récoltés et lavés, sont resuspendus

dans différentes solutions hypotoniques (1 ml par gramme de poids humide), agités pendant 2 heures à 4°C et enfin soumis à une vitesse de centrifugation de 20 000 g durant 1 heure à 4°C pour séparer le soluble de l'insoluble. On obtient ainsi :

- A) Un extrait de lyse par une solution hypotonique NaCl 1 ‰ :
extrait EC NaCl
- B) un extrait de lyse par une solution hypotonique, NaCl 1 ‰, contenant un détergent (Nonidet P40 0,05 %) et des inhibiteurs enzymatiques (aprotinine 100 U/ml, PMSF 1 mM) : extrait EC NaCl dét.
- C) Un extrait de lyse par une solution NaCl 1 ‰ suivie d'une congélation puis d'une désintégration cellulaire par trois passages dans une presse hydraulique (X Press LKB) à 18 000 psi (cellules d'une capacité de 5 à 25 ml) : extrait EC NaCl x p.

Les différents extraits antigéniques solubles (surnageants) peuvent être stockés à -70°C ou lyophilisés après avoir été dialysés une nuit contre de l'eau distillée.

4. SERUMS

4.1. Obtention d'immunsérums

Des lapins pesant environ 3 kg sont utilisés pour l'obtention d'immunsérums selon 2 techniques d'immunisation : la technique d'injection sous-scapulaire est mise en oeuvre pour l'obtention d'hyperimmunsérums (HIS) anti-extrait antigénique total de T. cruzi ; celle de multiponcture intra-

dermique de Vaitukaitis et al. (1971) pour l'obtention d'immunsérums (IS) anti-fractions enrichies et anti-antigène purifié de T. cruzi .

- La technique d'injection sous-scapulaire

Elle permet l'obtention lente de sérums les plus riches possibles en anticorps précipitants. Cette méthode consiste à injecter chaque semaine dans la cavité sous-scapulaire, 2 mg d'extrait antigénique dissous dans 0,5 ml de solution NaCl 9 % et émulsionnée dans un volume égal d'adjuvant de Freund complet (Difco).

Les saignées sont effectuées avant toute immunisation, afin de disposer de sérum négatif de contrôle, puis tous les 15 jours à partir de la 3^{ème} semaine d'immunisation. Les hyperimmunsérums sont obtenus en moyenne après le 3^{ème} mois.

Les HIS anti-extrait antigénique soluble de T. cruzi sont absorbés par 15 mg de sérum de veau préalablement lyophilisés (pour 1 ml de sérum) selon le protocole décrit par Afchain (1976).

- La technique de multiponcture intradermique de Vaitukaitis et al. (1971)

L'intérêt de cette technique réside dans l'obtention rapide d'immunsérum contenant des anticorps précipitants dirigés contre les déterminants les plus immunogènes (un mois après une seule immunisation), utilisant une dose minime d'extrait antigénique.

Le mélange d'immunisation est préparé extemporanément et contient : 0,2 à 1 mg de la fraction antigénique enrichie ou du composant purifié

+ 1 ml de solution NaCL 9 ‰

+ 2 ml d'adjuvant de Freund complet (Difco).

Après émulsion, le mélange est administré en 40 injections intradermiques de 0,075 ml dans la zone préalablement rasée du dos du lapin. Simultanément, 1 ml de vaccin coquelucheux (Institut Pasteur) est injecté par voie intramusculaire.

4.2. Sérums humains

Nous avons utilisé pour ce travail :

- 343 sérums de patients boliviens atteints de maladie de Chagas chronique, à sérologie positive pour T. cruzi (3 tests sérologiques positifs parmi l'immunoélectrophorèse, la réaction de fixation du complément, l'immunofluorescence indirecte et la méthode immunoenzymatique ELISA ; Brénière et al. , soumis pour publication) provenant des différentes régions (La Paz, Camfri, Chiwisivi et Salinas).
- 15 sérums de patients argentins (région de Santa Fé et de Santiago del Estero ; âgés de 1 à 10 ans) atteints de maladie de Chagas aiguë cliniquement confirmés et parasitologiquement positifs ;
- 47 sérums de patients boliviens atteints de leishmaniose cutanéomuqueuse (Leishmania braziliensis braziliensis) cliniquement et sérologiquement confirmés provenant de la région des Yungas (Desjeux et al. , 1974) ;
- 40 sérums de patients brésiliens bilharziens (Département de Ceara, ville de Baturite, Nord-Est du Brésil) sérologiquement confirmés ;
- 10 sérums de patients africains atteints de paludisme parasitologiquement et sérologiquement confirmés ;
- 11 sérums de patients africains atteints de trypanosomiase africaine à sérologie et diagnostic parasitologique positifs pour T. gambiense ;
- 3 sérums de patients africains atteints d'amibiase sérologiquement confirmés ;

- 14 sérums de patients européens atteints de toxoplasmose sérologiquement confirmés ;
- 14 sérums de patients provenant du bassin méditerranéen atteints de leishmaniose viscérale à sérologie positive pour L. donovani , cliniquement et parasitologiquement confirmés ;
- 67 sérums de patients boliviens de zone endémique à sérologie négative pour T. cruzi et présentant un xénodiagnostics négatif ;
- 10 sérums argentins de zone endémique sérologiquement et parasitologiquement négatifs ;
- 20 sérums humains sains européens.

4-3 Anticorps monoclonaux

Des anticorps monoclonaux anti-Trypanosoma cruzi ont été produits par hybridation de cellules de la lignée myéломateuse Sp2/0, avec des lymphocytes spléniques de souris BALB/C, immunisées avec différentes fractions antigéniques de formes épimastigotes de culture (Orozco et al., 1983).

L'étude des spécificités antigéniques des anticorps monoclonaux obtenus a permis de mettre en évidence l'obtention d'un anticorps, de classe IgG₁, anti-composant 5 spécifique de T. cruzi (clone cellulaire II 190/30). La spécificité anti-composant 5 de l'hybride II 190/30 a été démontrée par un test de compétition SRIA utilisant l'anticorps monoclonal marqué à ¹²⁵I et un sérum de lapin monospécifique anti-composant 5 de référence et par un test d'identité en double diffusion en gel avec ce même sérum.

5. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

5.1. Précipitation en gel

Les techniques de précipitation en gel permettent d'analyser les com-

posants antigéniques d'une solution ainsi que les anticorps présents dans un sérum. La double diffusion en gel (DDG), l'immunoélectrophorèse (IEP), ainsi que l'immunodiffusion radiale (IR) sont utilisées.

Le gel utilisé est préparé à partir d'une solution à 1 % d'agarose (Indubiose agarose EED = - 0,17, IBF) en tampon Véronal sodé pH 8,2 (160 g de barbital sodique + 220 ml HCl 1 N, asp 10 l). La solution est chauffée au bain-marie à 80°C jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Le volume d'agarose coulé sur les lames de verre, préalablement dégraissées et disposées sur un support parfaitement horizontal, est calculé de la façon suivante : périmètre de la plaque (cm²) x 0,2 (hauteur du gel en cm) = volume du gel (ml).

5.1.1. Double diffusion en gel (DDG)

Les épreuves de double diffusion en gel sont effectuées en disposant les réactifs selon la technique d'Ouchterlony (1958) et suivant les modifications préconisées par Abelev (1960) et Bout et al. (1979).

Les différents diagrammes utilisés pour les réactions de double diffusion sont schématisés à l'échelle millimétrique dans la figure n°4. Le tableau n°3 représente le récapitulatif des données méthodologiques de la double diffusion en gel.

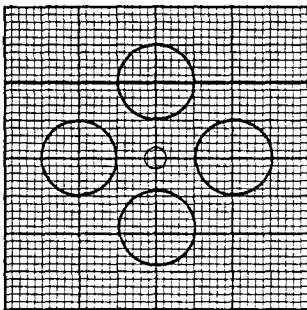
5.1.2. Immunodiffusion radiale

Par définition l'immunodiffusion radiale est une immunodiffusion simple d'un composant antigénique, qui s'opère radialement à partir d'un puits circulaire dans un gel d'agarose, contenant uniformément l'antisérum

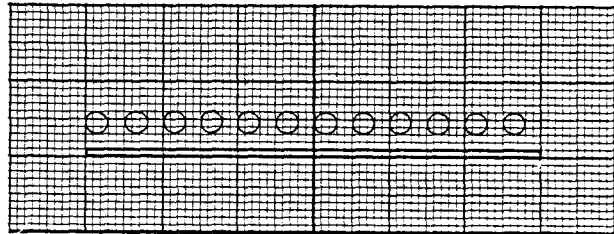
Tableau n°3 : Récapitulatif des données méthodologiques de la double-diffusion en gel

Méthode	Dimensions des lames utilisées (cm)	Volume d'agarose 1 % (ml)	Volume d'immunsérums concentré ou non 3 fois par puits (µl)	Poids d'antigène et volume du puits de dépôt
A - Macro-DDG	10 x 10	20	125	2 mg/20 µl
B - Mini-DDG	5 x 10	10	100	1 mg/20 µl
C - Micro-DDG	5 x 10	10	20	2 µl d'extrait antigénique soluble
	5 x 10	20	20	

A



B



C

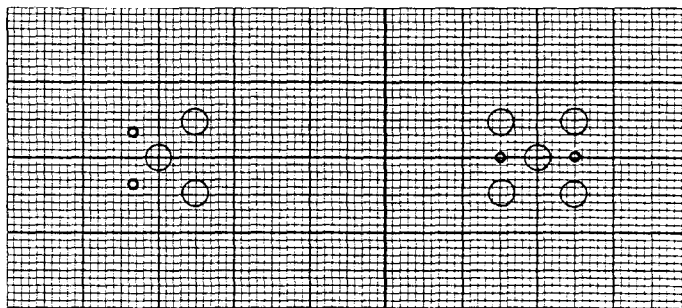


Figure n°4 : Matrices millimétriques pour la DDG.

A - Macrométhode

B - Miniméthode

C - Microméthode

adéquate. La méthode a été exploitée pour la première fois par Ouchterlony et al (1958) à des fins semi-quantitatives et développée en tant que méthode quantitative par Mancini et al. (1965). Les auteurs montrent qu'il existe une relation linéaire entre la surface de l'anneau de précipitation et la concentration du composant antigénique correspondant.

- Préparation du gel d'agarose

Un volume X d'immunsérum préalablement porté à 49°C est incorporé à deux volumes d'une solution d'agarose à 1,3 % chauffée à 49°C.

- Préparation des lames

Les lames de verre destinées à supporter le gel sont de 10 cm x 5 cm. L'épaisseur du mélange gel d'agarose-immunsérum doit être strictement uniforme. 12 puits de 2 mm de diamètre sont réalisés précisément dans le gel. 20 µl de solution antigénique sont déposés dans les différents puits. Les lames sont placées en chambre humide contenant de l'azote de sodium pendant 48 heures à 4°C.

- Interprétation

La surface et donc le diamètre au carré de l'anneau de précipitation formé sont proportionnels à la concentration de la solution antigénique déposé dans le puits. La relation est : $S = S_0 + \chi [Aq]$
d'où $D^2 = D_0^2 + \chi' [Aq]$

S = surface de l'anneau de précipitation

S_0 = surface du puits de dépôt

χ et χ' = constantes

$[Ag]$ = concentration de la solution antigénique

d^2 = diamètre au carré de l'anneau de précipitation

d^2_0 = diamètre au carré du puits de dépôts.

Les diamètres des anneaux de précipitation sont mesurés avec une règle behring avant et après coloration.

5.1.3. Immunoélectrophorèse (IEP)

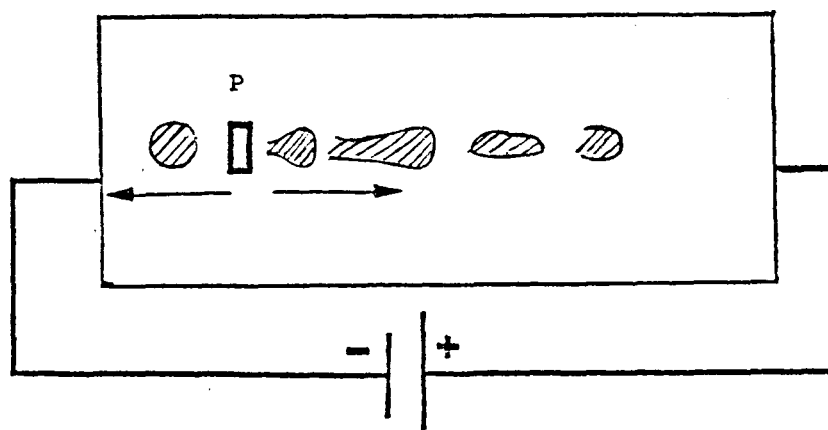
L'immunoélectrophorèse met en jeu deux propriétés qui caractérisent un composant antigénique :

- sa mobilité électrophorétique (propriété électrochimique) liée essentiellement à sa charge ;
- sa spécificité immunochimique (propriété structurale) qui fait appel à sa capacité de former un système de précipitation avec les anticorps qui lui correspondent spécifiquement.

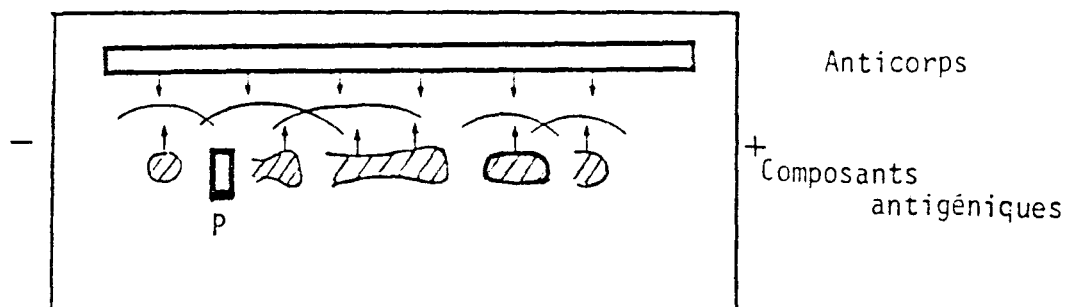
Grabar et Burtin (1964) détaillent dans leur traité le principe et les différentes applications de l'analyse immunoélectrophorétique.

Elle s'effectue en deux temps :

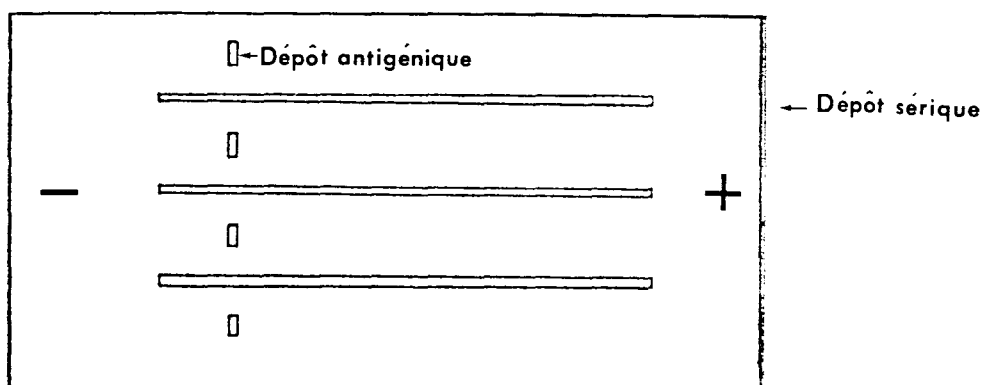
1er temps : migration et séparation des composants antigéniques déposés dans le puits de dépôt P sous l'effet d'un champ électrique.



2ème temps : dépôts du sérum dans une fente F parallèle à l'axe de migration et diffusion des composants antigéniques et des anticorps jusqu'à la formation de systèmes précipitants.



Ci-dessous est représenté à l'échelle millimétrique le diagramme utilisé pour les différentes analyses immunoélectrophorétiques réalisées dans ce travail et le récapitulatif des données méthodologiques de l'immunoélectrophorèse.



.Volume de dépôt de l'extrait antigénique : 15 μ l

.Volume de dépôt du sérum concentré trois fois : 100 μ l

.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)



Les étapes suivantes sont communes à toutes les techniques d'immuno-précipitation :

- les lames sont placées en chambre humide contenant de l'azoture de sodium pendant 48 heures. Avant lavage, elles sont immergées dans un bain de citrate trisodique à 5 % en eau physiologique pendant 3 heures, dans le but de redissoudre les arcs de floculation des complexes substance C-protéine C-réactive (Biguet et al. , 1965). Le lavage des lames s'effectue à température ambiante durant 48 heures en eau physiologique tamponnée à pH 7,4. Elles sont ensuite déminéralisées en recouvrant les lames de papier Whatman n°1 humidifié avec de l'eau distillée puis mises à sécher. Après déshydratation complète, les lames sont colorées dans une solution d'amidoschwarz (cf annexe I) pendant 5 à 10 min. Elles sont décolorées dans une solution à 20 % d'acide acétique.

Trois points sont pris en considération dans l'interprétation des différentes lames : le nombre de systèmes précipitants, leur localisation et leur intensité.

5.1.4. Immunoélectro-diffusion sur membrane d'acétate de cellulose

L'immunoélectro-diffusion (IED) a été décrite, en 1959, par Bussard sous le terme d'électro-synérèse, reprise par Dodin et Brygoo, en 1968, puis en 1970 par Pesendorfer et al. et presque simultanément par d'autres auteurs (Prince, 1970 ; Goëke et Howe, 1970).

- Principe

L'IED utilise le courant d'endosmose qui au cours d'une électrophorèse provoque la migration des anticorps en direction de la cathode et le

déplacement de l'extrait antigénique en sens contraire. Par une disposition appropriée, on fait converger antigène et anticorps ; les zones de précipitation se développent ainsi rapidement.

- Méthodologie

Les modalités opératoires sont celles de l'IED décrites par Pesendorfer et al. (1970). Le diagramme utilisé est semblable à celui proposé par Poulain et al. (1983) en vue du diagnostic immunologique des candidoses.

- Préparation des bandes d'acétate de cellulose

Les bandes d'acétate de cellulose (cellogel chemetron 2,5 x 17 cm x 190 μ) sont lavées à l'eau distillée durant 15 mn puis placées sous agitation pendant 30 mn dans le tampon de migration (tampon Tris-glycine pH 8,8. Les bandes sont alors rapidement séchées entre deux feuilles de papier Joseph et placées sur le portoir de la cuve pour électrophorèse (Chemetron Tank Mod. 2 pac 5, portoir de 11 cm de large à raison de 6 bandes par portoir). Le portoir est placé dans la cuve préalablement remplie de tampon de migration. On laisse alors imprégner les bandes durant 30 mn, couvercle fermé.

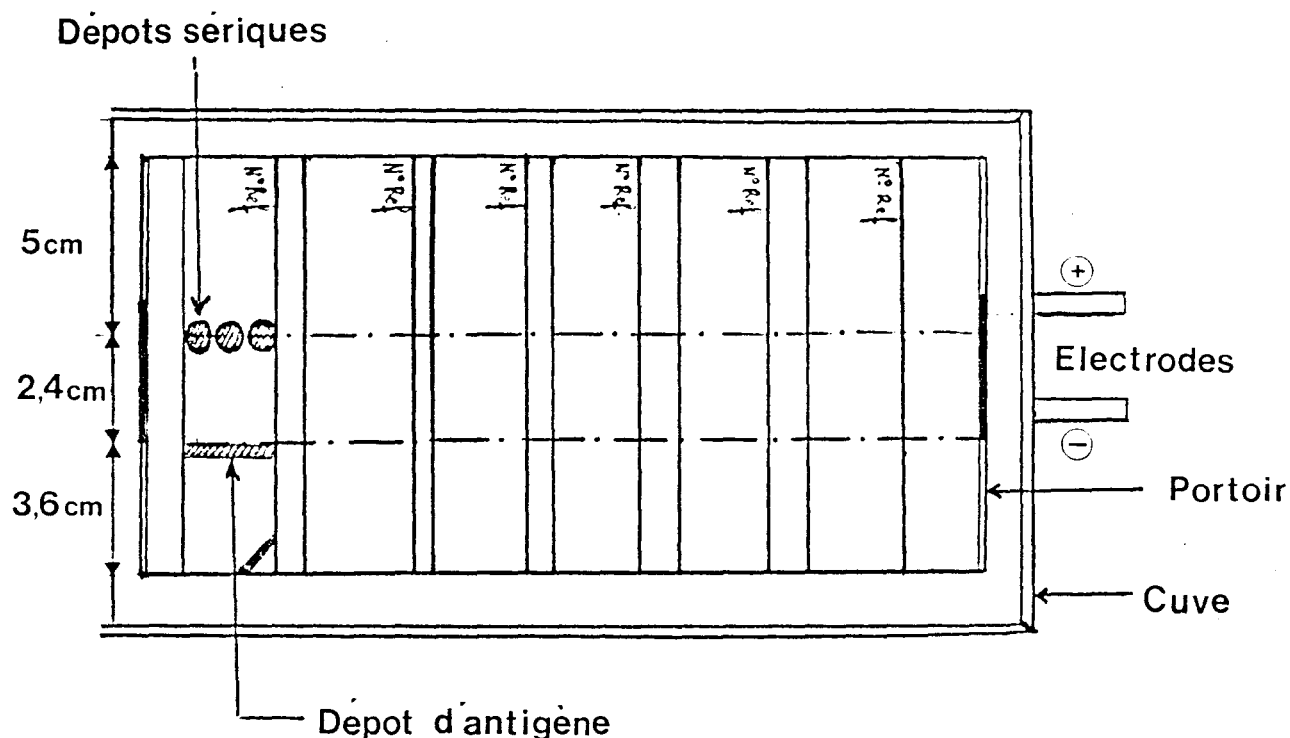
- Dépôt de la solution antigénique et des sérums (voir schéma)

- Dépôt de l'antigène - 15 μ l (0,05 à 0,6 mg) de la solution antigénique sont déposés côté cathode à l'aide d'un cône pour pipette automatique, désolidarisé du corps de la pipette, en appuyant avec la pulpe

de l'index. Le dépôt doit être rectiligne et régulier.

- Dépôt sérique - 20 μ l de sérum non concentré sont déposés à la pipette automatique du côté anode. Il est possible de réaliser 3 dépôts sériques par bande.

- Distance entre les 2 dépôts = 2,4 cm.



- Migration

La migration s'effectue à température ambiante sous une différence de potentiel de 70 volts (mesurée aux extrémités des bandes) pendant 2 h 30.

- Lavages

Tous les lavages s'effectuent sous agitation. Les bandes sont placées 15 minutes dans une solution de teepol à 1 % en solution physiologique puis citratées durant 10 mn. dans une solution de citrate à 5 % en eau physiologique et enfin lavées pendant 30 mn dans le tampon de migration



dilué au 1/200^{ème} en solution physiologique.

- Coloration et décoloration

Les bandes sont colorées avec une solution de bleu de Coomassie (cf annexe I) durant 7 minutes puis décolorées dans deux bains successifs de décolorant à base de méthanol, eau distillée et acide acétique (5V, 4V, 1V).

5.3. Immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

Cette technique a pour principe de visualiser la liaison spécifique antigène-anticorps à l'aide d'immunoglobulines marquées à la fluorescéine. C'est Coons (1951) qui mit au point la technique d'immunofluorescence directe et en imagina les applications pratiques.

La méthode indirecte dite "à deux couches" est plus sensible en raison de la disposition en éventail des complexes antigène-anticorps (Nairn, 1969). Elle utilise des immunoglobulines marquées anti-immunoglobulines de l'espèce animale ayant servi à l'immunisation ou à l'infection.

La technique suivie est celle de Weller et Coons (1954), adaptée aux conditions de laboratoire. Les dilutions sériées des sérums sont réalisées en tampon (P.B.S.), pH 7,4. Chaque dilution est déposée sur un puits contenant les formes épimastigotes fixées (cf paragraphe 3.2., chapitre "Matériel et Méthodes") et les lames sont incubées 30 mn à température ambiante. Après 3 lavages de 10 mn en tampon PBS, les préparations sont recouvertes par une goutte de solution d'anti-immunoglobuline marquée à la fluorescéine (conjugué, Institut Pasteur) diluée au 1/200^e dans une

solution de Bleu d'Evans au 1/10 000^{ème} en tampon PBS. Après 30 mn d'incubation, l'excès d'antisérum fluorescent est éliminé par 3 lavages de 10 mn en tampon PBS. Les lames sont montées avec de la glycérine 50 % (v/v) pour l'observation au microscope à fluorescence Leitz avec un filtre BG12. Les résultats sont exprimés en dilution de sérum. Chaque protocole comprend un témoin positif et un témoin négatif.

5.4. Test de compétition ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Il s'agit de détecter les anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques par compétition avec un anticorps monoclonal anti-composant 5 marqué à la phosphatase alcaline, vis-à-vis d'un extrait antigénique de T. cruzi.

Les étapes expérimentales de ce test de compétition ELISA sont schématisées à la figure n°5.

A) Sensibilisation du support solide par un extrait antigénique ("coating")

Les billes de polypropylène (diamètre 6,5 mm, Serva, Monaco) sont mises en contact avec la solution antigénique (en tampon carbonate de sodium 0,03 M, pH 9,6) une nuit à température du laboratoire sous agitation rotative douce, à raison de 35 billes pour 10 ml de cette solution. Après 3 lavages en PBS (0,01 M, pH 7,2)-tween 1%, les billes sont saturées en présence d'une solution de PBS 0,01 M pH 7,2 contenant de la sérum albumine bovine à 1 %. Cinq nouveaux lavages sont alors réalisés. Les billes "coatées" sont alors stockées à +4°C en PBS 0,01 M pH 7,2 contenant de l'azoture de sodium à 2%.

Pour une reproductibilité maximum du test, les billes ne seront utilisées que 4 à 5 jours après le coating.

B) Marquage de l'anticorps monoclonal anti-composant 5 à la phosphatase alcaline

La fusion des cellules myélomateuses sp 2/0 et de cellules spléniques de souris Balb/C immunisées par différentes préparations antigéniques enrichies en composant 5 a permis notamment d'obtenir un des groupes d'anticorps monoclonaux anti-composant 5, correspondant au clone II-190/30 (Orozco et al. , 1983).

Le clone II-190/30 est purifié, à partir des liquides d'ascite correspondants, par deux précipitations au sulfate d'ammonium (concentration finale 50 % de saturation) puis par passage sur une colonne échangeuse d'ions (DEAE-trysacryl, IBF) de 15 x 200 mm. Les protéines sont éluées avec du tampon Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M pH 8. Le premier pic contient la plupart des immunoglobulines IgG1 contenues dans les liquides d'ascite de départ.

L'anticorps monoclonaux anti-composant 5 ainsi purifié(II-190/30) est marqué à la phosphatase alcaline utilisant la glutaraldéhyde comme agent de couplage selon la méthode décrite par Avrameas (1969). 2 mg d'anticorps monoclonaux purifiés mélangés à 100 μ l de la solution de phosphatase alcaline (2500 U, intestin de veau, grade I ; Boehringer) et complétés à 200 μ l avec du PBS 0,01 M, pH 7,4 sont dialysés une nuit à + 4°C contre du PBS. Le mélange est alors mis en contact avec 100 μ l d'une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 1 % pendant 5 heures à température du laboratoire. 250 μ l de tampon PBS 0,01 M, pH 7,4 sont additionnés et le mélange est dialysé contre du tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 8 une nuit à +

4°C. Enfin, la solution d'anticorps monoclonaux marqués est complétée à 1 ml avec du tampon PBS 0,01 M pH 7,4, BSA 0,1 %.

La conservation se fait à + 4°C en présence d'azoture de sodium à 0,2 %.

C) Technique de compétition

. Compétition

Dans un tube à hémolyse de 5 ml, les différents réactifs sont additionnés dans l'ordre suivant :

- 100 μ l de la solution d'anticorps monoclonal marqués à la phosphatase alcaline utilisée à différentes dilutions dans le PBS : 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 (cf paragraphe 3.3.1. du chapitre "Résultats")
- 100 μ l de sérum à tester utilisé à différents dilutions dans le PBS : 1, 1/2, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 (cf paragraphe 3.3.1. du chapitre "Résultats")
- 150 μ l de PBS ;
- une bille sensibilisée avec l'extrait antigénique

Ils sont laissés en contact 3 heures à 37°C dans un bain-marie.

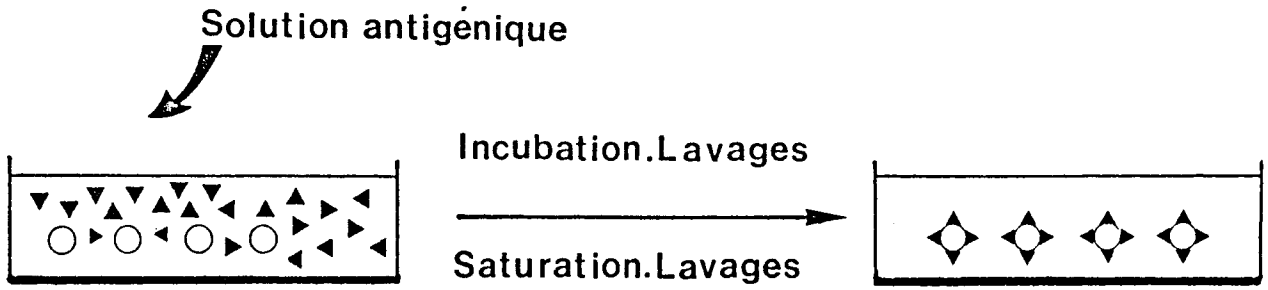
. Lavages

3 lavages successifs en PBS-Tween 0,1 % sont effectués. Les billes sont alors transférées dans de nouveaux tubes à hémolyse de 5 ml.

. Révélation, lecture et interprétation

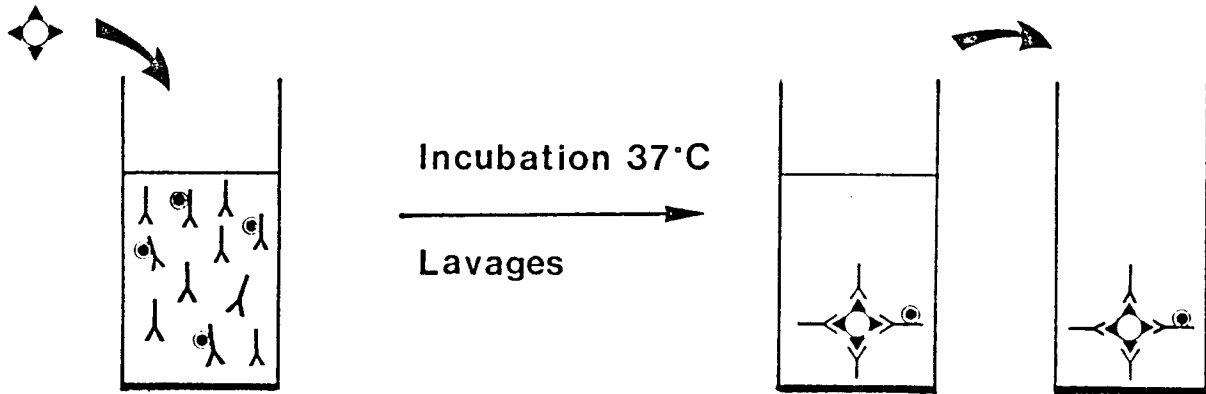
0,3 ml d'une solution de p-nitrophenylphosphate à 1 mg/ml en tampon Na_2CO_3 0,5 M, MgCl_2 10^{-3} M, pH 10,4, préparée extemporanément, sont ajoutés dans chaque tube. Après une heure de contact à 37°C dans l'obscurité, la réaction est arrêtée en additionnant 300 μ l de NaOH 2 N dans

A_ SENSIBILISATION DU SUPPORT SOLIDE PAR UN EXTRAIT ANTIGENIQUE.



○ Bille de polypropylène

B_ REACTION DE COMPETITION.



⊙ Anticorps monoclonal marqué
 Y Anticorps du serum de patient

C_ REVELATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE.

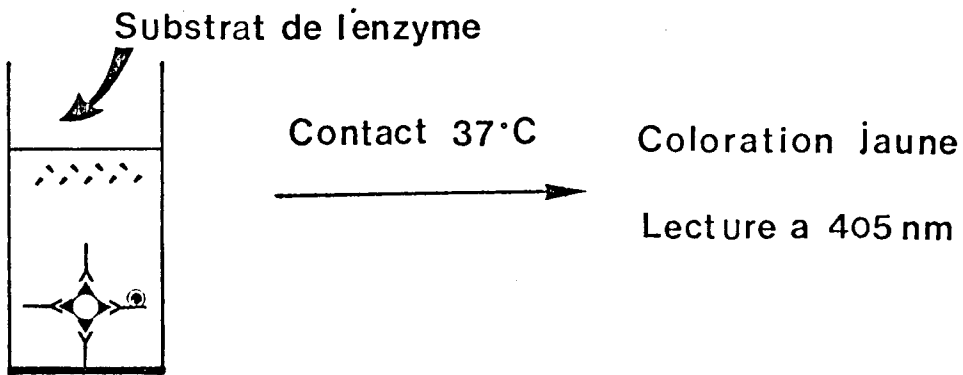


Figure 5 : Etapes expérimentales du test de compétition -ELISA- (Enzyme linked Immunoabsorbant Assay)

chaque tube. La lecture est réalisée en plaque de 96 puits par mesure de l'absorbance à 405 nm (M 129B Dynatech). Les sérums contenant des anticorps anti-composant 5 vont rentrer en compétition avec l'anticorps monoclonal marqué et présenteront donc des densités optiques (D.O.) inférieures à celles obtenues avec les sérums n'ayant pas d'anticorps anti-composant 5.

6. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

6.1. Dosage des protéines

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Lowry et al. (1951) dans laquelle on développe une coloration spécifique des protéines en utilisant le réactif des phénols de Folin-Ciocalteu et un réactif cuivrique alcalin.

A 0,1 ml d'une solution protéique à doser, diluée en tampon phosphate pour être dans la gamme standard de sérumalbumine bovine cristallisé (Sigma) (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$ et 800 $\mu\text{g/ml}$), on ajoute 1 ml de la solution de biuret (Na_2CO_3 4 % en solution NaOH 0,1 M, 100 ml ; tartrate double de sodium et potassium à 2 %, 1 ml; Cu SO_4 à 2 %, 1 ml). Après 30 mn de contact à l'obscurité et à la température du laboratoire, on ajoute sous agitation 0,1 ml de réactif de Folin (Merk) dilué au 1/2. Après 15 mn de contact à l'obscurité, la densité optique est lue à 660 nm contre un blanc (eau, 0,1 ml ; solution de biuret, 1 ml; réactif de folin, 0,1ml). La coloration est stable pendant 2 heures. La concentration protéique est donnée par correspondance à la courbe standard établie à l'aide des différentes concentrations de sérumalbumine dosées dans les mêmes conditions.

6.2. Dosage des oses neutres

La méthode au phénol sulfurique de Dubois et al. (1956) est utilisée. Elle n'implique pas une hydrolyse préalable de l'échantillon pour la dissociation des oses constitutifs des sucres complexes. Elle utilise l'acide sulfurique simultanément au phénol. Les sucres forment en présence d'acide fort des dérivés furfurals qui, par polymérisation ou condensation avec des phénols donnent naissance à des composés colorés. Ce dosage ne prend pas en compte les osamines et les sucres alcooliques ; les pentoses produisent une extinction moléculaire inférieure aux hexoses.

A 0,1 ml d'échantillon est ajouté 0,1 ml de phénol 5 %. Simultanément, on ajoute goutte à goutte 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. Le mélange est réalisé par agitation et laissé à température ambiante pendant 60 minutes. La densité optique est lue à 490 nm contre un blanc (eau, 0,1 ml ; phénol à 5 %, 0,1 ml ; acide sulfurique concentré, 0,5 ml). La coloration brune orangée développée est stable à 4°C pendant 24 heures.

La courbe étalon est établie avec différentes concentrations de lactose (sigma) réalisée à partir d'une solution mère et dosées dans les mêmes conditions : 15, 30, 60, 100, 125, 250 μ g.

6.3. Préparation de fractions concentrées de surnageant de milieu de culture

3 litres de culture massive de 7 jours sont centrifugés à 800 g pendant 15 mn à 4°C. Le surnageant de milieu de culture (S.M.C.), est alors filtré sur filtre Millipore 0,4 μ en absence de pression puis concentré à 30 ml sur un ultrafiltre Amicon monté d'une membrane Diaflo XM50. Le

filtrat, qui contient les molécules inférieures à environ 50 000 daltons, est concentré à 60 ml sur un ultrafiltre Amicon monté d'une membrane Diaflo UM10. Les deux ultrafiltrats (U_{50} et U_{10}) sont centrifugés pendant 30 mn à 2000 g à 4°C. Les surnageants correspondants sont dialysés une nuit à 4°C contre de l'eau distillée puis lyophilisés. 3 litres de milieu GLSH sont traités selon le même protocole pour obtenir les contrôles respectifs (U_{50c} et U_{10c}).

6.4. Cinétique de culture .

20 flacons contenant 40 ml de milieu de culture sont inoculés avec 11×10^6 épimastigotes. Au temps zéro et à différents temps de la culture, les surnageants de milieu de culture sont recueillis, filtrés et concentrés selon le protocole décrit au paragraphe 6.3 pour l'obtention des fractions U_{50} correspondantes.

6.5. Préparation de fractions antigéniques par extraction chimique

6.5.1. Extraction phénol 44 % et précipitation à l'éthanol (Wesphal, 1959)

A 2 ml d'extrait antigénique soluble sont ajoutés 2 ml d'une solution de phénol à 88 % (v/v) préalablement porté à 40°C. Après 20 mn d'agitation à chaud, le mélange est centrifugé à 2500 g pendant 45 mn à 4°C. La phase aqueuse est recueillie et est extraite 2 fois encore de la même façon. Le dernier surnageant aqueux est alors précipité par 3 volumes d'éthanol (75 %). Après centrifugation à 5000 g durant 20 mn, le culot lavé et séché, est resuspendu dans 2 ml d'eau distillée, dialysé une nuit contre de l'eau distillée puis lyophilisé.

6.5.2. Extraction à l'acide Trichloracétique 20 et 30 % (TCA 20 et 30)

A 2 ml d'extrait antigénique soluble, 2 ml d'une solution TCA à 40 % (extraction TCA 20 %) ou 2 ml d'une solution TCA à 60 % (extraction TCA 30 %) sont additionnés. Après 20 mn d'agitation à température ambiante, les mélanges sont centrifugés 20 min, à 2000 g à 4°C. Les précipités correspondants, repris dans 2 ml d'eau distillée, sont à nouveau extraits selon le même protocole. Les surnageants respectifs sont rassemblés, dialysés, concentrés à 1 ml et enfin lyophilisés.

6.5.3. Extraction à l'acide perchlorique 0,2 N (HClO₄ 0,2 N)

2 ml d'extrait antigénique sont extrait par 2 ml d'une solution HClO₄ 0,2 N suivant le protocole décrit ci-dessus.

6.5.4. Extraction chloroforme-méthanol et précipitation à l'éthanol

6 ml de solution antigénique (3 ml d'extrait antigénique + 3 ml d'eau distillée) sont mélangés à un même volume d'une solution chloroforme/méthanol (2/1). Après 20 mn d'agitation à température ambiante, le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 20 mn à + 4°C. La phase aqueuse est recueillie et extraite encore 2 fois de la même façon. Le dernier surnageant aqueux est alors précipité par 3 volumes d'éthanol selon le protocole indiqué au paragraphe 6.5.1.

6.6. Analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Cette analyse est une méthode de choix pour mettre en évidence et séparer en fonction de leur poids moléculaire, les différents peptides qui composent un complexe moléculaire. Elle permet d'analyser le degré de pureté d'une protéine ainsi que de la caractériser en fonction de son poids moléculaire. La protéine débobinée à chaud en présence de β -mercaptoéthanol (réducteur puissant ; coupe les ponts disulfures) et de dodécylsulfate de sodium (SDS) acquiert du fait du SDS une charge négative élevée. Le facteur limitant la migration électrophorétique dans le réseau de polyacrylamide reste l'encombrement, donc le poids moléculaire de la molécule.

La technique a été réalisée selon le protocole décrit par Laemmli et al. (1970) dans un appareil à électrophorèse vertical construit dans notre laboratoire selon le modèle décrit par Bout (1977). La composition des gels de concentration et d'analyse est donnée dans l'annexe II. 15 μ l de la solution antigénique sont mélangés avec le même volume de tampon échantillon et portés 3 mn à 80°C. L'échantillon, ainsi traité (30 μ l) est ensuite déposé sur le gel de polyacrylamide préalablement préparé (13 %).

L'électrophorèse s'effectue sous un courant de 9 mA durant 15 heures. Le gel est ensuite coloré dans une solution de bleu de Coomassie puis décoloré dans un bain de décolorant à base de méthanol. Le gel est enfin déshydraté sur papier Whatman (Appareil de séchage sous vide, Pharmacia). La composition du tampon échantillon, des solutions de coloration et décoloration sont données dans l'annexe I.

L'étalonnage du gel est réalisé grâce à l'utilisation de protéines de poids moléculaires connus (Kit Pharmacia). On détermine pour chacune de ces protéines la distance parcourue dans le gel. Les valeurs permettent d'établir la droite d'étalonnage $d = f(\log \text{ du poids moléculaire})$ et donc de déterminer le poids moléculaire de la protéine étudiée.

6.7. Chromatographie de tamisage moléculaire (gel filtration)

La chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de gel, introduite par Porath et Flodin (1959), permet de séparer les constituants d'un mélange complexe en fonction de leur poids moléculaire. Les gels de polyacrylamide (BioGel P), de dextran (Sephadex), d'agarose (BioGel A, Sépharose et indubiose A) et ceux à base d'acrylamide et d'agarose (UltroGel) sont les plus couramment utilisés. Le choix du support et de son degré de réticulation est fonction de la taille des molécules à séparer.

- Préparation des gels

Les gels de Séphadex G200 superfine (SF) et G75 SF sont utilisés comme support. Les caractéristiques de ces gels et des colonnes utilisées sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Désignation des gels	Domaine de fractionnement pour des protéines globulaires (daltons)	Caractéristiques de la colonne dimensions (cm)	vitesse d'élution (ml/heure)	Tampon d'élution
G 200 SF	5000-250 000	2,5 x 30	5	Tris-HCl 0,1 M pH 7,4
G 75 SF	3000-80 000	1,5 x 30	5	Tris-HCl 0,1 M pH 7,4

- Etalonnage des colonnes

Le volume mort, V_0 , est déterminé par l'élution du bleu dextran 2000 (1 mg/ml) et le volume total, V_t , par l'élution du bichromate de potassium (1 mg/ml). L'étalonnage proprement dit est effectué par l'élution succes-

sive des deux mélanges de calibration suivant :

1ère élution

Protéines	Poids moléculaires
Ribonucléase A	13,700
Ovalbumine	43.000
Aldolase (G 200 SF seulement)	158.000

2ème élution

Protéines	Poids moléculaires
Chymotrypsinogène	25.000
Albumine	67.000
Catalase (G 200 SF seulement)	232.000

On détermine pour chaque protéine un coefficient d'avancement (K_{av}) par l'équation $K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$ ou V_e est le volume d'élution de la molécule. Ces valeurs permettent d'établir la droite d'étalonnage $K_{av} = f(\log \text{ du poids moléculaire})$ et de déterminer le poids moléculaire de la protéine étudiée connaissant son K_{av} .

- Elution

Les colonnes de gel filtration sont préalablement équilibrées avec le tampon d'élution. Pour une meilleure résolution, le volume de l'échantillon à déposer sur la colonne sera compris entre 1 et 2 % du volume total du gel. Des fractions de 0,5 ml ou 1 ml sont recueillies (Collecteur Gilson). Durant l'élution les quantités de protéines sont déterminées par mesure de l'absorbance des différentes fractions d'élution à 280 nm. Les acides nucléiques sont repérés par mesure de l'absorbance à 260 nm. Les fractions correspondantes aux différents pics d'élution sont rassemblées,

dialysées une nuit contre de l'eau distillée à + 4°C et lyophilisées.

6.8. Chromatographie d'affinité (immunoabsorption)

La chromatographie d'affinité est une méthode de fractionnement fondée sur les propriétés biologiques spécifiques des substances à isoler.

La méthodologie qui consiste à utiliser comme système macromolécules-ligands, le système antigène-anticorps a été préconisé par Campbell et Weliky (1967). Elle repose sur la propriété des anticorps préalablement insolubilisés sur un support figuré, de réagir avec leur antigène homologue pour ainsi isoler sélectivement celui-ci.

- Préparation de l'immunoabsorbant (couplage du ligand)

2,5 g de gel sec de Sépharose 4B préactivé par le bromure de cyanogène (Pharmacia) est mis à gonfler dans une solution HCl 10^{-3} M pendant 15 mn puis lavé sur filtre de verre poreux avec la même solution (200 ml/g de gel). Le gel est ensuite lavé rapidement avec une solution tampon bicarbonate de sodium 0,1 M-NaCl 0,5 M (50 ml). On opère immédiatement le couplage. Le ligand, (50 mg d'immunoglobulines purifiés par précipitation au sulfate d'ammonium à 33 % de saturation), préalablement dissout dans 5 ml de tampon carbonate-bicarbonate 0,05 M, pH 9,8, est ajouté au gel de façon à obtenir un volume final de 25 ml. Le mélange est alors agité doucement pendant 2 heures à la température du laboratoire. L'excès de ligand est éliminé par lavage du gel avec une solution tampon bicarbonate 0,5 M-NaCl 0,5 M (50 ml/g de gel) puis mis en contact avec une solution tampon carbonate 0,05 M-acide 4-amino butyrique 0,5 M pH 10. Ce mélange est agité doucement pendant deux heures puis lavé en 3 cycles de 2 temps (1er

temps : tampon acétate 0,1M-NaCl M, pH 4-100 ml/g de gel ; 2ème temps : tampon borate 0,1 M, NaCl M, pH 8-100 ml/g de gel). Un dernier lavage est réalisé avec une solution de NaCl 0,5 M tamponnée à pH 7,4 (500 ml/g de gel).

- Purification du composant antigénique

L'extrait antigénique dissout dans 5 ml de solution de NaCl 0,5 M tamponnée à pH 7,4 est mis en contact avec 8 ml de gel de Sépharose-Immunglobulines par agitation douce pendant 2 heures à température ambiante. Le gel est alors déposé dans une colonne de 1,5 cm x 10 cm et l'immunoabsorbant est lavé avec une solution de NaCl 0,5 M jusqu'à ce que l'éluat présente une absorbance à 280 nm voisine de zéro.

L'élution du composant antigénique fixée est réalisée par un traitement acide en tampon glycine-HCl, pH 3 (20 ml/g de gel). La neutralité de la fraction éluée est immédiatement rétablie par addition d'une solution de K_2PO_4 1 M. La fraction purifiée est alors dialysée une nuit contre de l'eau distillée, concentrée sur ultrafiltre Amicon monté d'une membrane Diaflo UM₁₀ puis lyophilisée en vue d'être analysée.

Le gel est lavé par une solution tampon glycine-HCl pH 2,2 et conservé dans une solution de NaCl 0,5 M tamponnée à pH 7,4 contenant 0,01 % d'azote de sodium jusqu'à réutilisation.

Annexe I

A) Colorant Amido-Schwartz

Acide acétique (solution normale)	425 ml
Acétate de sodium (solution molaire)	425 ml
Noir Amide 10B (Merck)	2 g
Eau distillée	qsp 1 l

B) Colorant bleu Coomassie SDS-PAGE

Bleu de Coomassie brillant	200 g	} Décolorant
Acide acétique	50 ml	
Méthanol	250 ml	
Eau distillée	1 l	

C) Tampon échantillon

Tris HCl 0,5 M pH 6,8	12,5 ml
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	3 g
Glycérol	10 ml
Bleu de bromophénoï	0,5 % (p/v)
Eau distillée	50 ml
+ β mercapto-éthanol à 5 %	

Annexe II

A) Gel de concentration 5 % SDS-PAGE

Acrylamide	5 g
Bis-acrylamide	0,133 g
SDS	0,1 g
Tris-HCl 0.5 M pH 6,8	25 ml
Eau distillée	100 ml
7.5 ml A + 4,5 μ l Temed + 45 μ l persulphate 10 %	

B) Gel d'analyse 13 % SDS-PAGE

Acrylamide	13 g
Bis-acrylamide	0,35 g
SDS	0,1 g
Tris-HCl 0,75 M ; pH 8,8	50 ml
Eau distillée	qsp 100 ml
30 ml B + 15 μ l Temed + 100 μ l persulfate 10 %	

•

R E S U L T A T S

L'isolement du composant 5 de T. cruzi a tout d'abord été réalisé à partir d'un extrait antigénique total hydrosoluble de formes épimastigotes de culture dans lequel il avait été mis en évidence.

Sa présence à la surface des parasites en culture a conduit à envisager sa détection dans le surnageant de milieu de culture correspondant, avec comme objectif final de le purifier.

Les divers processus de purification mis en jeu pour l'isolement du composant 5 à partir des différentes sources antigéniques de T. cruzi sont schématisés dans la figure n°6.

Enfin, certains extraits antigéniques, obtenus et analysés au cours de la purification du composant 5, ont été évalués dans différents tests sérologiques de sensibilité croissante, fondés sur la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques.

1. PURIFICATION DU COMPOSANT 5 A PARTIR DES FORMES EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

Une première étude a consisté à comparer différents extraits antigéniques totaux hydrosolubles. Leur analyse moléculaire (polypeptidique) et antigénique nous ont conduit au choix d'une préparation antigénique. Enfin, la complexité aussi bien moléculaire qu'antigénique de ces différents extraits nous a guidé vers l'obtention d'une fraction enrichie en composant 5.

1.1. Choix d'un extrait antigénique total

Trois extraits antigéniques, préparés à partir de formes épimastigotes de T. cruzi selon le protocole décrit dans le paragraphe 3.3 du chapitre

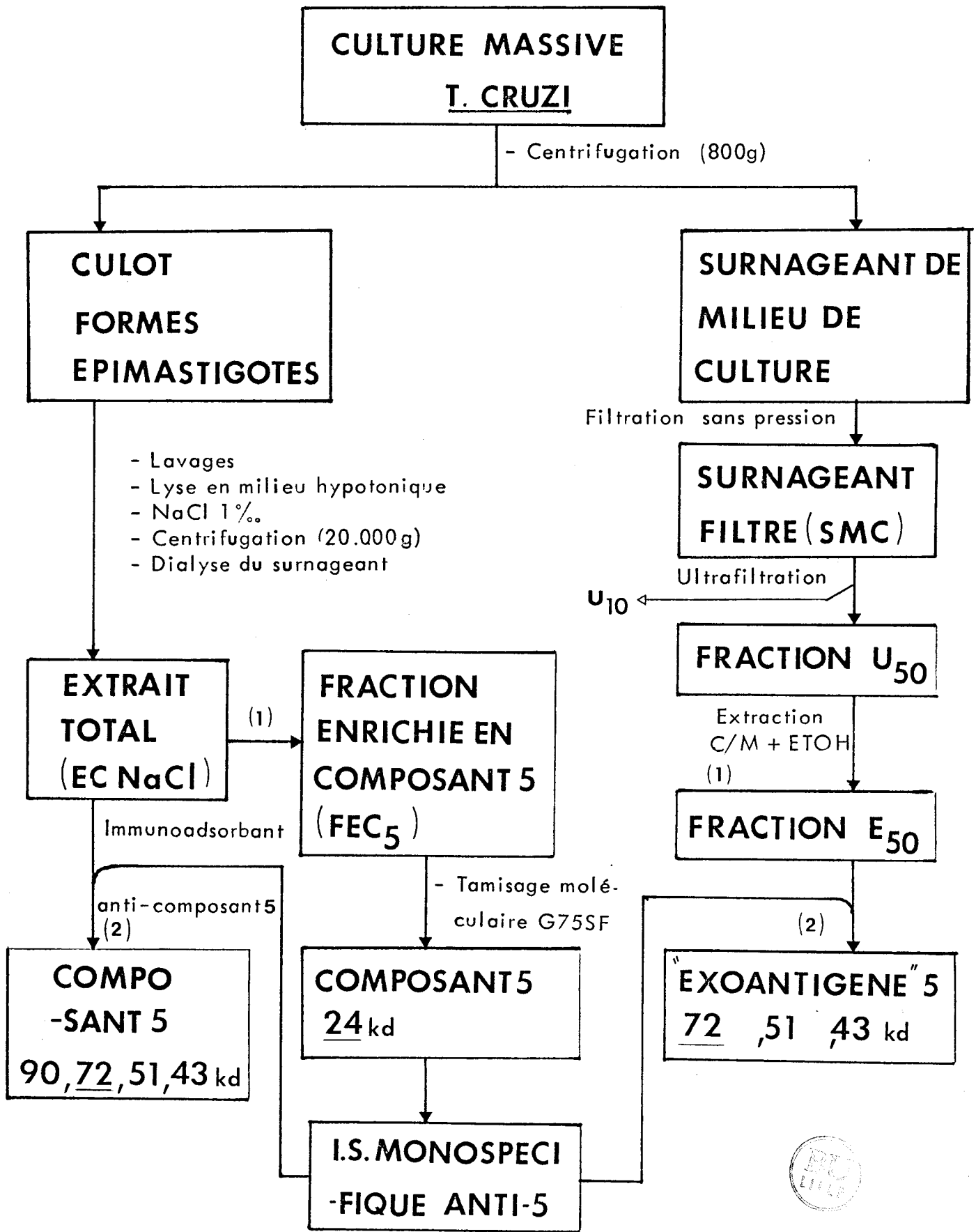


Figure n° 6 : Schéma récapitulatif des différents processus de purification du composant 5 menés à partir de deux sources antigéniques de Trypanosoma Cruzi.

"Matériel et Méthodes", sont étudiés : les extraits EC NaCl (lyse des parasites en milieu NaCl 1 %), Ec NaCl dét. (lyse des parasites en milieu NaCl 1 % en présence de Nonidet P40 et d'inhibiteurs enzymatiques) et EC NaCl xp (lyse des parasites en milieu NaCl 1 % suivie d'une congélation et désintégration).

1.1.1. Rendements, Contenus en protéine et en glucides

Les différentes quantités d'extraits antiqéniques obtenues par gramme (g) de matériel parasitaire (poids humide) ainsi que leurs contenus en protéines et en glucides sont représentés dans le tableau n°3.

Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'est observée quant aux rendements et aux concentrations en protéines et en glucides obtenues avec les différents extraits antigéniques préparés. Un litre d'une culture de 7 jours permet l'obtention d'environ 20 mg d'extrait antigénique total hydro-soluble. Les rapports : concentration en protéines sur concentration en glucides varient de 3 à 4.

1.1.2. Analyse polypeptidique

Différentes concentrations en protéines (50 μ g et 100 μ g) de chaque extrait antigénique préparé sont analysées en électrophorèse de gel de polyacrylamide (13 %) en présence de SDS (conditions réductrices) après coloration au bleu de Coomassie. La photo n°1 montre la réelle complexité des profils polypeptidiques objectivés. 40 à 50 bandes environ peuvent être visualisées et correspondent à des poids moléculaires s'échelonnant de 10 à 150 Kilodaltons (Kd). Aucune différence n'est observée entre les profils polypeptidiques des extraits EC NaCl et EC NaCl dét. ; plusieurs protéines majeures correspondant à des poids moléculaires de 90 Kd, 55 Kd, 40 Kd et 33 Kd, sont objectivés.

Tableau n°3 : Rendements et contenus en protéines et en glucides des différents extraits antigéniques hydrosolubles préparés.

Extrait antigénique	Quantité obtenue (mg) par g de matériel parasitaire (poids humide)	Protéine (%)	Glucide (%)
EC NaClxp	20 ± 1 (3)*	70,2 ± 1 (3)	19,1 ± 1 (3)
EC NaCl	22 ± 3 (3)	68,3 ± 2 (3)	17,9 ± 3 (3)
EC NaCl dét.	21 ± 2 (3)	61,3 ± 2 (3)	18,3 ± 2 (3)

* nombre de préparations



Par contre, le profil polypeptidique de l'extrait EC NaCl xp par rapport aux deux autres, laisse apparaître des différences aussi bien de nature qualitative que de nature quantitative. D'une façon générale, il montre un enrichissement en molécules de plus faible poids moléculaire (zones de 25 Kd, 20 Kd et 15 Kd), de même qu'un net appauvrissement en molécules de plus haut poids moléculaire (zone supérieure à 40 Kd). Les polypeptides correspondants à des poids moléculaires de 90 Kd (révélés de façon majeure dans les extraits EC NaCl et EC NaCl dét.) et de 35 Kd sont totalement absents du profil polypeptidique de l'extrait EC NaCl xp.

1.1.3. Analyse antigénique

Lorsque l'on porte les différents extraits antigéniques totaux (EC NaCl xp, EC NaCl et EC NaCl dét.) contre un HIS anti-extrait EC NaCl xp, 31,26 et 26 systèmes de précipitation sont respectivement identifiés (photo n°2). Les profils électrophorétiques des extraits EC NaCl et EC NaCl dét. sont pratiquement superposables. Par contre le profil immunoélectrophorétique révélé par l'extrait EC NaCl xp est plus complexe et exprime des déterminants antigéniques supplémentaires.

La même analyse menée à l'aide de sérums humains non concentrés, riches en anticorps anti-composant 5, montre que les extraits EC NaCl et EC NaCl xp, ne révèlent pas de la même façon l'arc de précipitation correspondant au composant 5 (migration électrophorétique caractéristique). L'extrait EC NaCl (de même que l'extrait EC NaCl dét.) précipite la totalité de l'arc 5 alors que le troisième extrait (EC NaCl xp) ne semble en révéler que la partie la plus anodique (photo n°3).

1.1.4. Choix d'un extrait antigénique hydrosoluble de formes épimastigotes de *T. cruzi*

Considérant les résultats obtenus, l'extrait EC NaCl xp n'a pas été retenu. En effet, son analyse polypeptidique met en évidence un certain degré de dénaturation des molécules qui le composent. De plus, son analyse antigénique montre que cette préparation ne préserve pas totalement les propriétés antigéniques du composant 5.

Etant donné la difficulté d'éliminer le détergent Nonidet P40 de l'extrait EC NaCl Dét., notre choix s'est porté sur la préparation antigénique la plus simple : l'extrait EC NaCl, en vue de réaliser les différentes approches de la purification du composant 5.

1.1.5. Recherche de la présence du composant 5 dans différentes souches de *T. cruzi*

2 souches de *T. cruzi*, de chaque type enzymatique (zymodème 1 et zymodème 2) mises en évidence en Bolivie et caractérisées isoenzymatiquement par Tibayrenc et al. (1983) ainsi que les souches Tulahuen et Tehuantepec sont étudiées. Pour détecter la présence du composant 5 dans les différents extraits antigéniques préparés, nous avons utilisé un sérum de patient chagasique chronique comme sérum de référence (SHR). Ce sérum, concentré 3 fois, opposé à un extrait EC NaCl, objective en immunoelectrophorèse 3 arcs de précipitation dont l'un est majeur et correspond au système de précipitation du composant 5 (forme de migration électrophorétique caractéristique). En double diffusion en gel (DDG), le sérum utilisé non concentré et opposé à l'extrait EC NaCl de la souche Tehuantepec ne révèle que le système précipitant correspondant au composant

Photo n°1 : Analyse polypeptidique en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE (13 %) après coloration des protéines au bleu de Coomassie des différents extraits antigéniques totaux de T. cruzi préparés : EC NaCl dét., EC NaCl et EC NaCl x p (50 et 100 µg).

Elle révèle la complexité des profils polypeptidiques objectivés et laisse apparaître des différences de nature qualitative et quantitative notables entre l'extrait EC NaCl x p et les deux autres préparations.

Photo n°2 : Analyse immunoélectrophorétique des différents extraits antigéniques totaux préparés menée à l'aide d'un HIS anti-extrait EC NaCl x p (concentré 3 fois). Les profils immunoélectrophorétiques des extraits EC NaCl sont très semblables alors que celui révélé par l'extrait EC NaCl x p est antigéniquement plus complexe.

Photo n°3 : Analyse immunoélectrophorétique des extraits EC NaCl et EC NaCl x p vis-à-vis de sérums humains riches en anticorps anti-composant 5 (utilisés non concentrés).

Les extraits EC NaCl et EC NaCl dét. (non montré) précipitent la totalité du système de précipitation correspondant au composant 5 (aspect bilobé). Le troisième extrait ne révèle que la partie la plus anodique et ne semble donc pas préserver totalement les propriétés antigéniques du composant 5.

Photo n°4 : Mise en évidence de la présence du composant 5 chez différentes souches de T. cruzi par double diffusion en gel utilisant un sérum humain de référence non concentré, riche en anticorps anti-composant 5 (SHR) par identité d'arcs.

Souches	Origine géographique	Type enzymatique	Hôte
C8 (3)*	Bolivie	1	<u>T. infestans</u>
C37 (4)	Bolivie	1	<u>T. infestans</u>
C50 (5)	Bolivie	2	<u>T. infestans</u>
92-80 (6)*	Bolivie	2	humain
Tehuantepec (1)	Mexique	1	<u>T. infestans</u>
Tulahuen (7)	Chili	2	?

* clone

PHOTO n° 1

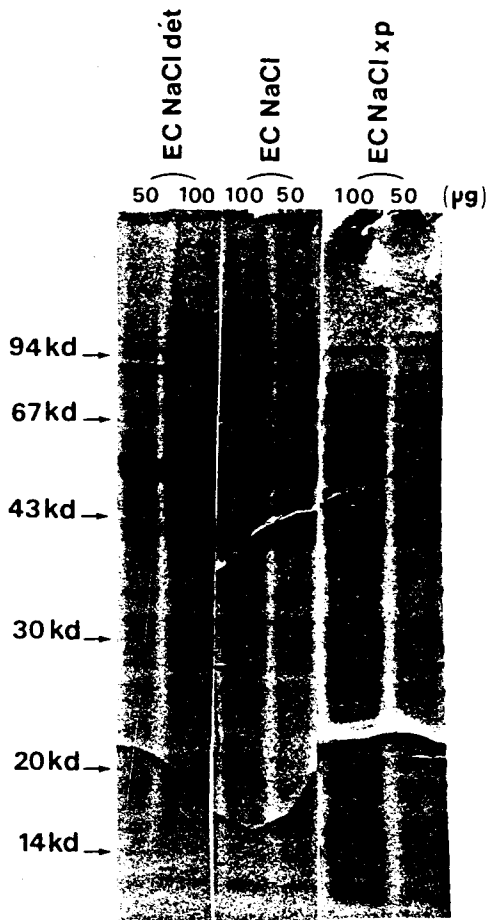


PHOTO n° 2

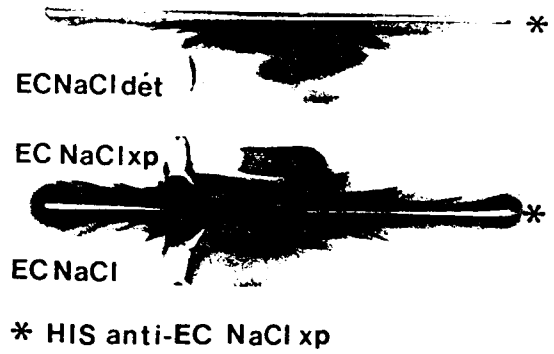
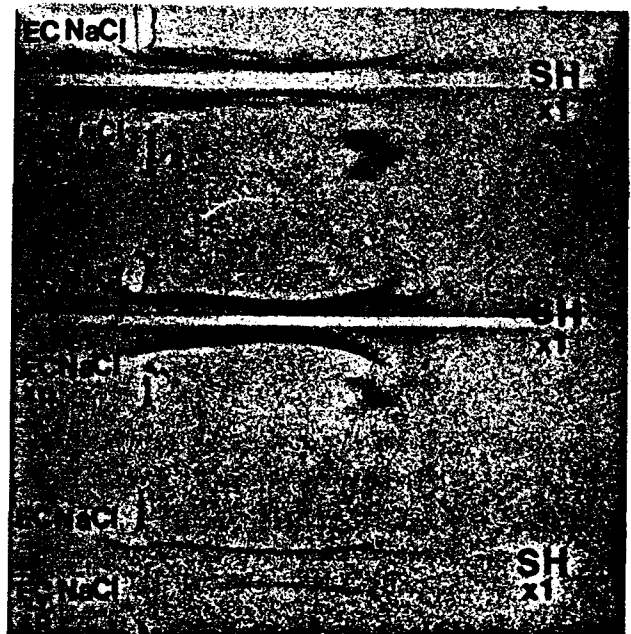
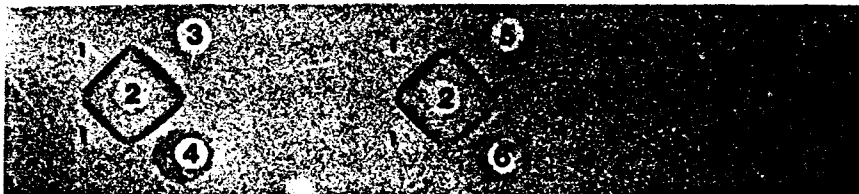


PHOTO n° 3



SH, SH', SH'', sérums riches en anticorps anti- composant 5

PHOTO n° 4



- 1.Extrait EC NaCl (souche Tehuantepec)
- 2.Serum humain de référence (SHR) x1
- 3 et 4. Souches de *T.cruzi* de type 1
- 5 et 6. Souches de type 2
- 7.Souche Tulahuen



5 (photo n°4). Cette même photo montre aussi que lorsque les extraits EC NaCl des différentes souches étudiées (souche C₈, C₃₇, C₅₀, 92-80, Tehuantepec et Tulahuen) sont portés en DDG contre le SHR, le système de précipitation correspondant au composant 5 est révélé dans tous les cas et présente une réaction d'identité avec l'arc 5 objectivé par l'extrait EC NaCl.

1.2. Approche biochimique de la purification du composant 5

1.2.1. Préparation de fractions enrichies en composant 5

La complexité moléculaire et antigénique de l'extrait antigénique hydrosoluble total de formes épimastigotes de T. cruzi nous a conduit à la recherche d'une fraction enrichie en composant 5.

1.2.1.1. Obtention de fractions antiqéniques

Le fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire et diverses extractions chimiques menées à partir de l'extrait EC NaCl ont permis l'obtention de différentes fractions antigéniques.

1.2.1.1.1. Fractions G 200

Dans un premier essai de purification du composant 5, 50 mg (poids sec) de l'extrait EC NaCl lyophilisé, resuspendu dans 1 ml de tampon d'élution (Tris HCl 0,1 M, pH 7,4) sont fractionnés sur une colonne de tamisage moléculaire G 200 superfine (30 x 2,5 cm, débit : 5 ml/heure), préalablement étalonnée. La figure n°7 représente les différents profils d'élution obtenus par analyse des protéines (lecture à 280 nm), des oses

neutres (dosage au phénol sulfurique) et des acides nucléiques (lecture à 260 nm) réalisée sur les différents éluats collectés. Ainsi, 9 fractions ont été sélectionnées de façon à minimiser le plus possible les chevauchements des différents pics individualisés. Il s'agit des pics I, I_A, II, II_A, III, IV, IV_A, , V et VI. Les contenus des tubes correspondant à chaque fraction sont rassemblés, dialysés puis lyophilisés en vue d'être analysés. La figure n°8 représente les rapports : concentration en protéines sur concentration en glucides des différentes fractions éluées.

1.2.1.1.2. Fractions antigéniques obtenues par extraction chimique

Dans le but d'obtenir une fraction enrichie en composant 5, différentes extractions sont réalisées à partir de l'extrait antigénique total EC NaCl : une extraction au phénol 44 % à chaud suivie d'une précipitation à l'éthanol, deux extractions à l'acide trichloracétique 20 % et 33 %, une extraction à l'acide perchlorique 0,2 N et enfin, une extraction au chloroforme-méthanol (2/1) suivie d'une précipitation à l'éthanol. Les différents protocoles d'extraction mis en oeuvre sont décrits en détail dans le paragraphe 6.5 du chapitre "Matériel et Méthodes". L'analyse physicochimique (rendement, contenu en protéines et en glucides) et l'analyse antigénique des différentes fractions obtenues sont résumées dans le tableau n°4.

1.2.1.2. Analyse antigénique

L'analyse en double diffusion en gel (microméthode) des différentes fractions obtenues (utilisées à la concentration de 1 mg/20 µl) vis-à-vis du sérum humain de référence (SHR) (utilisé non concentré) montre que

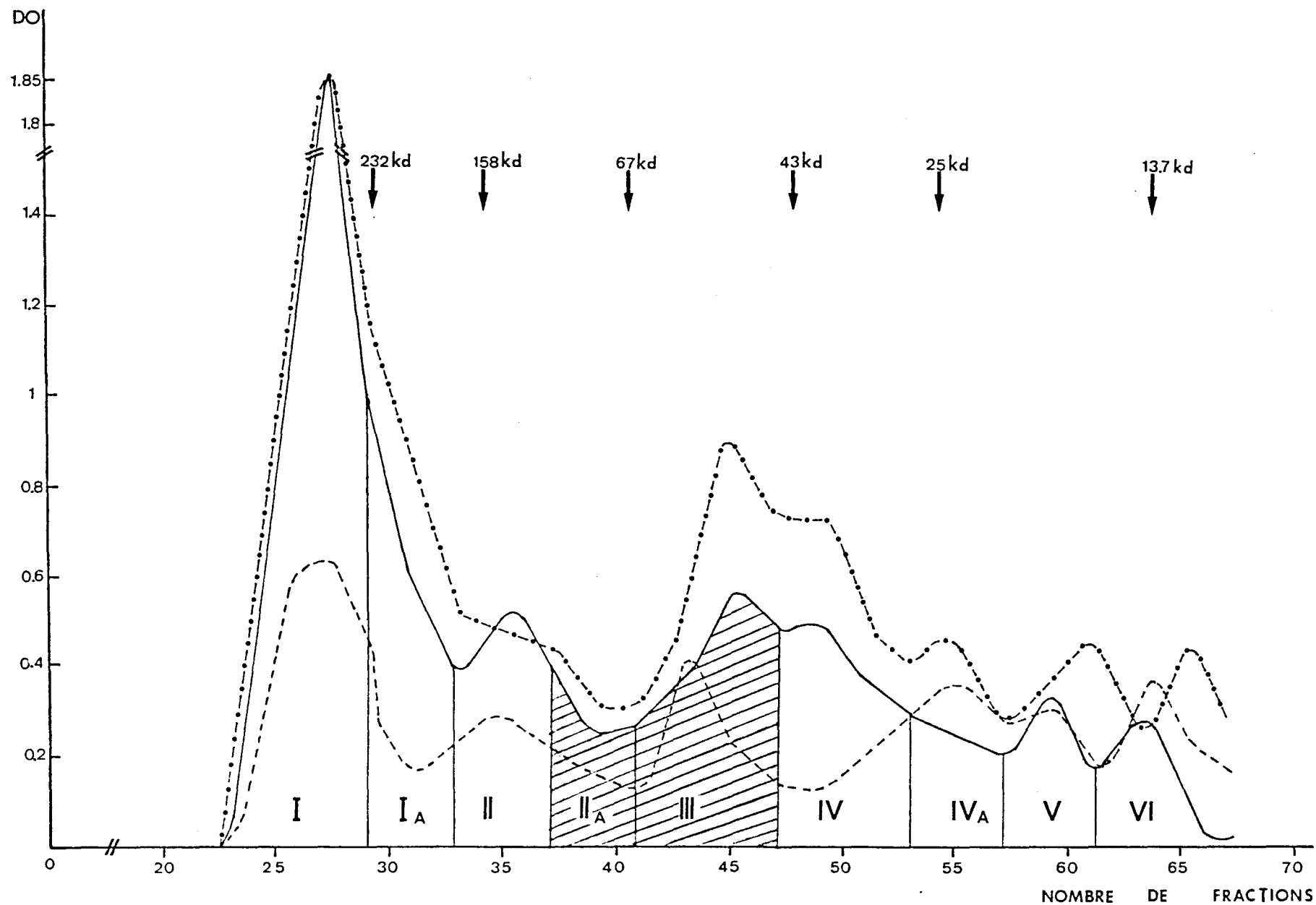


Figure n° 7 : Fractionnement sur colonne de tamisage moléculaire G200SF de l'extrait EC NaCl.



- Profil d'élution obtenu par analyse des protéines (lecture à 280nm)
- Profil d'élution obtenu par analyse des acides nucléiques (lecture à 260nm)
- - - - Profil d'élution obtenu par analyse des oses neutres (dosage au phénol sulfurique)

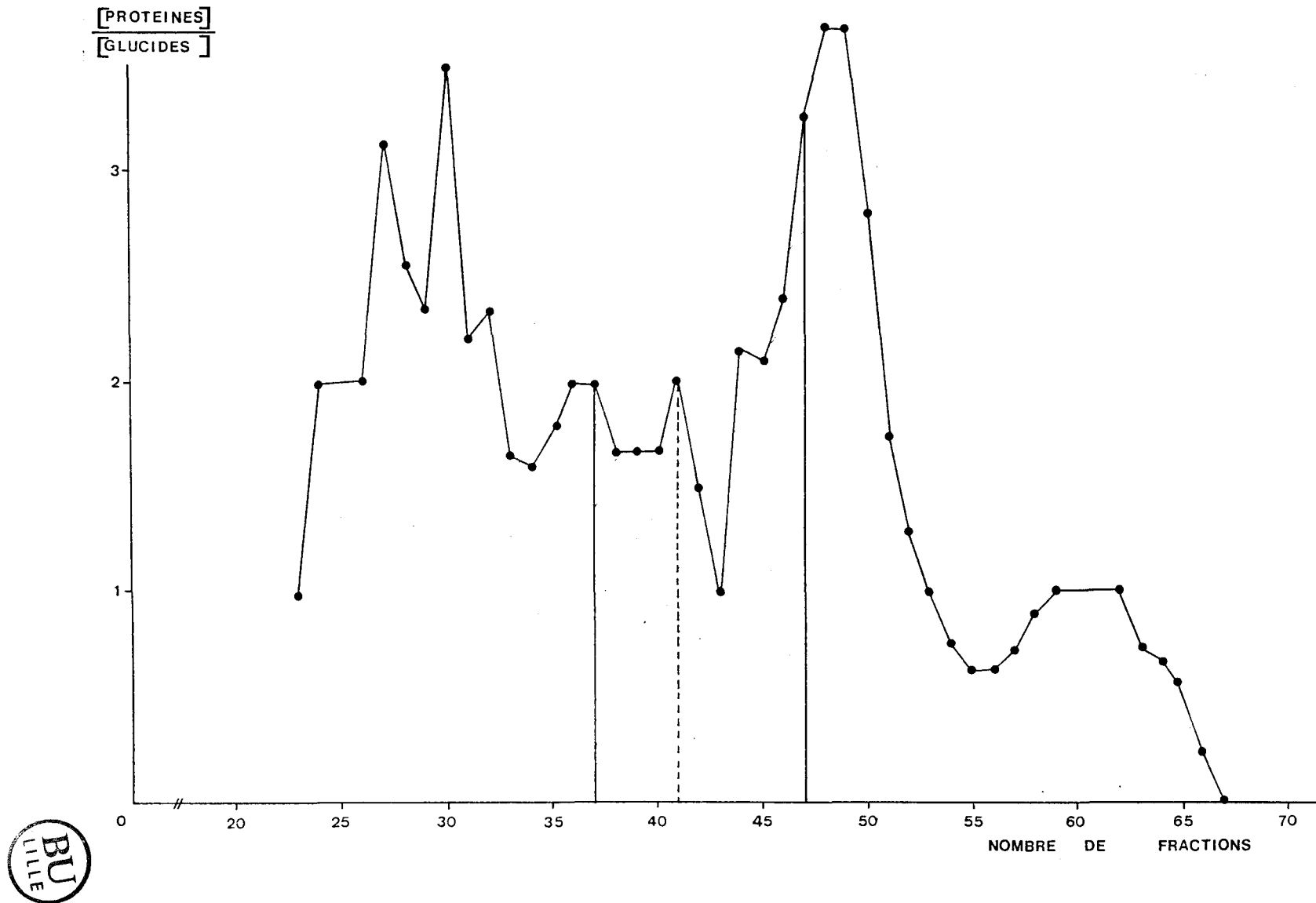


Figure n° 8 : Rapports - Concentration en protéines sur concentration en glucides des différentes fractions éluées par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne G200SF.



seuls le pic II_A (fraction A₁), le pic III (fraction A₂), l'extrait acide perchlorique 0,2 N soluble (extrait E₁) et l'extrait chloroforme/méthanol et éthanol insolubles (extrait F₃) contiennent le composant 5 (voir tableau récapitulatif n°4). L'unique arc de précipitation objectivé avec les fractions A₁, A₂ et l'extrait F₃ présente une réaction d'identité avec l'arc 5 formé vis-à-vis de l'extrait Ec NaCl. Par contre, l'extrait E₁, en plus de l'arc de précipitation 5, objective un autre système précipitant présentant une réaction de coalescence imparfaite avec ce dernier.

Lorsque l'on porte en immunoélectrophorèse ces fractions antigéniques (1 mg/20 µl) contre un HIS anti EC NaCl xp, deux systèmes de précipitation majeurs sont respectivement mis en évidence avec les extraits E₁ et F₃, 5 avec la fraction A₁, 7 avec la fraction A₂ (dont le système de précipitation correspondant au composant 5) (voir tableau récapitulatif n°4).

1.2.1.3. Analyse physicochimique des différentes fractions enrichies en composant 5

Les rendements obtenus pour la préparation des quatre extraits enrichis en composant 5 varient de 2,2 à 6,8 mg par g d'organismes (poids humide) donc de 11 à 34 % par rapport à la quantité d'extrait EC NaCl de départ (voir tableau récapitulatif n°4).

Par rapport à l'extrait EC NaCl, les concentrations en glucides de l'extrait F₃ et de la fraction A₁ sont pratiquement identiques alors que les concentrations en protéines correspondantes sont relativement plus faibles. Par contre l'extrait E₁ et la fraction A₂ s'enrichissent en constituants glucidiques et leurs concentrations en protéines diminuent notablement.

Tableau n° 4 : Tableau récapitulatif de l'analyse biochimique et antigénique des différentes fractions obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire (G200 SF) de l'extrait EC NaCl et par diverses extractions chimiques.

Fractionnement	Fractions obtenues	Quantité obtenue (mg) par g d'organisme (poids humide)	Composition antigénique		Protéine %	Glucide %
			composant 5 (DDG)	Composant antigénique (IEP)		
A Pics G200SF	A ₁ : Pic II _A	3,2 (1)*		A ₁	59 ± 2	19 ± 1
	A ₂ : Pic III	6,8 (1)		A ₂	40 ± 2	45 ± 2
B Phénol 44 % (60°C) + Ethanol (ETOH)	B ₁ : Phénol Insol.	10,6 ± 0,5 (2)	—			
	B ₂ : Phénol sol. ETOH sol.	5,1 ± 0,3 (2)	N.D.		N.D.	N.D.
	B ₃ : Phénol sol. ETOH insol.	1,6 ± 0,2 (2)	—	B ₃	*	
C Acide trichloro- racétique 20 % (TCA 20)	C ₁ : TCA 20 sol.	2,9 ± 0,3 (2)	—	C ₁	23 ± 1	68 ± 2
	C ₂ : TCA 20 insol.	9,9 ± 0,4 (2)	—	C ₂	N.D.	N.D.
D Acide trichloro- racétique 33 % (TCA 33)	D ₁ : TCA 33 sol.	3,5 ± 0,2 (2)	—	D ₁	14 ± 1	70 ± 2
	D ₂ : TCA Insol.	10,3 ± 0,4	—	D ₂	N.D.	N.D.
E Acide perchlo- rique 0,2 N (HClO ₄)	E ₁ : HClO ₄ sol.	2,2 ± 0,1 (2)		E ₁	39 ± 2	52 ± 3
	E ₂ : HClO ₄ Insol.	15,6 ± 0,6 (2)		E ₂	N.D.	N.D.
F Chloroforme- Méthanol (2/1) (C/M) + Ethanol (ETOH)	F ₁ C/M sol.		N.D.		N.D.	N.D.
	F ₂ C/M Insol. ETOH Sol	5,3 ± 0,4 (6)	N.D.		N.D.	N.D.
	F ₃ C/M Insol. ETOH Insol.	2,5 ± 0,2 (6)		F ₃	60 ± 2	18 ± 1

*: Nombre de préparations

1: Extrait EC NaCl

•: SHR (X1)

*: HIS anti-Extrait EC NaCl xp (x3)



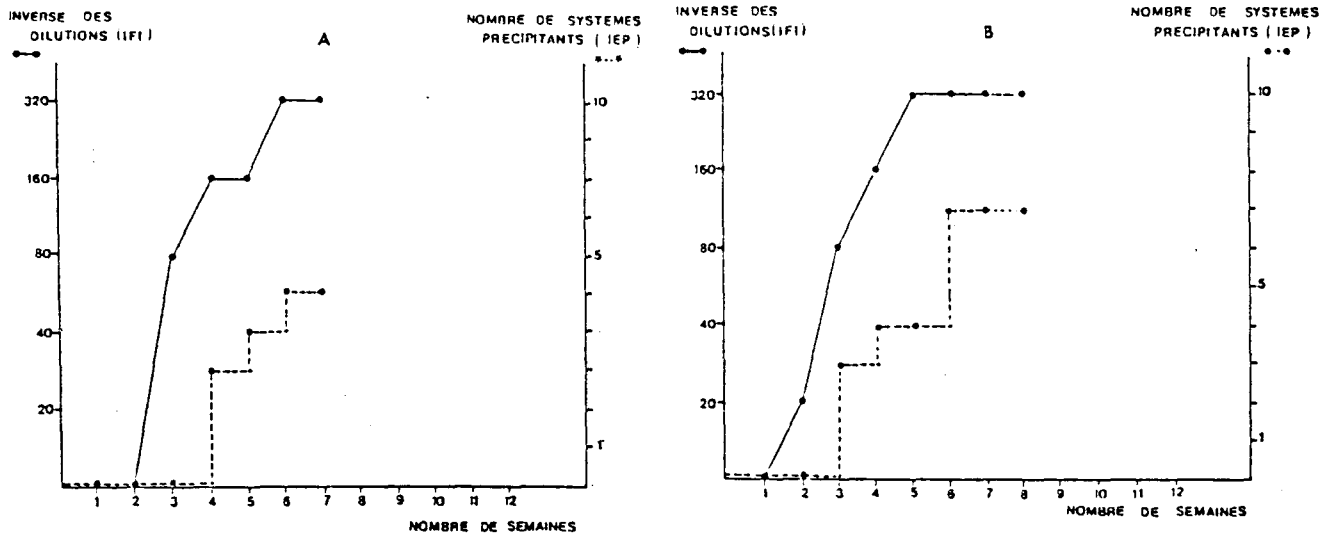
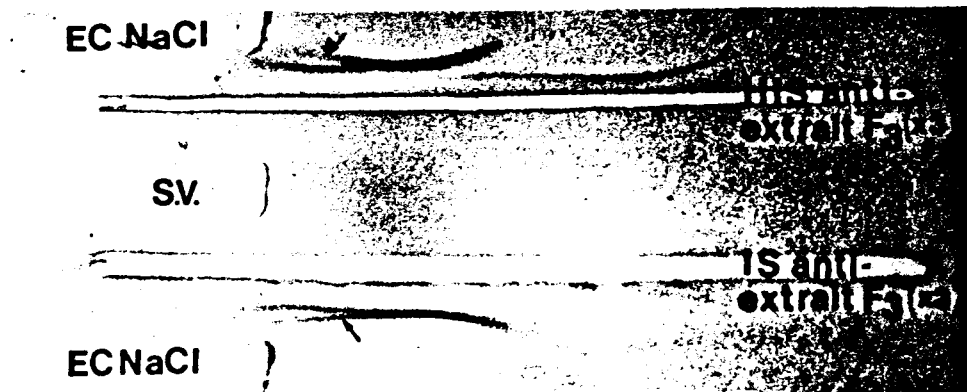


Figure n° 9 : cinétique d'apparition des anticorps par immunofluorescence indirecte et immunoélectrophorèse chez des lapins immunisés par la fraction A₁ (A) ou par la fraction A₂ (B), obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire (G 200 SF) de l'extrait Ec NaCl.

Photo n° 5 : Analyse en immunoélectrophorèse de l'hyperimmunsérum anti-extrait F₃ concentré 3 fois (correspondant à la huitième semaine d'immunisation) et de l'immunsérum anti-extrait F₃ (correspondant à la seconde semaine d'immunisation) vis à vis de l'extrait antigénique total de *T. cruzi* (EC NaCl) et d'un extrait sérum de veau (SV).



BU
LILLE

1.2.1.4. Caractère immunogène des fractions enrichies en composant 5

1 mg de chaque fraction enrichie en composant 5 : E₁, F₃, A₁ et A₂ a servi à préparer des immunosérums (I.S.) chez le lapin à l'aide de la technique d'injections intradermiques (Vaitukaitis) décrite au paragraphe 4.1. du chapitre "Matériel et Méthodes". En outre, l'immunisation hebdomadaire par voie sous-scapulaire réalisée à l'aide de 1 mg d'extraits E₁ et F₃ a permis d'obtenir les hyperimmunosérums (HIS) correspondants. L'apparition et l'intensité de la réponse anticorpale sont analysés en immunofluorescence indirecte (IFI). Le nombre et la nature des systèmes précipitants objectivés au cours des différentes immunisations sont suivis en immunoélectrophorèse (IEP) vis-à-vis de l'extrait Ec NaCl.

Au cours de l'immunisation et l'hyperimmunisation réalisées avec l'extrait E₁, aucun système de précipitation n'a pu être mis en évidence quelque soit la saignée analysée et cela malgré des titres en anticorps significatifs et croissants. Par contre, l'extrait F₃ suscite la production précoce d'anticorps précipitants quelque soit la voie d'immunisation utilisée. Dès la 2^{ème} semaine d'immunisation par voie intradermique, 2 systèmes de précipitation sont objectivés. L'un possède une migration immunoélectrophorétique caractéristique du composant 5 ; l'autre est plus cathodique. Ce profil immunoélectrophorétique est analogue à celui obtenu en opposant l'extrait F₃ à un HIS anti-extrait EC NaCl xp (photo n°5). Aucun autre système précipitant n'est apparu au cours de l'immunisation et le titre en anticorps atteint 1/160 à la 7^{ème} semaine.

L'hyperimmunisation par voie sous scapulaire réalisée avec cet extrait (F₃) a permis de mettre en évidence en immunoélectrophorèse l'apparition d'un 3^{ème} système précipitant de localisation plus anodique à la 8^{ème} semaine d'immunisation (voir photo n°5). De plus, aucun arc de précipitation n'est révélé contre un extrait de sérum de veau.

Les fractions antigéniques A_1 et A_2 injectées par voie intradermique engendrent une production d'anticorps précipitants plus tardive que celle suscitée par l'extrait antigénique F_3 . Pour la fraction A_1 , 4 systèmes de précipitation sont mis en évidence en immunoélectrophorèse à la 7^{ème} semaine d'immunisation (figure n°9A). La fraction A_2 révèle 7 systèmes précipitants à la 8^e semaine d'immunisation (figure n°9B). Les titres en anticorps, corrélés aux résultats obtenus en immunofluorescence, atteignent 1/320 dans les deux cas. Comme pour l'extrait F_3 , le composant 5 détermine la production des premières précipitines observées.

1.2.1.5. Conclusion

L'analyse biochimique, antigénique et l'étude du caractère immunogénique des différentes fractions obtenues soit par fractionnement sur colonne de tamisage moléculaire ou soit par diverses extractions chimiques à partir de l'extrait antigénique total, a permis de mettre en évidence que :

- seules le pic de chromatographie IIA (fraction A_1) correspondant à une zone de poids moléculaire allant de 100 à 65 kilodaltons (Kd), le pic III (fraction A_2) correspondant à une zone de plus faible poids moléculaire de 65 à 40 Kd et les extraits acide perchlorique 0,2 N soluble (extrait E_1) et chloroforme/méthanol, éthanol insolubles (extrait F_3) se sont révélés être des fractions enrichies en composant 5 ;
- parmi celles-ci, les fractions A_1 et A_2 sont antigéniquement plus complexes que les extraits E_1 et F_3 ;
- parmi ces quatre fractions enrichies en composant 5, seules les fractions A_1 , A_2 et l'extrait F_3 suscitent la production d'anticorps précipitants ;

- l'extrait F_3 détermine l'apparition plus précoce d'anticorps anti-composant 5 que les 2 autres fractions A_1 et A_2 lors de l'immunisation expérimentale chez le lapin.

Notre choix s'est donc porté sur l'extrait F_3 pour réaliser une approche biochimique de la purification du composant 5. Cet extrait est appelé "fraction FEC_5 (fraction enrichie en composant 5).

1.2.1.6. Analyse moléculaire de la fraction FEC_5

30 μ g de la fraction FEC_5 sont analysés en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS PAGE (13 %) après coloration des protéines au bleu de Coomassie (conditions réductrices). Le profil polypeptidique obtenu (2) est représenté sur la photo n°6.

Il est relativement simple, si on le compare au profil protéinique complexe objectivé par l'extrait antigénique total de T. cruzi (extrait EC NaCl). On dénombre 6 bandes recouvrant la gamme des poids moléculaires. La bande correspondant à un poids moléculaire de 24 kilodaltons (Kd) est majeure et les 5 autres, ayant respectivement des poids moléculaires de 56 Kd, 43 Kd, 32 Kd, 16 Kd et 12 Kd sont mineures. Si la molécule de 24 Kd est présente dans l'extrait EC NaCl, elle y est révélée de façon mineure.

1.2.2. Fractionnement sur colonne de tamisage moléculaire (G75 SF) de la fraction FEC_5

7 mg de la fraction FEC_5 , resuspendus dans 0,3 ml de tampon d'élu-tion (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4) sont fractionnés sur colonne de tamisage moléculaire Sephadex G75 Superfine (1,5 x 30 cm, débit 5 ml/heure), préalablement équilibrée en tampon d'élu-tion, et, étalonnée comme il est indiqué dans le paragraphe 6.5 du Chapitre "Matériel et Méthodes". La

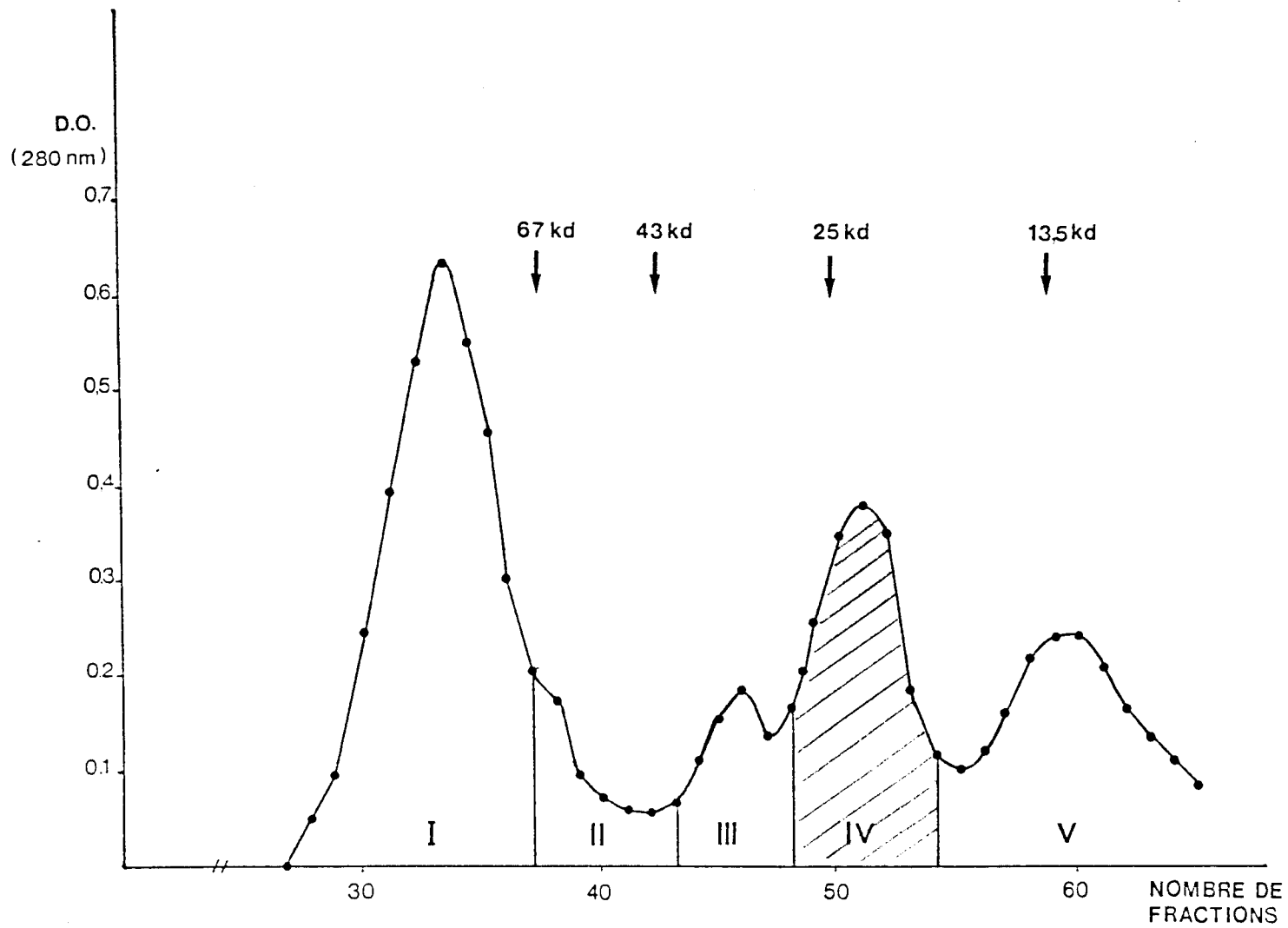


Figure n° 10 : Chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne G75SF de la fraction enrichie en composant 5 (FEC₅). Profil d'élution obtenu par analyse des protéines à 280nm.



figure n°10 représente le profil d'élution obtenu après analyse des protéines à 280 nm dans les différentes fractions collectées. De cette façon, 4 pics protéiques sont ainsi individualisés et 5 fractions sont sélectionnées de façon à minimiser les chevauchements existant entre les pics de chromatographie mis en évidence. Elles correspondent à des zones de poids moléculaire s'échelonnant de 75 Kd à 10 Kd (fraction I \approx 70 Kd ; fraction II \approx 50 Kd ; fraction III \approx 35 Kd ; fraction IV \approx 20 Kd ; fraction V \approx 10 Kd).


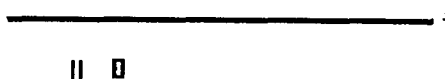
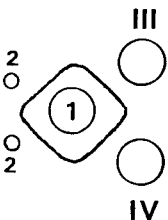

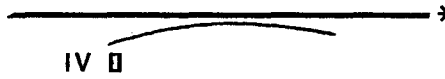
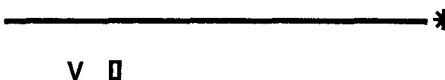
1.2.2.1. Analyse antigénique des différentes fractions obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire

0,25 mg de chaque fraction est porté d'une part en double-diffusion en gel contre le SHR et d'autre part, en immunoélectrophorèse contre un HIS anti-extrait EC NaCl xp. L'analyse en double-diffusion en gel montre que seules les fractions III et IV contiennent le composant 5. Les arcs 5 objectivés par chacune des fractions présentent entre eux une réaction d'identité. L'analyse immunoélectrophorétique ne permet pas d'identifier, dans nos conditions d'analyse, d'autres systèmes précipitants que celui correspondant au composant 5 dans les fractions III et IV. L'arc 5 révélé dans la fraction III possède une migration électrophorétique plus anodique que celui objectivé par la fraction IV (voir Tableau récapitulatif n°5).

La fraction III n'a pu faire l'objet d'une étude plus approfondie, l'analyse antigénique ayant nécessité la totalité de la quantité obtenue. La fraction IV, d'un rendement plus élevé, a permis la réalisation d'une analyse biochimique et l'obtention d'un IS monospécifique anticomposant 5 chez le lapin (cf. paragraphe 1.3.1).

En ce qui concerne l'analyse immunoélectrophorétique des autres fractions, seul un arc de précipitation de faible intensité et de localisation anodique, est identifié dans la fraction I.

Tableau n° 5 : Analyse quantitative et qualitative des différentes fractions obtenues par chromatographie de tamisage moléculaire (G75 SF) de la fraction FEC₅.

Pics sélectionnés	Quantité obtenue		zone de poids moléculaire (kilodaltons)	Composant 5 (DDG)	Nombre de composants antigéniques (IEP)	Protéine %	Glucide %
	(mg)	%					
I	2,872	41	70	—		N.D.	N.D.
II	0,708	10	50	—		N.D.	N.D.
III	0,504	7,2	35			N.D.	N.D.
IV	1,470	21	20			72 ± 2	5,0 ± 0,6
V	1,681	24	15	—		N.D.	N.D.



1: SHR (x1)

2: Extrait EC NaCl

*: HIS anti - extrait EC NaCl xp (x3)

1.2.2.2. Analyse biochimique de la fraction IV

1.2.2.2.1. Analyse moléculaire

L'analyse 30 μg de la fraction IV en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE (13 %) en conditions réductrices, apporte la preuve de la pureté de la préparation obtenue.

En effet, le profil polypeptidique obtenu après coloration au bleu de Coomassie révèle une bande unique correspondant à un poids moléculaire de 24 Kd (photo n°6). Celle-ci correspond à la bande majeure de la fraction FEC_5 analysée dans les mêmes conditions. Ce résultat coïncide avec la zone de poids moléculaire de la fraction IV obtenue par chromatographie de tamisage moléculaire G75 SF de la fraction FEC_5 .

1.2.2.2.2. Rendement, contenu en protéines et en glucides

20 mg d'extrait EC NaCl lyophilisé permettent d'obtenir 2,5 mg de fraction FEC_5 et 0,525 mg de composant 5 purifié correspondant à un poids moléculaire de 24 Kd. Les rendements sont donc de 2,6 % par rapport à l'extrait antigénique total de T. cruzi et de 21 % par rapport à la fraction FEC_5 .

L'antigène 24 Kd est essentiellement constitué de protéines (72 %) et est pauvre en glucides (5 %).

1.3. Approche immunochimique de la purification du composant 5

1.3.1. Sérum anti- antigène 24 Kd

Environ 1 mg de la fraction IV a servi à immuniser un lapin par voie intradermique (Vaitukaitis). L'apparition des anticorps anti-antigène 24 Kd est mise en évidence par analyse, en IEP et en IFI, des différentes saignées hebdomadaires. L'antigène 24 Kd suscite la production rapide d'anticorps précipitants anti-composant 5 chez le lapin. Dès la première semaine, d'immunisation, alors que le titre en anticorps est de 1/40^{ème}, on observe, en immunoélectrophorèse vis-à-vis de l'extrait EC NaCl 20, l'apparition d'un arc de précipitation de faible intensité correspondant au composant 5. Aucun autre système précipitant n'a pu être mis en évidence au cours de l'immunisation (Photo n° 7A). Le titre en anticorps atteint 1/320^{ème} à la 7^{ème} semaine. Par ailleurs, l'immunsérum anti-antigène 24 Kd ne révèle aucun arc de précipitation lorsqu'il est opposé à un extrait de sérum de veau. En double diffusion en gel, cet immunsérum ne révèle que l'arc 5 vis-à-vis de l'extrait EC NaCl (Photo N° 7B).

1.3.2. Isolement du composant 5 par chromatographie d'affinité (Immunoabsorbant)

L'immunoabsorbant est préparé selon le protocole décrit dans le paragraphe 7 du chapitre Matériel et Méthodes. Les immunoglobulines (Iq) de l'I.S. anti-antigène 24 Kd, précipitées au sulfate d'ammonium à 33 % de saturation, sont utilisées comme ligand à raison de 50 mg d'Iq pour 2,5 g de gel sec. L'efficacité du couplage est contrôlée par observation de la diminution de la densité optique du premier surnageant de lavage à 280 nm contenant les Iq non couplées. A partir de 50 mg d'extrait EC NaCl lyophilisé mis en contact avec 8 ml de gel de Sepharose Iq IS anti-antigène 24 Kd, il est possible d'obtenir, après élution par dissociation à pH acide, 0,823 mg de la fraction constituée de molécules ayant une affinité avec les anticorps anti-antigène 24 Kd. Elle correspond donc au composant

5, isolé à partir de l'extrait EC NaCl. La première fraction éluée est composée de molécules n'ayant pas d'affinité avec le ligand.

1.3.3. Analyse du composant 5 isolé à partir de l'extrait EC NaCl

L'analyse en immunoélectrophorèse de la fraction éluée à pH acide (200 μ g), opposé à un HIS anti-EC NaCl xp absorbé au sérum de veau montre que seul l'arc de précipitation correspondant au composant 5 est objectivé (Photo n° 8A).

L'analyse en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE (conditions réductrices) du composant 5 isolé (30 μ g) permet d'apprécier son poids moléculaire (Photo N°9). Le profil polypeptidique, obtenu après coloration au bleu de Coomassie, révèle une bande majeure correspondant à un poids moléculaire de 72 000 daltons et trois autres bandes mineures ayant respectivement des poids moléculaires de 90 000, 51 000 et 43 000 daltons. Le composant 5 ainsi isolé contient 56 % de protéines et 42 % de glucides. Elle s'enrichit en glucides mais s'appauvrit en protéines par rapport à l'extrait EC NaCl.

0,5 mg du composant 5 isolé par chromatographie d'affinité ont servi à immuniser un lapin par voie intradermique selon la technique décrite dans le paragraphe 4.1. du chapitre "Matériel et Méthodes". Les résultats obtenus en immunofluorescence indirecte corrélés au nombre de systèmes précipitants objectivés en immunoélectrophorèse vis-à-vis de l'extrait EC NaCl montre l'apparition précoce des anticorps anti-composant 5, deux semaines après l'immunisation. L'analyse en immunoélectrophorèse et en double-diffusion en gel (DDG) (macrométhode) vis-à-vis de l'extrait EC NaCl démontre la monospécificité de l'immunsérum obtenu 2 mois après l'immunisation (Photos 8B et 8C). Les titres en anticorps les plus hauts sont obtenus entre la cinquième et la huitième semaine après l'immunisation (1/640) et diminuent ensuite. En DDG, l'arc 5 objectivé par cet immunsérum

vis-à-vis de l'extrait antigénique total présente une réaction d'identité avec celui révélé par l'IS anti-antigène 24 Kd contre le même extrait (Photo n° 7B).

1-4 Conclusion

Les différentes approches (biochimique et immunochimique) de la purification du composant 5, menées à partir des formes épimastigotes de T. cruzi, nous ont permis de démontrer que :

- les formes épimastigotes de culture constituent une source abondante du composant 5
- le composant 5 ne correspond pas à une entité moléculaire mais est constitué de plusieurs molécules dont une glycoprotéine majeure ayant un poids moléculaire de 72 Kd
- selon la voie de purification mise en jeu, les molécules sont différemment représentées ; notamment une extraction chloroforme/méthanol suivie d'une précipitation à l'éthanol conduit à l'obtention, en quantité relativement importante, d'une fraction enrichie en antigène 24 Kd qui, après purification, s'avère conserver toutes les propriétés antigéniques et immunogéniques du composant 5.

La détection par Fruit et al. (1978) du composant 5 à la surface des formes épimastigotes de T. cruzi nous a conduit à mettre en évidence sa nature exoantigénique. En effet, la présence du composant 5 dans le surnageant de milieu de culture correspondant pourrait représenter une autre source alternative de composant 5 facile à obtenir. C'est pourquoi nous allons développer un second paragraphe concernant "la purification du composant 5 à partir du surnageant de milieu de culture des formes épimastigotes de T. cruzi."

Photo n°6 : Analyse polypeptidique en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE (13 %) en conditions réductrices de l'extrait chloroforme/méthanol et éthanol insoluble (fraction enrichie en composant 5, FEC₅) (2) et de la fraction IV (1) obtenue par chromatographie de tamisage moléculaire de la fraction FEC₅. L'analyse polypeptidique de la fraction IV apporte la preuve de la pureté de la préparation obtenue ; une seule bande d'un poids moléculaire de 24 Kd est révélée et correspond à la bande majeure objectivée par la fraction FEC₅ ; si elle est présente dans l'extrait EC NaCl (3), elle y est révélée de façon mineure.

Photo n°7 : Contrôle de monospécificité, par immunoélectrophorèse (A) et double diffusion en gel (B) de l'IS anti-antigène 24 Kd concentré 3 fois (2) opposé à l'extrait EC NaCl (1) de T. cruzi. Celui-ci ne révèle que le système de précipitation correspondant au composant 5. L'IS anti-antigène 24 Kd présente une réaction d'identité avec l'IS anti-composant 5 isolé par IADS (3) en double-diffusion en gel (B).

Photo n°8 : Analyse antigénique du composant 5 isolé par IADS et de l'immunsérum (IS) correspondant chez le lapin.

A. Analyse immunoélectrophorétique du composant 5 isolé par I.A.D.S. (1) vis-à-vis d'un HIS anti-extrait EC NaCl x p (2), ne révélant que le système de précipitation correspondant au composant 5.

B. Contrôle de monospécificité par immunoélectrophorèse de l'IS anti-composant 5 isolé par IADS (3) opposé à l'extrait EC NaCl. Seul, le système de précipitation correspondant au composant 5 est révélé.

C. Contrôle de monospécificité par double diffusion en gel de l'IS anti-composant 5 isolé par IADS (3) opposé à l'extrait EC NaCl, ne révélant que le système précipitant correspondant au composant 5.

Photo n°9 : Analyse polypeptidique en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE (13 %) en conditions réductrices du composant 5 isolé par IADS (1) à partir de l'extrait EC NaCl (2). Une bande majeure correspondant à un poids moléculaire de 72 Kd et trois autres bandes mineures ayant respectivement des poids moléculaires de 90,51 et 43 Kd sont révélées.

PHOTO n° 6

1 2 3

94kd →

67kd →

43kd →

30kd →

20kd →

14kd →

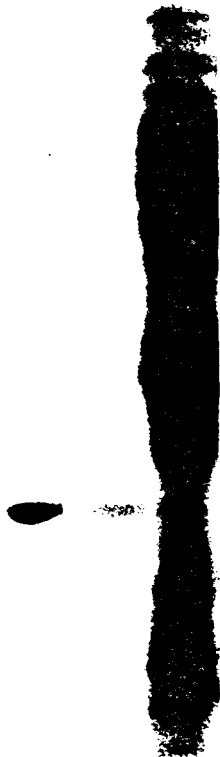
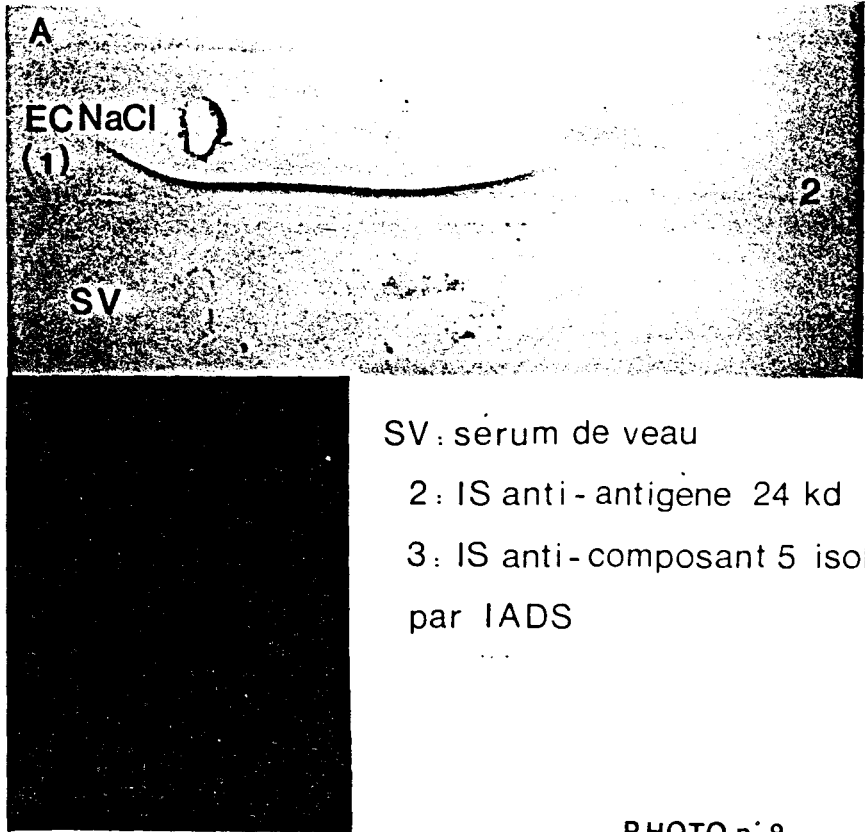


PHOTO n° 7



SV: sérum de veau

2: IS anti - antigène 24 kd

3: IS anti - composant 5 isolé par IADS

PHOTO n° 9

1 2

94kd →

67kd →

43kd →

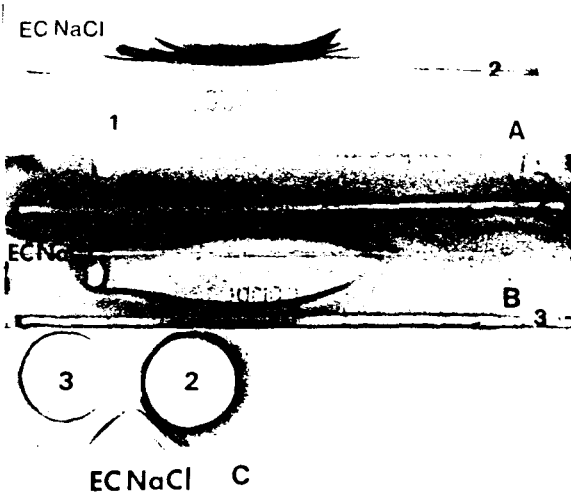
30kd →

20kd →

14kd →



PHOTO n° 8



1: Composant 5 isolé par IADS

2: HIS anti - extrait ECNaCl

3: IS anti - composant 5 isolé par IADS

2. PURIFICATION DU COMPOSANT 5 A PARTIR DU SURNAGEANT DE MILIEU DE CULTURE DE FORMES EPIMASTIGOTES DE T. CRUZI

La préparation de fractions concentrées de surnageant de milieu de culture (SMC) de 7 jours conduit à la mise en évidence du composant 5 dans le milieu de culture de formes épimastigotes de T. cruzi. La cinétique d'apparition de ce composant antigénique dans le SMC est étudiée au cours de la culture. Enfin, la préparation d'une fraction enrichie en composant 5 a précédé sa purification et sa caractérisation biochimique.

2.1. Préparation de fractions concentrées de SMC

Les diverses étapes qui conduisent à l'obtention de fractions concentrées de SMC sont schématisées dans la figure n°6 et sont décrites en détail au paragraphe 6.3, chapitre "Matériel et Méthodes".

Les diverses observations effectuées en microscopie optique montrent que le SMC ainsi traité est totalement dépourvu de formes parasitaires. Le fractionnement du SMC par ultrafiltrations permet d'obtenir 2 fractions concentrées U_{50} et U_{10} . Ce dernier traitement enrichit respectivement la fraction U_{50} en molécules ayant un poids moléculaire supérieur à environ 50 000 daltons et la fraction U_{10} en molécules ayant un poids moléculaire compris entre environ 10 000 et 50 000 daltons.

2.1.1. Rendements obtenus

Trois litres de culture massive de 7 jours conduit à l'obtention de $2,5 \pm 0,3$ g de la fraction U_{50} et $1,5 \pm 0,2$ g de la fraction U_{10} . Ces résultats expriment en fait la moyenne arithmétique des rendements obtenus

pour 3 préparations successives (tableau n°6). Trois litres de milieu de culture GLSH, ne contenant pas de parasite, traités dans les mêmes conditions donnent des rendements similaires.

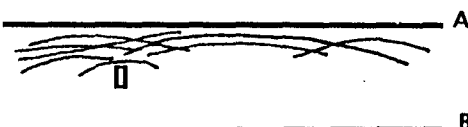



2.1.2. Analyse antiqénique des fractions U₅₀ et U₁₀

Cette analyse est résumée dans le tableau n°6. En double-diffusion en gel, les fractions U₅₀ (20 mg/20 µl) et U₁₀ (30 mg/20 µl) opposées au sérum humain de référence (SHR) révèle la présence du composant 5 dans la fraction U₅₀ et son absence dans la fraction U₁₀ (Photo n°10). La même analyse ne permet pas de le mettre en évidence dans le SMC non concentré (20 µl) ni dans la fraction témoin correspondante U_{50C} (20 mg/20 µl). Les concentrations utilisées correspondent à la limite de solubilité de ces produits. L'étude immunoélectrophorétique, menée à l'aide de l'HIS anti-extrait EC NaCl xp préalablement adsorbé par le sérum de veau, confirme ces résultats. En outre, elle permet d'identifier dans la fraction U₁₀ un autre composant antiqénique de localisation immunoélectrophorétique plus anodique que le composant 5 (Tableau n°6). Lorsque l'on oppose les fraction U₁₀ (30 mg/20 µl) et U₅₀ (20 mg/20 µl) à un HIS anti-sérum de veau en IEP, 3 et 8 arcs de précipitation sont respectivement révélés.

2.2. Etude qualitative et quantitative de la présence du composant 5 dans le SMC

Après avoir identifié le composant 5 dans le SMC d'une culture massive de 7 jours, il était intéressant d'étudier la cinétique d'apparition de ce composant dans ce même milieu au cours de la culture. Pour cela, une cinétique de culture a été initiée selon le protocole décrit dans le paragraphe 6.4. du chapitre "Matériel et Méthodes", parallèlement à une étude

Tableau n° 6 : tableau récapitulatif de l'analyse antigénique des différentes fractions concentrées (U₅₀ et U₁₀) de surnageant de milieu de culture et de l'extrait chloroforme-méthanol insoluble et éthanol insoluble (E₅₀) obtenu à partir de la fraction U₅₀.

Fraction	Quantité obtenue (g) pour 3 litres de SMC	composant 5	Composition antigénique nombre de composants antigéniques
SMC	5,3 ± 0,4 (3)*	-	SMC 
U ₅₀	2,5 ± 0,3 (3)*	+	U ₅₀ 
U ₁₀	1,5 ± 0,2 (3)*	-	U ₁₀ 
E ₅₀	0,875 ± 0,005 (3)*	+	E ₅₀ 

* nombre de préparations

SMC : 50 mg / 20 µl

U₅₀ : 20 mg / 20 µl

U₁₀ : 30 mg / 20 µl

E₅₀ : 3 mg / 20 µl

A: HIS anti- sérum de veau (x3)

B: HIS anti-extrait EC NaCl xp (x3)



qualitative et quantitative de la présence du composant 5 dans les différentes fractions U_{50} correspondantes.

2.2.1. Cinétique d'apparition du composant 5 dans le SMC durant le processus de culture

La courbe représentant le logarithme décimal du nombre de parasites par ml en fonction du temps est donnée dans la figure n°10. Le développement de la culture peut être décomposé schématiquement en 4 phases

- la phase de latence qui correspond aux 3 premiers jours de la culture
- la phase de multiplication exponentielle entre le 4^{ème} et le 9^{ème} jour de culture
- la phase stationnaire entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de culture
- la phase de lyse qui succède à la phase stationnaire.

Les contrôles effectués en microscopie optique sur les différentes fractions U_{50} analysées au cours de la culture montrent qu'elles sont exemptes de toute forme parasitaire après centrifugation et filtration. Lors du comptage des formes épimastigotes durant la cinétique de culture réalisée, des formes rondes et immobiles, flagellées ou non, encore appelées formes "sphaeromastigotes" sont observées en microscopie optique à partir du 10^{ème} jour de la culture. Leur nombre augmente très rapidement dans les jours qui suivent leur apparition. Ces formes correspondraient à des organismes en voie de lyse.

Les différentes fractions U_{50} (20 mg/20 μ l) correspondant aux jours 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22 et 24 de la culture, sont portées en double-diffusion en gel contre le SHR. La photo n°11 montre que les fractions U_{50} correspondant au temps 0 et aux 4 premiers jours de la culture ne contiennent pas le composant 5 et qu'il est possible, dans nos conditions d'expérience, de le détecter à partir du 5^{ème}

jour de culture jusqu'au dernier jour analysé. Le composant 5 apparaît donc entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour dans le SMC, c'est-à-dire en phase exponentielle de multiplication des parasites.

2.2.2. Dosage du composant 5 au cours de la culture

Les différentes fractions U_{50} , testées en DDG ont été analysées en immunodiffusion radiale, dans un gel d'agarose contenant le SHR anti-5 selon le protocole décrit dans le paragraphe 5.1.4. au chapitre Matériel et Méthodes. Des solutions mères de 50 mg pour 50 μ l sont préparées. 20 μ l de chaque fraction sont déposés dans les différents puits. La courbe qui représente le diamètre au carré de l'anneau de précipitation (d^2) moins le diamètre au carré du puits de dépôt (d_0^2), des différentes fractions U_{50} analysées en fonction du temps est donnée figure n°11. La valeur $d^2-d_0^2$ est elle-même proportionnelle à la concentration du composant 5 dans la fraction analysée. Nous avons cherché à assimiler la courbe obtenue à une fonction mathématique. Cette analyse nous a donné les résultats suivants :

- Droite	a = + 26,42	b = + 2,44	r = 0,61
- Exponentielle	a = + 14,74	b = + 0,09	r = 0,27
- Logarithmique	a = - 19,08	b = + 31,9	r = 0,80
- Puissance	a = + 2,17	b = + 1,26	r = 0,42

Cette courbe peut donc être assimilée à une fonction logarithmique $y = - 19,08 + 31,9 \text{ Log } x$ avec un coefficient de corrélation de 0,80- ($y = d^2-d_0^2$ et $x = \text{Jour de culture}$).

Donc le composant 5 apparaît entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour de la culture durant la phase exponentielle de croissance des parasites et sa concentration augmente de façon logarithmique, ultérieurement.

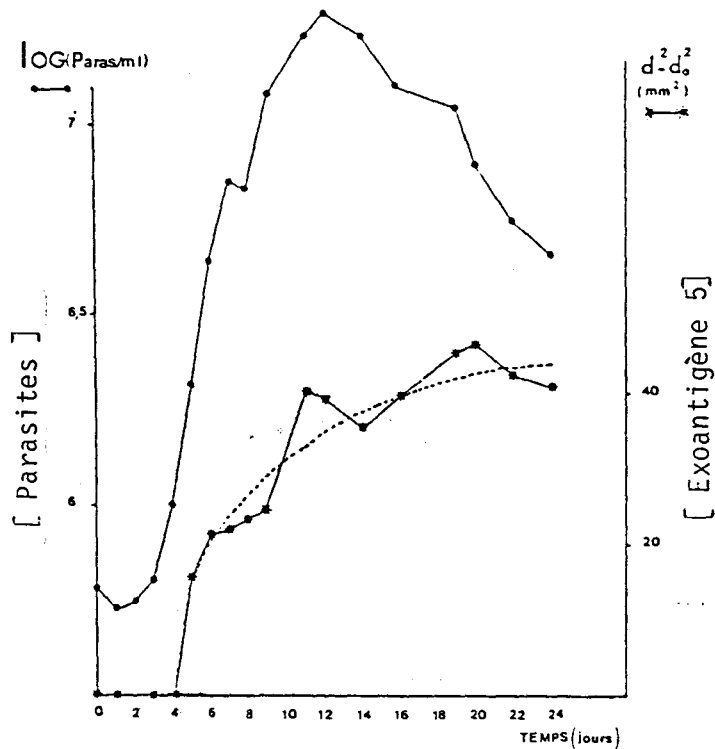
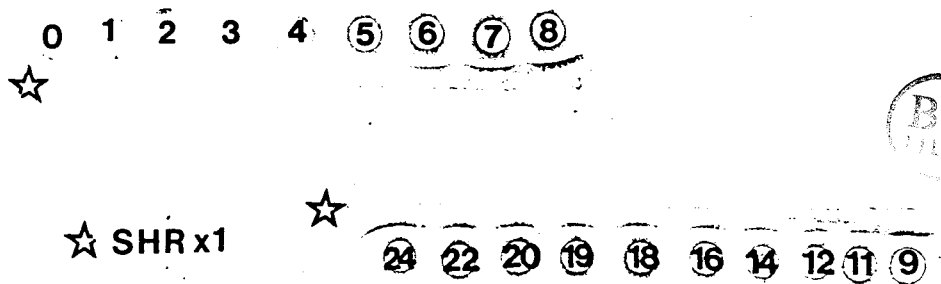


Figure n° 11 : cinétique d'apparition du composant 5 dans le surnageant du milieu de culture (SMC) durant le processus de culture.

Photo n° 11 : Analyse en double diffusion en gel des différentes fractions U₅₀ correspondant aux jours 0, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22 et 24 de la culture vis à vis du sérum humain de référence (SHR).



SHR : Sérum humain de référence riche en anticorps anti-composant 5 utilisé non concentré.
Le composant 5 est mis en évidence à partir du cinquième jour de la culture.

2.3. Obtention d'une fraction enrichie en composant 5 à partir de la fraction U₅₀

La fraction U₅₀ est soumise à une extraction chloroforme/méthanol (2V-1V) suivie d'une précipitation à l'éthanol selon le protocole décrit dans le paragraphe 6.5.4, chapitre "Matériel et Méthodes". L'extrait chloroforme/méthanol et éthanol insolubles (extrait E₅₀) est analysé.

2.3.1. Rendement, contenu en protéines et en glucides

1 g de fraction U₅₀ permet l'obtention de 35 ± 2 mg d'extrait E₅₀. Ce résultat tient compte des quantités obtenues pour 6 préparations successives. L'extrait E₅₀ contient 60 ± 3 % de protéines et 18 ± 2 % de glucides.

2.3.2. Analyse antiqénique de l'extrait E₅₀

Lorsque l'extrait E₅₀ (3 mg/20 μ l) est porté en double diffusion en gel contre le SHR, un seul arc de précipitation présentant une réaction d'identités avec le système de précipitation correspondant au composant 5 est révélé (Photo n°10). Cette même photo montre aussi que l'extrait E_{50C} (extrait témoin) n'objective aucun arc de précipitation vis-à-vis du même sérum. L'analyse immunoélectrophorétique révèle la formation d'un seul système précipitant intense correspondant au composant 5 lorsque l'extrait E₅₀ (3 mg/20 μ l) est opposé à un HIS anti-extrait EC NaCl xp préalablement absorbé par le sérum de veau. Enfin, opposé à un HIS anti-sérum de veau, l'extrait E₅₀ objective 3 arcs de précipitation (Tableau n°6).

2.3.3. Analyse polypeptidique de l'extrait E₅₀

50 µg de l'extrait E₅₀ sont analysés en immunoélectrophorèse de gel de polyacrylamide SDS PAGE (13 %) en conditions réductrices. Le profil polypeptidique obtenu après coloration au bleu de Coomassie est représenté dans la photo n°12. Il révèle une bande majeure correspondant à un poids moléculaire de 43 000 daltons et 6 autres bandes mineures de 120 000 à 30 000 daltons.

2.4. Purification du composant 5 identifié dans le surnageant de milieu de culture par immuno-adsorption

2.4.1. Approche de la purification

L'immunoadsorbant qui a conduit à la purification du composant 5 à partir de l'extrait EC NaCl (voir paragraphe 1.3.2. du chapitre "Résultats") est utilisé pour isoler le composant 5 détecté dans le SMC. 200 mg de l'extrait E₅₀, repris dans 5 ml d'une solution de NaCl 0,5 M tamponnée à pH 7,4 est mise en contact avec 8 ml de gel de sépharose couplé aux immunoglobulines anti-antigène 24 Kd. Il est possible d'obtenir 0,447 mg de la fraction éluée à pH acide qui présente donc une affinité avec les anticorps anti-composants 5. Elle correspond donc au composant 5 isolé à partir du SMC.

2.4.2. Analyse de l' "exoantigène 5" isolé par chromatographie d'affinité

Opposé à un HIS anti-extrait EC NaCl xp en immunoélectrophorèse, l' "exoantigène 5" (200 µg) révèle un seul arc de précipitation correspondant au composant 5. Par contre, aucun système de précipitation n'est mis en évidence contre un HIS anti-sérum de veau (Photo n° 13A). La même analyse, réalisée en double diffusion en gel (microméthode) confirme ce résultat (Photo n°13B). Cette dernière photo montre aussi que les arcs de précipitation 5, révélés par l' "exoantigène 5" vis-à-vis du sérum anti-antigène 24 Kd, de l'IS produit contre le composant 5 isolé par immunoadsorption à partir de l'extrait EC NaCl, et de l'HIS anti-extrait EC NaCl xp présentent des réactions d'identité entre eux.

L'analyse de 30 µg de l' "exoantigène" 5 en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE, après coloration des protéines au bleu de Coomassie permet d'apprécier son poids moléculaire. Le profil peptidique obtenu est représenté dans la photo n°12. Il révèle 3 bandes. La majeure, objectivée avec une faible intensité, dans le profil peptidique de l'extrait E₅₀, présente un poids moléculaire de 72 000 daltons. Les deux autres molécules très mineures correspondent respectivement à des poids moléculaires de 51 000 et 43 000 daltons. L'"exoantigène" 5 contient 62 % de protéines et 38 % de glucides. Sa composition en protéines et en glucides est proche de celle trouvée pour le composant 5 isolé à partir de l'extrait EC NaCl. 200 mg de l'extrait E₅₀ correspondent au traitement de 6,7 litres de SMC et permettent d'obtenir 447 µg d'"exoantigène" 5. Le rendement de la purification est donc de 0,22 %.

Photo n°10 : Recherche de la présence du composant 5 par double diffusion en gel à l'aide du SHR non concentré (2) dans les fractions U₅₀, U₁₀ et E₅₀. Le composant 5 est mis en évidence dans les fractions U₅₀ (20 mg/20 µl) et E₅₀ (3 mg/20 µl) mais n'est pas révélé dans le surnageant de milieu de culture non concentré (SMC, 20 µl) ni dans la fraction (U₁₀) (30 mg/20 µl) et les fractions témoins correspondantes (U_{50C} et E_{50C}).

Photo n°12 : Analyse polypeptidique en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE 13 % en condition réductrice des fractions U₅₀(1), E₅₀(2) et de l'"exoantigène" 5 isolé par IADS (3).

L'"exoantigène" 5 isolé par IADS à partir de l'extrait enrichi en composant 5, E₅₀ révèle une bande majeure de 72 Kd de poids moléculaire. Deux autres molécules ayant des poids moléculaires de 51 et 43 Kd sont aussi objectivées de façon très mineure.

Photo n°13 : Analyse antigénique de l'"exoantigène" 5 isolé par IAD_S (1) vis-à-vis d'un HIS anti-extrait EC NaCl x p (2) et d'un HIS anti-extrait sérum de veau (3) par immunoélectrophorèse (A) et double diffusion en gel (B).

A - Seul le système précipitant correspondant au composant 5 est révélé. Aucun contaminant de sérum de veau n'est mis en évidence.

B - Opposé à un HIS anti-extrait EC NaCl en double-diffusion en gel, l'"exoantigène" 5 isolé par IAD_S (1) ne révèle que l'arc de précipitation correspondant au composant 5. Celui-ci présente une réaction d'identité avec les arcs 5 objectivés par l'"exoantigène" 5 vis-à-vis de l'IS anti-antigène 24 Kd (4) et l'IS anti-composant 5 isolé par IADS (5) à partir de l'extrait EC NaCl.

PHOTO n° 10

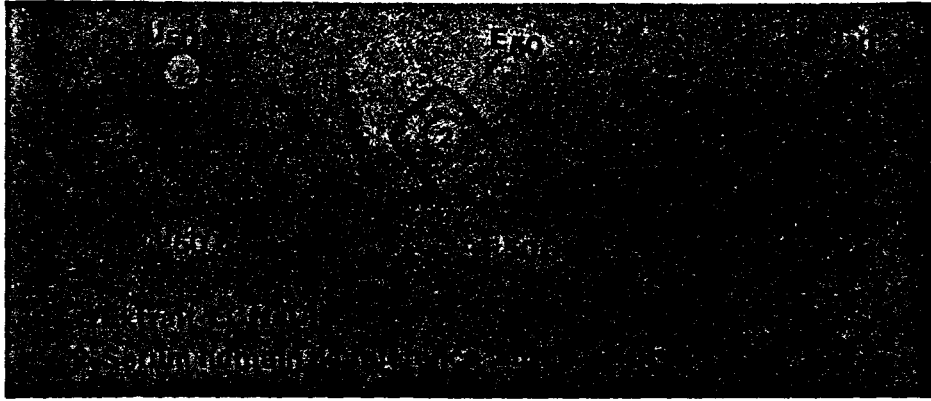


PHOTO n° 12

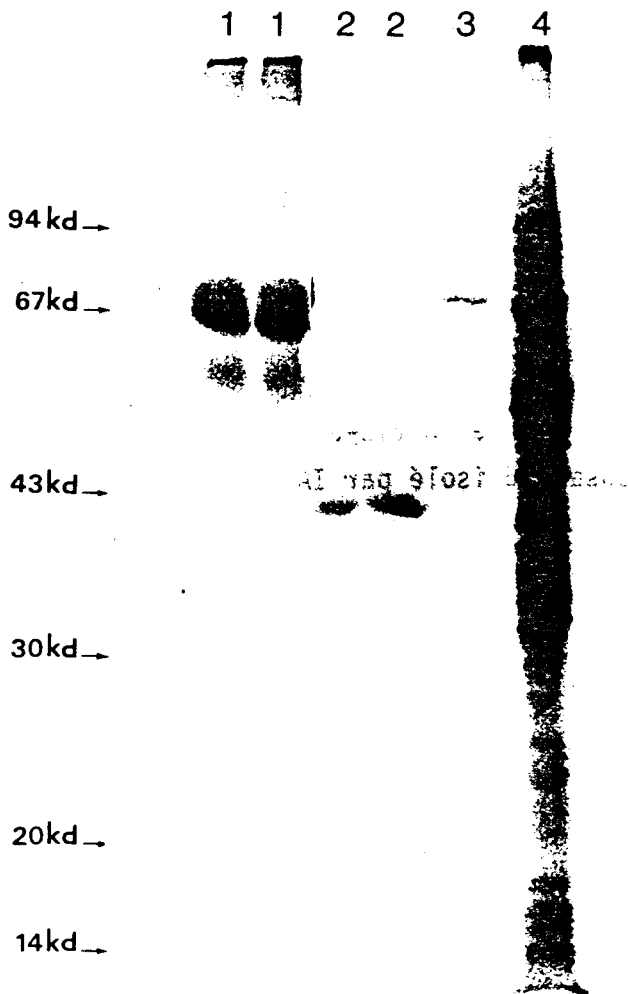
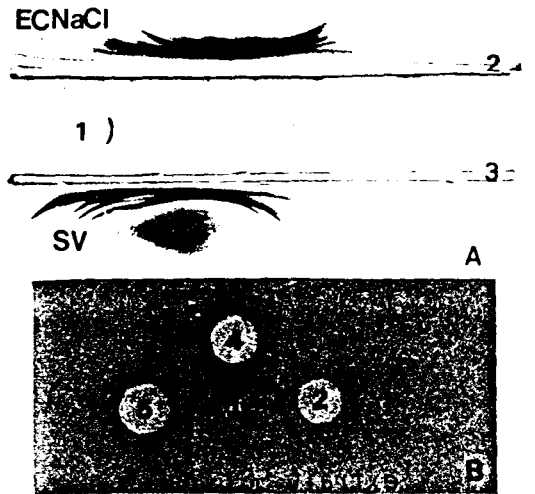


PHOTO n° 13



1. "Exoantigène 5" isolé par IADS
2. HIS anti - extrait EC NaCl xp
3. HIS anti - sérum de veau
4. IS anti-antigène 24 kd
5. IS anti-composant 5 isolé par IADS



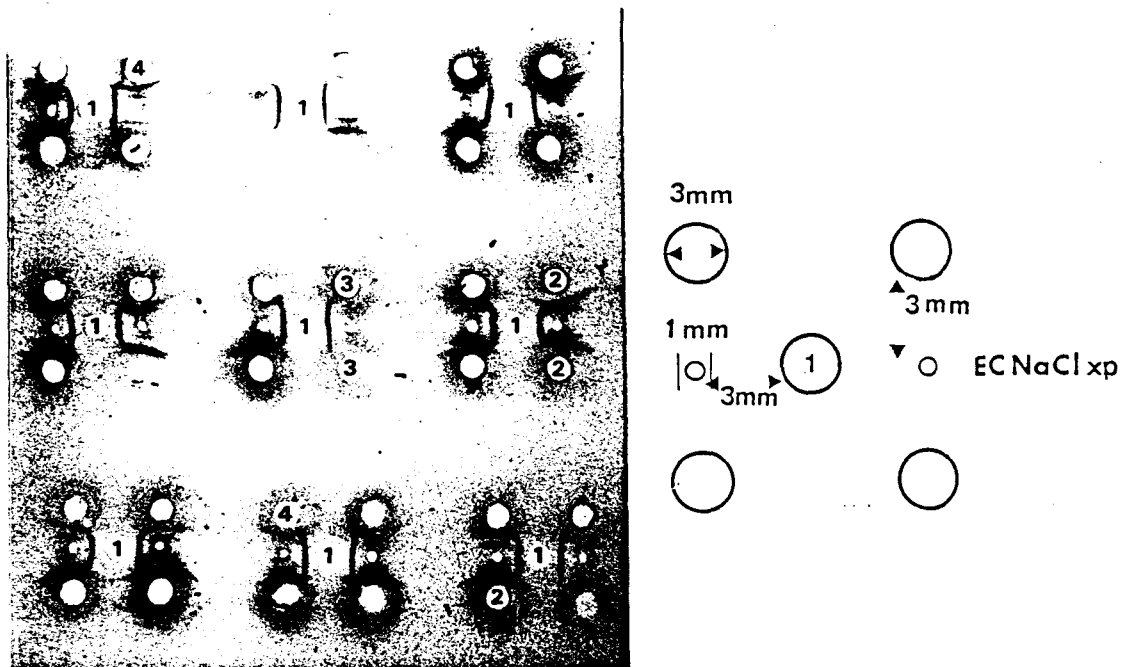
3. RECHERCHE DE LA PRESENCE DES ANTICORPS ANTI-COMPOSANT 5 DANS LES SERUMS DE PATIENTS CHAGASIQUES. INTERET DIAGNOSTIQUE

Dans ce chapitre sont évaluées la sensibilité et la spécificité de différentes techniques sérologiques fondées sur la détection des anticorps anti-composant 5 contenus dans les sérums de patients atteints de la maladie de Chagas. L'obtention d'un sérum polyclonal anti-composant 5 nous a tout d'abord guidé vers l'utilisation des techniques de précipitation en gel : la microdouble diffusion en gel d'agarose et l'immunoélectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose. Dans un deuxième temps, l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-composant 5 produit par Orozco (1983) (cf paragraphe 5.4. du chapitre "Matériel et Méthodes) et de la fraction enrichie en composant (FEC₅) nous a permis de réaliser le diagnostic spécifique de la phase chronique de la maladie de Chagas.

3.1. Microdouble diffusion en gel utilisant un sérum polyclonal anti-composant 5 (Test MDP₅)

343 sérums de patients chagasiques chroniques provenant de diverses zones géographiques de Bolivie et présentant un diagnostic sérologique positif (3 techniques sérologiques sur 4 positives), 67 sérums de sujets boliviens et 10 sérums de sujets européens à sérologie négative, sont analysés en microdouble diffusion en gel en disposant les réactifs comme il est indiqué dans la photo n°14. Les sérums de patients révélant un arc de précipitation présentant une réaction d'identité avec l'arc 5 formé entre le sérum anti-antigène 24 Kd et l'extrait EC NaCl xp sont dits positifs dans le test MDP₅. Dans le cas contraire, ils sont dits négatifs.

Photo n° 14 : Microdouble-diffusion en gel utilisant un sérum polyclonal anti-composant 5 (test MDP₅) pour la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques par identité d'arc 5.



- 1 - IS anti-antigène 24kd (non concentré)
- 2 - Sérums de patients chagasiques (concentrés 3 fois, positifs dans le test MDP₅)
- 3 - Sérums d'individus non chagasiques (concentré 3 fois) négatifs dans le test MDP₅.
- 4 - Sérums de patients chagasiques (concentré 3 fois) négatifs dans le test MDP₅.

Photo n° 15 : Immunolectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose pour la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chagasiques par identité d'arc 5.



- 1 - Extrait EC NaCl x p
- 2 - IS anti-antigène 24kd (non concentré).
- 3 - Sérum de patient chagastique (non concentré) positif dans ce test.
- 4 - Sérum de patient chagastique (non concentré) négatif dans ce test.

L'extrait EC NaCl xp est utilisé comme source antigénique dans ce test car il révèle un plus grand nombre de déterminants antigéniques et est plus facilement standardisable que l'extrait EC NaCl (cf paragraphe 1.1. du chapitre "Résultats").

Lorsque les sérums testés sont concentrés 3 fois, 237 sur 343 sérums de patients chagasiques présentent un test de MDP₅ positif (69,1 %) (tableau n°7). Seule une différence significative du nombre d'individus présentant dans leur sérum des anticorps anti-composant 5 est observée entre les populations de Chiwisivi et de salinas (test de χ^2 , $p < 0,05$). 81,1 % de positivité du test est obtenu lorsque les sérums testés, sont concentrés 5 fois (tableau n°7). Dans ces conditions d'analyse, aucune différence significative n'est observée entre les quatre populations analysées quant au nombre d'individus présentant dans leur sérum des anticorps anti-composant 5 (test de χ^2 , $p > 0,05$). Tous les sérums boliviens et européens à sérologie négative se sont révélés négatifs dans ce test (tableau n°7).



3.2. Immunoélectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose

La présence des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients testés est affirmée par la révélation d'une identité d'arc de précipitation avec le sérum anti-antigène 24 Kd (Photo n° 15).

L'extrait ECNaCl xp a tout d'abord été utilisé comme source anti-génique, à une concentration de 150 μg pour 15 μl . 40 sérums de patients boliviens chagasiques en phase chronique de l'infection ainsi que 20 sérums boliviens sérologiquement négatifs sont analysés. 20 sérums présentant un test de MDP₅ négatif sont volontairement inclus dans le groupe de sérums positifs. Le tableau n°8 montre que tous les sérums MDP₅ positifs le sont

Tableau n° 7 : Analyse de sérum de patients à sérologie positive pour T. cruzi provenant de diverses zones géographiques de Bolivie et de sérums négatifs en microdouble diffusion en gel (test MDP₅).

		Origine des patients	Nombre de sérums	Test MDP ₅	
				% de positivité (nombre de sérums positifs)	
				sérum[] 3 fois	sérum[] 5 fois
SEROLOGIE POSITIVE		Camiri	91	76,9 (70)	79,1 (72)
		Chiwisivi	67	64,2 (43)	79,1 (53)
		La Paz	140	76,1 (86)	80,7 (113)
		Salinas	45	84,4 (38)	88,9 (40)
		Total ou Moyenne	343	69,1 (237)	81,1 (278)
SEROLOGIE NEGATIVE		Population bolivienne de zone endémique	67	0,0 (0)	0,0 (0)
		Population européenne	10	0,0 (0)	0,0 (0)
		Total ou Moyenne	77	0,0 (0)	0,0 (0)



Tableau n° 8 : Analyse de sérums de patients chagasiques et non chagasiques en immunoelectro-diffusion en gel d'acétate de cellulose.

	Groupe de sérums	Nombre de sérums	Test d'immunoélectro-diffusion (IED ₅)		
			% de positivité (nombre de sérums positifs)		
			extrait Ec NaClxp	fraction FEC ₅	extrait E 50
SEROLOGIE POSITIVE	Patients boliviens (test MDT ₅ positif)	20	100 (20)	100 (20)	100 (20)
	Patients boliviens (test MDT ₅ négatif)	20	20 (4)	30 (6)	30 (6)

SEROLOGIE NEGATIVE	Population bolivienne de zone endémique	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)

	Sensibilité du test		84,8	<u>86,6</u>	<u>86,6</u>



aussi dans ce test. Par contre, seul 4 sérums parmi ceux qui présentent un test MDP₅ négatif se révèlent positifs. La sensibilité de ce test atteint donc 84,75 % (tableau n°8). Par ailleurs, deux autres sources antigéniques ont été utilisées dans ce test : les fractions enrichies en composant 5 : FEC₅ et E₅₀ à des concentrations respectives de 50 µg et de 600 µg pour 15 µl. 6 sérums parmi ceux présentant un test MDP₅ négatifs sont alors positifs dans les deux cas. 86,6 % de sensibilité sont ainsi obtenus (Tableau n°8).

Tous les sérums du groupe témoins se sont révélés négatifs quelque soit la source antigénique utilisée.

3.3. Test de compétition ELISA

Le test de compétition ELISA met en compétition les sérums de patients chagasiques avec un anticorps monoclonal anti-composant 5 (II 190/30, cf Paragraphe 5.4. du Chapitre "Matériel et Méthodes") marqué à la phosphatase alcaline vis-à-vis de billes de propylène préalablement sensibilisées avec un extrait antigénique de T. cruzi (formes épimastigotes de culture).

La mise au point du test utilisant successivement deux sources antigéniques conduit au choix d'un extrait antigénique servant à sensibiliser le support solide.

Une étude portant sur un nombre plus important de sérums a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité de ce test dans le diagnostic de la maladie de Chagas, notamment dans des zones où des infections concomitantes sont soupçonnées ou méconnues.

3.3.1. Choix de la source antigénique à utiliser

Deux extraits antigéniques ont successivement été utilisés : l'extrait EC NaCl xp et la fraction FEC₅. Les différentes courbes obtenues de la titration du conjugué en fonction des concentrations antigéniques (figures n°12 A et 12B)) ont permis de déterminer les conditions optimales de dilution du conjugué (1/100 dans les deux cas) et de concentration antigénique (50 µg/ml pour l'extrait EC NaCl xp et 5 µg/ml pour la fraction FEC₅). Le choix de la dilution du sérum est déterminé par titration ; les dilutions retenues sont celles du 1/5 dans les deux cas (Figures n°12C et 12D). Il est intéressant de remarquer qu'à cette dilution (1/5), la différence des densité optiques observées entre les sérums positifs et les sérums négatifs, est environ 2 à 3 fois plus élevée quand la fraction FEC₅ est utilisée dans le test. Cette différence peut être interpréter comme une augmentation de la sensibilité du test. Aussi nous avons tenu à confirmer ce résultat en analysant un plus grand nombre de sérums.

L'analyse de 20 sérums de sujets boliviens parasitologiquement et sérologiquement négatifs en Chagas (groupe B) ont servi à calculer respectivement les valeurs limites de significativité des deux tests (valeur de la densité optique à partir de laquelle la technique peut être considérée comme positive) selon la formule $L = m - 2 \sigma$ (m = moyenne arithmétique des densités optiques , σ = écart type à l'effectif). Nous avons obtenu pour le test utilisant l'extrait EC NaCl xp : $m = 0,62$ et $\sigma = 0,10$, d'où $L = 0,42$; tous les sérums présentant une densité optique inférieure ou égale à 0,42 sont considérés comme positifs dans ce test.

Pour le test de compétition ELISA utilisant la fraction FEC₅ comme source antigénique, nous avons obtenu $m = 0,87$ et $\sigma = 0,15$ d'où $L = 0,57$; tous les sérums ayant une densité optique inférieure ou égale à 0,57 sont donc considérés comme positifs dans ce test.

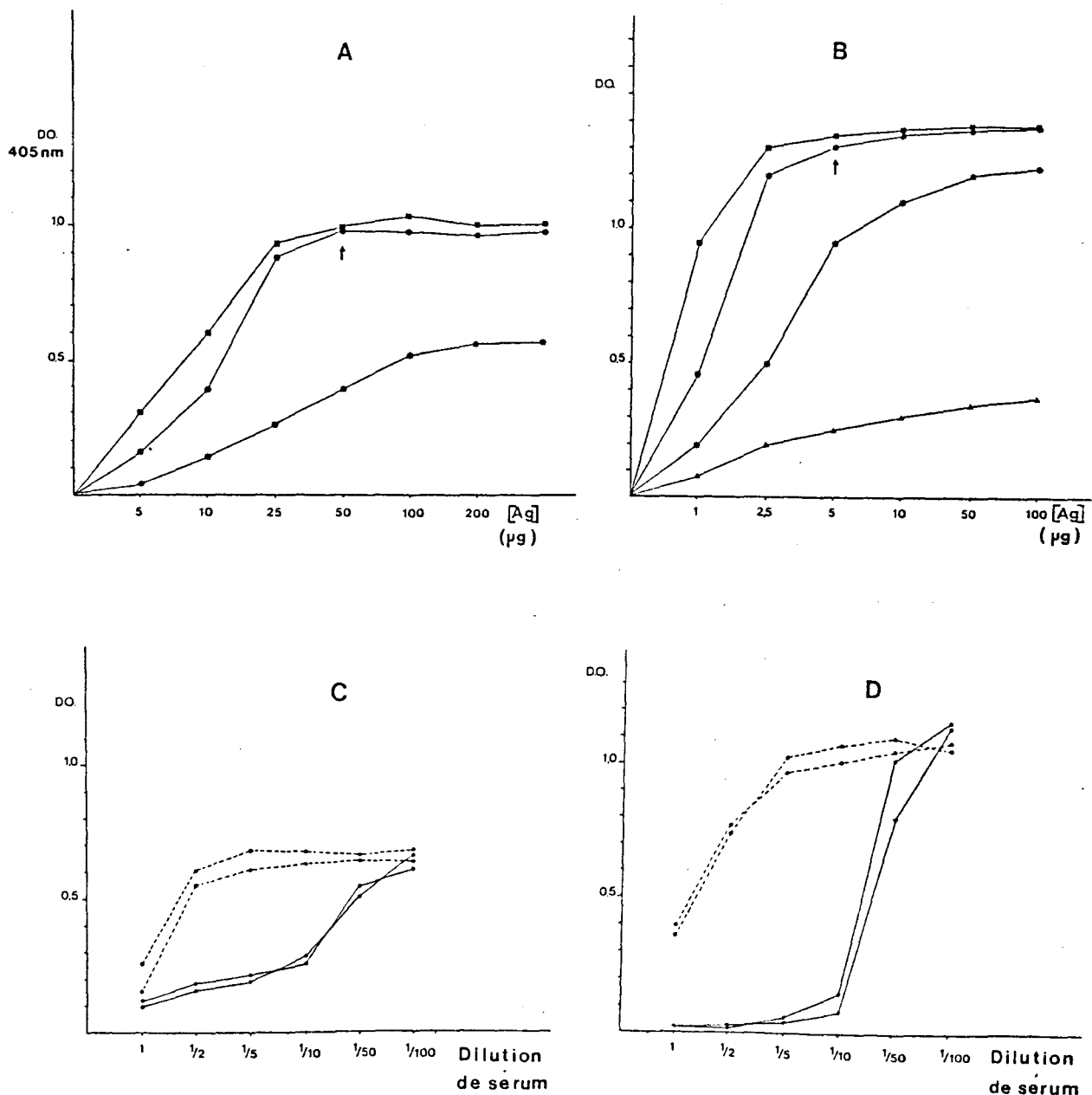


Figure n° 12 :

- A et B

Courbes de dilution de l'anticorps monoclonal II 190/30 purifié marqué à la phosphatase alcaline (■ : 1/50, ● : 1/100, * : 1/200, ▲ : 1/400, en fonction de différentes concentrations de l'extrait antigénique total de *T. cruzi* EC NaCl_{xp}(A) et de la fraction enrichie en composant 5, FEC₅ (B)

- C et D

Courbes de dilution de sérum (— : sérum de patient chagasique en phase chronique de l'infection, ---- : sérum négatif) réalisés à l'aide du test de compétition ELISA utilisant soit l'extrait EC NaCl_{xp} (C) ou la fraction FEC₅ (D)



25 sérums de patients boliviens chagasiques en phase chronique de l'infection, parasitologiquement et sérologiquement confirmés sont analysés dans les deux tests ; 10 sérums présentant un test de MDP₅ négatif sont volontairement inclus dans ce groupe. Les sérums les plus riches en anticorps anti-composant 5 (MDP₅ positifs) se sont tous révélés positifs dans le test de compétition ELISA quelque soit la source antigénique utilisée. Par contre, en ce qui concerne le groupe des sérums MDP₅ négatifs, 50 % et 100 % de positivité sont respectivement trouvés avec le test de compétition utilisant d'une part l'extrait antigénique total EC NaCl x p et d'autre part la fraction FEC₅. Dans les deux cas, la comparaison des moyennes des densités optiques montre que les groupes de sérums positifs sont significativement différents des groupes de sérums négatifs ($p \ll 0,001$) (Figure n°13). C'est donc le test de compétition ELISA utilisant la fraction enrichies FEC₅ (test de compétition ELISA FEC₅) qui a fait l'objet d'une étude plus approfondie.

3.3.2. Etude de la sensibilité du test de compétition ELISA FEC₅

Les groupes de sérums suivants sont testés :

- 20 sérums humains européens sains (groupe A) ;
- 20 sérums boliviens de zone endémique parasitologiquement et sérologiquement négatifs (groupe B) ;
- 10 sérums argentins de zone endémique parasitologiquement et sérologiquement négatifs (groupe C) ;
- 15 sérums de patients argentins en phase aiguë de l'infection (groupe D)
- 89 sérums de patients boliviens Chagasiques chroniques (groupe E).

Les résultats obtenus avec ces différents groupes de sérums sont représentés dans la figure n°14. Les moyennes arithmétiques des densités

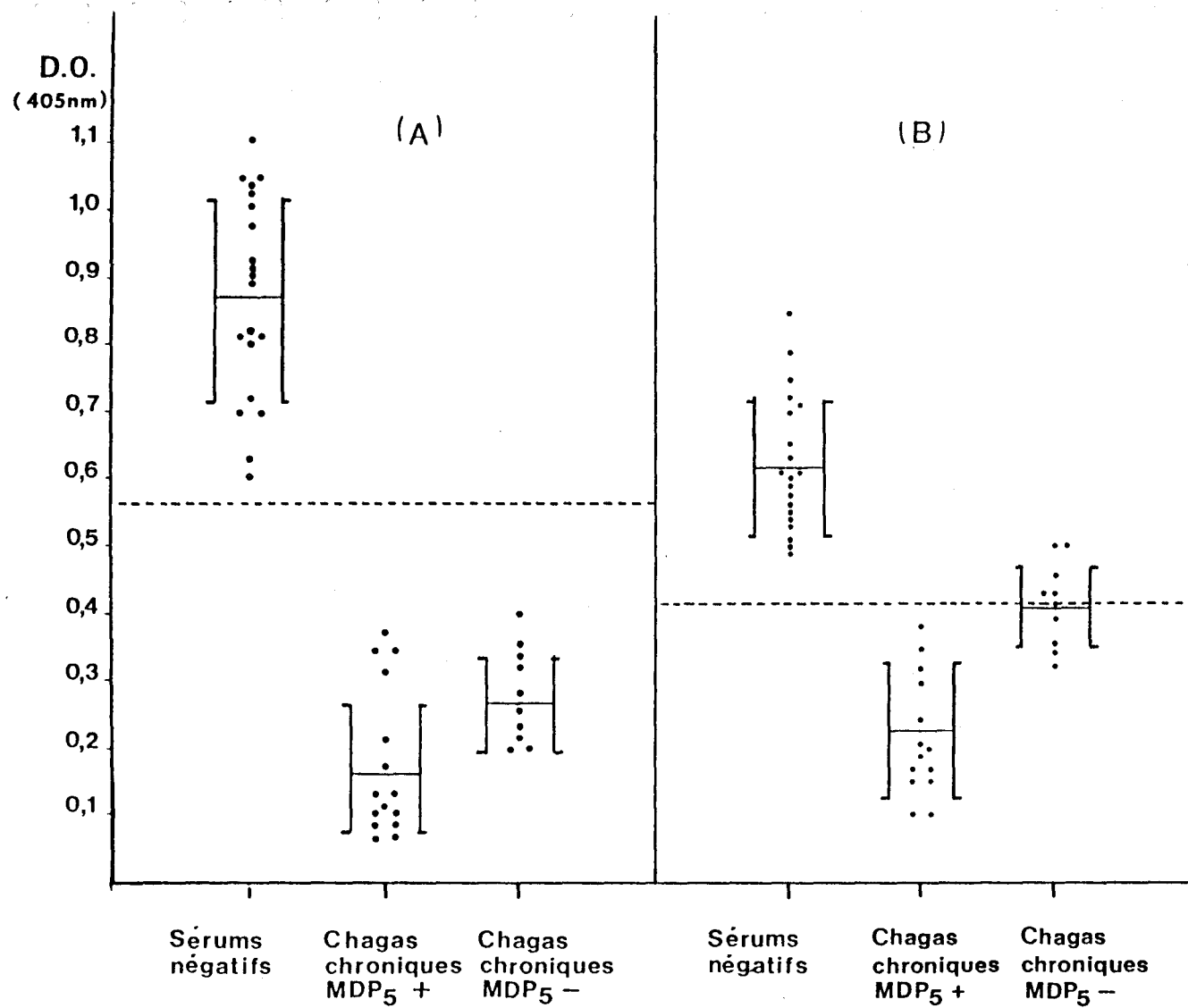


Figure n° 13 : Comparaison de la sensibilité du test de compétition ELISA utilisant successivement l'extrait antigénique total de *T. cruzi*, EC NaCl_{xp} (B) et la fraction enrichie en composant 5, FEC₅(A) comme source antigénique et l'anticorps monoclonal II 190/30 marqué à la phosphatase alcaline.
 ----- : valeurs limites de significativité des tests.



optiques à 405 nm calculées pour les groupes de sérums négatifs européens et argentins, sont respectivement de $0,99 \pm 0,19$ et de $0,78 \pm 0,09$ avec des valeurs limites de significativité respectives de 0,61 et 0,60. Le seuil de positivité du test égal à 0,57 est donc conservé puisqu'il s'agit de la valeur limite de significativité la plus faible.

Sur 89 sérums de patients boliviens chagasiques chroniques (groupe D), le test de compétition permet de détecter 96,6 % (86 sérums) de positivité. La moyenne arithmétique des densités optiques des sérums correspondants est de $0,19 \pm 0,14$ (Figure n°14). Quand la même étude est réalisée sur un nombre plus restreint de sérums argentins en phase aiguë de l'infection (groupe E) le pourcentage de positivité atteint 66,7 % et la moyenne arithmétique calculée est plus élevée $0,50 \pm 0,30$ (Figure n°14). Ces deux groupes de sérums sont significativement différents du groupe témoin B ($p < 0,001$) (Figure n°14).

3.3.3. Etude de la spécificité du test de compétition ELISA FEC₅

Différents groupes de sérums de patients européens, africains et sud-américains atteints de parasitoses diverses sont étudiés :

- 14 sérums de patients européens atteints de toxoplasmose (groupe F) ;
- 3 sérums de patients africains atteints d'amibiase (groupe G) ;
- 10 sérums de patients africains atteints de paludisme (groupe H) ;
- 11 sérums de patients africains infectés par T. gambiense (groupe I) ;
- 14 sérums de patients originaires du bassin méditerranéen atteints de leishmaniose viscérale à L. donovani infantum (groupe J) ;
- 15 sérums de patients sud-américains atteints de leishmaniose mucocutanée à L. braziliensis braziliensis présentant un diagnostic sérologique négatif pour T. cruzi (groupe K) ;

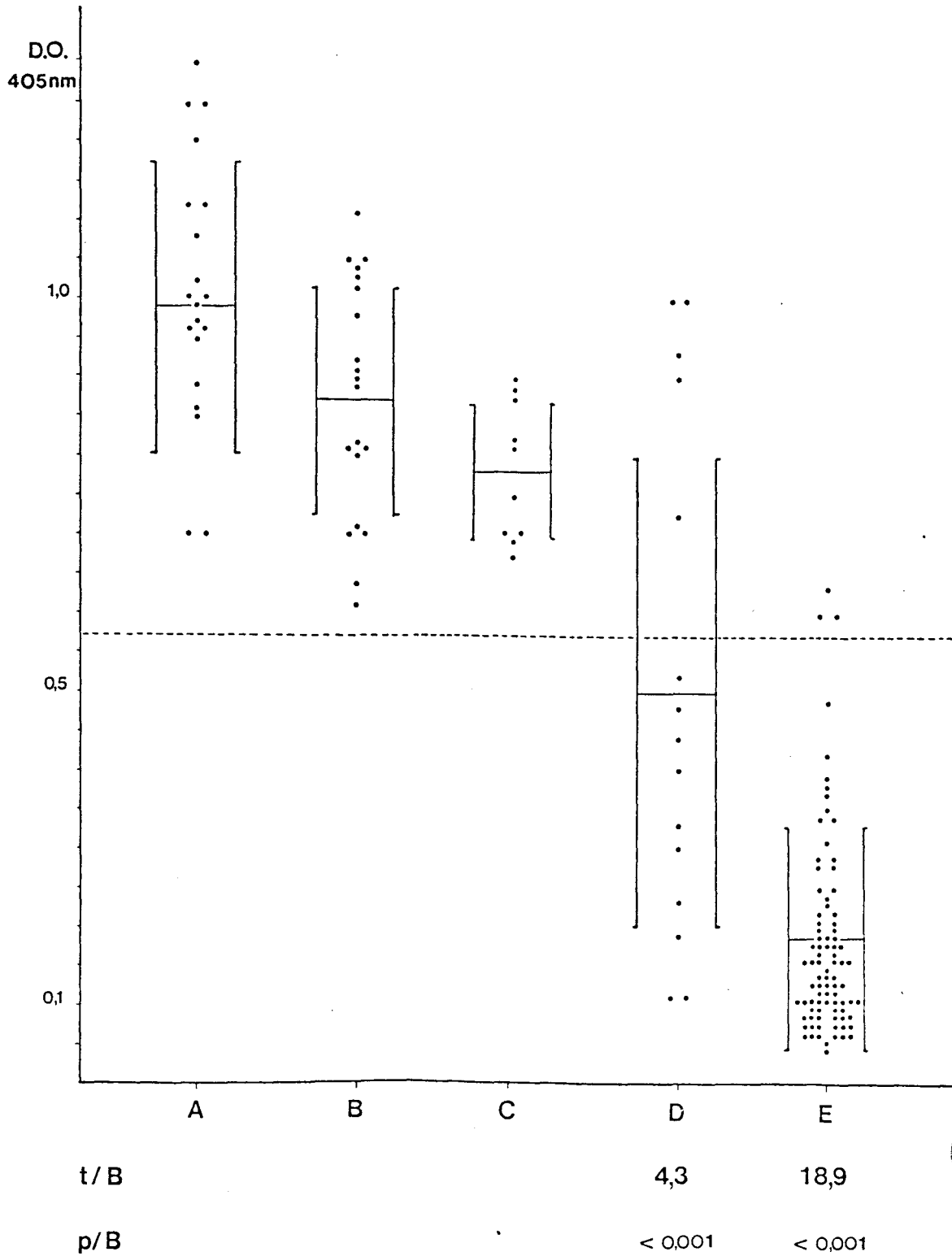


Figure n° 14 : Etude de la sensibilité du test de compétition ELISA utilisant la fraction enrichie en composant 5, FEC₅, l'anticorps monoclonal II 190/30 marqué à la phosphatase alcaline et différents groupes de sérums (A, B, et C = sérums négatifs ; D = sérums de patients chagasiques en phase aiguë de l'infection ; E = sérums de patients chagasiques en phase chronique de l'infection).
----- : valeur limite de significativité du test .

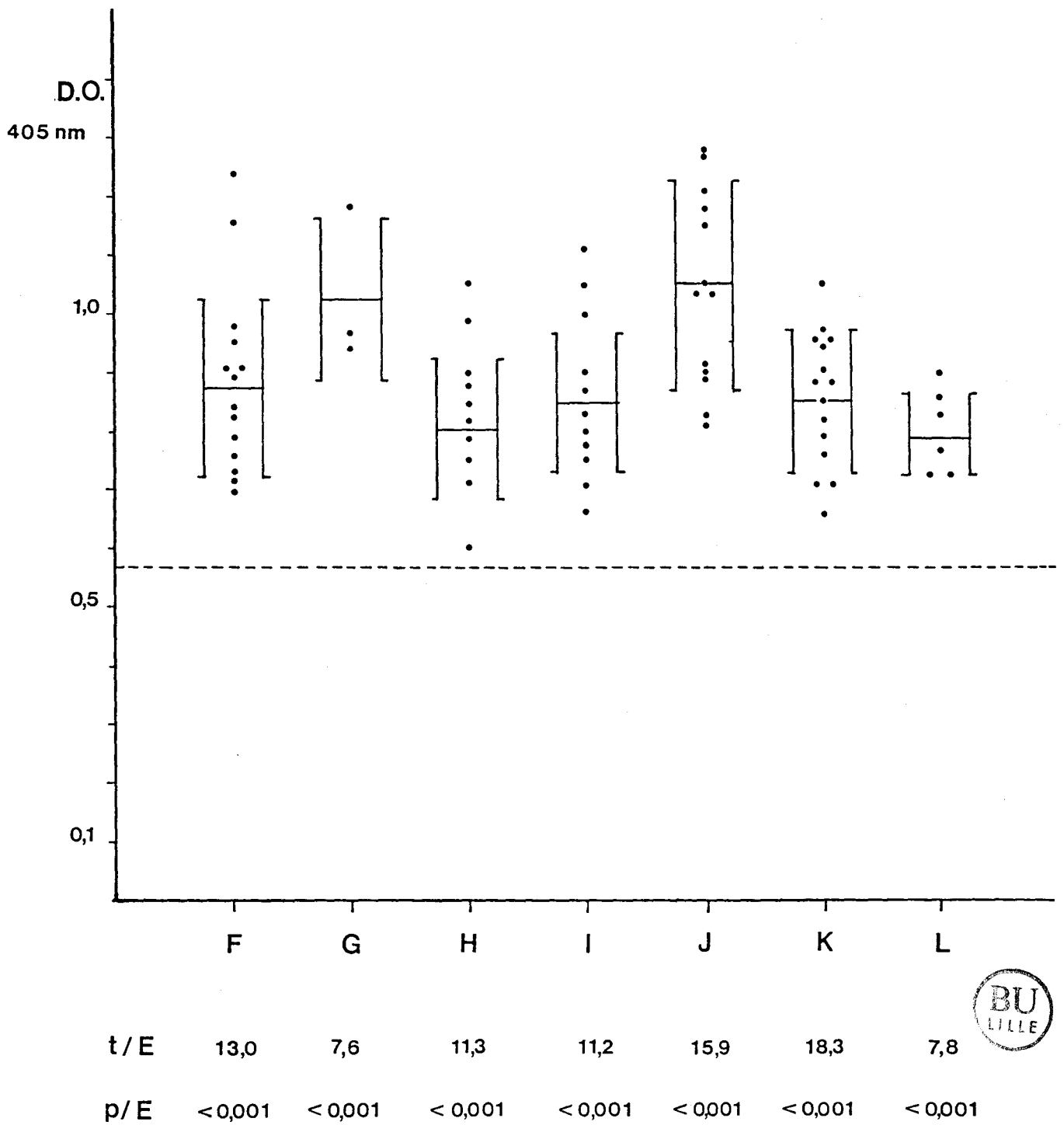


Figure n° 15 : Etude de la spécificité du test de compétition ELISA utilisant la fraction FEC_5 , l'anticorps monoclonal II 190/30 marqué à la phosphatase alcaline et différents groupes de sérums (F = toxoplasmose ; G = amibiose ; H = paludisme ; I = trypanosomiase africaine ; J = leishmaniose viscérale ; K = leishmaniose cutanéomuqueuse ; L = leishmaniose cutanée.
----- : valeur limite de significativité du test .

- 6 sérums de patients africains atteints de leishmaniose cutanée à L. tropica (groupe L).

Les résultats obtenus sont représentés à la figure n°15. Aucune réaction croisée n'a pu être mise en évidence vis-à-vis des différentes parasitoses étudiées ; tous les sérums testés se sont révélés négatifs dans ces tests. Sa spécificité est donc de 100 %. Ces groupes de sérums sont significativement différents du groupe E ($p < 0,001$).

3.3.4. Mise en évidence d'infections mixtes (parasitoses associées)

- Deux groupes de sérums de patients sud-américains sont étudiés :
- 40 sérums de patients brésiliens bilharziens (Département de Ceara, Nord Est du Brésil) (groupe N). La prévalence de la maladie de Chagas dans cette région n'a fait l'objet d'aucune étude ;
 - 47 sérums de patients boliviens atteints de leishmaniose mucocutanée (L. braziliensis braziliensis) provenant de la région des Yungas (Nord-est de la Bolivie) (groupe M). La présence de la maladie de Chagas dans cette région est soupçonnée.

Parmi les 40 sérums brésiliens et les 47 sérums boliviens, le test de compétition ELISA FEC₅ permet de détecter respectivement 3 et 15 sérums présentant des anticorps anti-composant 5 (figure n°16). Ainsi, dans ces deux zones géographiques étudiées, ce test spécifique permet de mettre en évidence que 7,5 % des patients bilharziens et 31,9 % des patients leishmaniens présentent aussi une infection à T. cruzi.

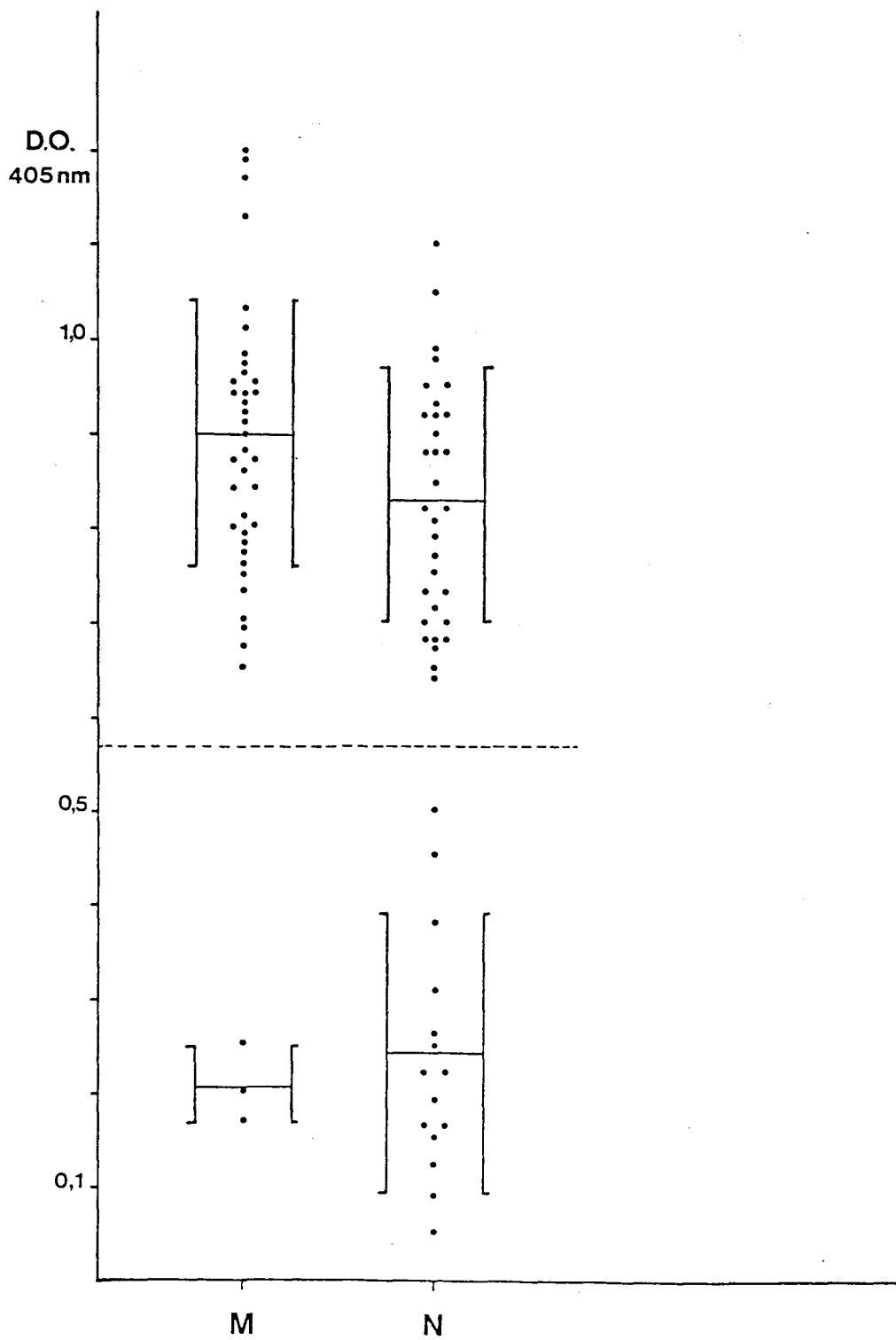


Figure n° 16 : Détection d'infections mixtes dans deux groupes de sérums de patients sud-américains (M = patients brésiliens bilharziens ; N = patients boliviens avec une leishmaniose cutanéomuqueuse).
 ----- : valeur limite de significativité du test .

DISCUSSION

Le composant 5 a été caractérisé comme un composant antigénique majeur des formes épimastigotes de Trypanosoma cruzi lors d'une analyse immunoélectrophorétique comparée d'extraits antigéniques de différents Trypanosomatidae (Afchain et al., 1979). C'est pourquoi l'isolement du composant 5 a tout d'abord été réalisé à partir d'un extrait antigénique total hydrosoluble dans lequel il avait été mis en évidence. L'analyse polypeptidique et antigénique des différents extraits antigéniques totaux (voir paragraphe 1.1.2. du chapitre "Résultats") a conduit au choix d'une préparation antigénique selon des critères physicochimiques et immunologiques. C'est à partir de l'extrait EC NaCl (extrait antigénique total NaCl 1 % de formes épimastigotes de T. cruzi) que nous avons réalisé les différentes approches de la purification du composant 5.

1. Complexité moléculaire du composant 5

Dans un premier essai de purification, le fractionnement par chromatographie de tamisage moléculaire de l'extrait EC NaCl révélait déjà son caractère hétérogène. En effet, il est mis en évidence dans deux fractions couvrant des poids moléculaires allant de 100 000 à 40 000 daltons et dont les rapports : concentration en protéines sur concentration en glucides varient de 0,9 à 2,4. Cette notion d'hétérogénéité du composant 5, ajoutée à celle de la complexité moléculaire révélée par l'extrait EC NaCl, nous a guidé vers la préparation d'une fraction enrichie en composant 5 à partir de laquelle il était plus facile d'envisager sa purification.

L'extrait chloroforme/méthanol insoluble et éthanol insoluble (FEC₅) a été retenu pour les raisons suivantes :

- Il correspond à une fraction antigénique homogène enrichie en composant 5 comme le montre l'analyse en immunoélectrophorèse et en double-diffusion

- en gel ;
- Il révèle un profil polypeptidique relativement simple si on le compare à celui objectivé par l'extrait EC NaCl ;
 - Il conserve les propriétés antigéniques remarquables du composant 5. En effet, il immunoprécipite les anticorps anti-composant 5 produits chez le lapin lors de l'immunisation expérimentale et ceux présents dans les sérums de patients chroniquement infestés par T. cruzi ;
 - Enfin, il induit une production précoce d'anticorps anti-composant 5 chez le lapin et donc préserve le caractère remarquable de son immunogénicité.

Le fractionnement sur colonne de chromatographie de tamisage moléculaire de la fraction FEC₅ (fraction enrichie en composant 5) nous conduit à la purification d'un antigène 5 correspondant à un poids moléculaire de 24 000 daltons (antigène 24 Kd), constitué essentiellement de protéines et pauvre en glucides. L'approche biochimique de la purification de cet antigène nous a permis de préparer un sérum polyclonal anti-composant 5 chez le lapin et donc de réaliser une approche immunochimique de sa purification.

Cette dernière, réalisée à partir de l'extrait EC NaCl, permet d'isoler 4 molécules dont une est majeure et correspond à un poids moléculaire de 72 000 daltons ; les trois autres ayant des poids moléculaires respectifs de 90 000, 51 000 et 43 000 daltons. Le composant 5 ainsi isolé contient 56 % de protéines et de 42 % de glucides.

D'un autre côté, l'analyse polypeptidique du composant 5 isolé par immunoadsorption (I.A.D.S.) à partir du surnageant de milieu de culture montre qu'il est constitué de trois molécules correspondant respectivement à des poids moléculaires de 72 000, 51 000 et 43 000 daltons. La première se révèle de façon majeure. Sa composition en protéines (62 %) et en

glucides (38 %) est pratiquement identique à celle du composant 5 isolé à partir de l'extrait EC NaCl par la même technique.

Un litre de milieu de culture correspondant à environ 20 mg d'extrait EC NaCl permet de purifier 0,525 mg d'antigène 24 Kd, 0,329 mg de composant 5 isolé par chromatographie d'affinité à partir de l'extrait EC NaCl et 0,067 mg d' "exoantigène" 5 détecté dans le surnageant de milieu de culture. L'approche biochimique de la purification du composant 5 à partir des formes épimastigotes de T. cruzi qui conduit à la purification d'une molécule de 24 000 daltons présente un rendement plus important que celui obtenu par l'approche immunologique. Par contre, cette deuxième voie, qui aboutit à l'isolement de 4 molécules de plus haut poids moléculaire semble mieux préserver la structure moléculaire du composant 5.

Donc, comme le laissaient supposer d'une part sa mise en évidence dans deux fractions correspondant à des zones de poids moléculaire différentes (tamisage moléculaire de l'extrait EC NaCl) et d'autre part le profil bilobé du système de précipitation correspondant au composant 5 objectivé en immunoélectrophorèse, ce dernier ne correspond pas à une entité moléculaire mais à une famille de protéines et/ou de glycoprotéines, qui selon la voie de purification mise en jeu et la source antigénique utilisée (extrait Ec NaCl, fraction FEC₅, SMC) sont différemment représentées.

Les travaux réalisés par Orozco (1983) et Afchain et al. (1984) sur la structure moléculaire du composant 5 vont dans ce sens. En effet, ces auteurs ont premièrement montré une identité immunologique entre la GP90 (glycoprotéine de surface de 90 000 daltons décrite par Snary et Hudson, 1979) et le composant 5, disposant d'un sérum polyclonal de souris anti-GP90. En double diffusion en gel, une réaction d'identité est observée

entre le sérum polyclonal de souris anti-GP 90 et un sérum polyclonal anti-composant 5 produit chez le lapin à partir d'arcs de précipitation découpés dans la gélose. D'autre part, ces mêmes auteurs, utilisant un sérum polyclonal de lapin anti-GP72 (glycoprotéine de surface de 72 000 daltons décrite par Snary et al. , 1981) montrent de la même façon une identité immunologique entre le composant 5 et la GP72. De plus, le composant 5 riche en molécules de 72 000 daltons, isolé à partir de l'extrait EC NaCl par I.A.D.S. présente une composition en protéines et en glucides proche de celle décrite par Snary et al. (1981) pour la GP 72.

Grâce à la technique d'immunoprécipitation suivie d'une analyse en gel de polyacrylamide SDS-PAGE, Orozco (1983) montrent qu'un sérum polyclonal de lapin anti-composant 5 reconnaît plusieurs molécules correspondant à des poids moléculaires identiques à ceux que nous avons décrits dans ce travail (90 000, 72 000, 51 000, 43 000 et 24 000 daltons). Les molécules de 90 000 et 72 000 daltons se révèlent être des bandes majeures. Le même auteur a utilisé, entre autres, la fraction enrichie en composant 5 (FEC₅) que nous avons produite pour immuniser des souris Balb/c en vue de la production d'anticorps monoclonaux anti-composant 5 par la technique d'hybridation cellulaire. Les sérums de souris correspondants présentent en immunoelectrophorèse un seul arc de précipitation intense correspondant au composant 5 vis-à-vis d'un extrait antigénique total de formes épimastigotes de T. cruzi . L'anticorps monoclonal résultant de cette hybridation immunoprécipite préférentiellement un composant antigénique de 72 000 daltons en présence d'un extrait d'épimastigotes de T. cruzi marquées en surface à ¹²⁵I. Opposé à un extrait total marqué de ces mêmes formes, trois autres molécules correspondant à des poids moléculaires respectifs de 51 000, 43 000 et 24 000 daltons sont révélées et devraient donc correspondre, d'après ces auteurs, à des molécules internes vraisemblablement situées au niveau de vacuoles digestives de la partie postérieure des formes

épimastigotes.

L'ensemble de ces résultats aboutit donc aux mêmes conclusions. Le composant, 5 décelé ou isolé à partir des formes épimastigote de T. cruzi, ne représente pas une entité moléculaire. Il est constitué :

- d'une molécule de 90 000 daltons qui serait équivalente à la GP90, glycoprotéine membranaire décelable dans tous les stades du cycle évolutif parasitaire et décrite par Snary et Hudson (1979). La molécule 95 000 daltons caractérisée par Zingales et al. (1982), commune à toutes les formes parasitaires pourrait présenter une relation avec ce constituant du composant 5. La glycoprotéine de 90 000 daltons de poids moléculaire décrite par Nogueira et al. (1981) exprimée uniquement à la surface des formes trypomastigotes sanguicoles semble donc être différente de celle décrite par Snary et Hudson (1979) ;

- d'une molécule de 72 000 daltons qui serait identique à la GP72, glycoprotéine membranaire décelée uniquement chez les formes épimastigote de culture et les formes métacycliques infectantes (issues du vecteur) et décrite par Snary et al. (1981). Là encore plusieurs travaux décrivent un antigène de T. cruzi ayant un poids moléculaire proche de 70 000 daltons (Nogueira et al., 1981 et Zingales et al., 1982). Mais la comparaison entre ces différents travaux est rendue difficile par la diversité des techniques utilisées pour la caractérisation et pour l'étude de l'expression de ces antigènes. En effet, Nogueira et al. (1981) décrivent une glycoprotéine de 75 000 daltons qui s'exprime chez toutes les formes parasitaires étudiées (trypomastigotes sanguicoles et de culture et épimastigotes des souches Y et CL de T. cruzi). Une molécule de poids moléculaire 70 000 - 72 000 daltons décrite par Zingales et al. (1982) est spécifique des épimastigotes de culture. La spécificité de stade de

ces antigènes reste donc la principale contradiction à éclaircir et seul un véritable travail de collaboration permettrait de conclure si ces antigènes sont ou non identiques.

- des molécules de 51 000, 43 000 et 24 000 daltons

L'antigène 5 de 24 000 daltons de poids moléculaire, purifié à partir de la fraction FEC₅ pourrait correspondre à la glycoprotéine de 25 000 daltons isolée d'un extrait antigénique total de T. cruzi (formes épimastigotes) par Scharfstein et al. (1983). Cet antigène purifié est décrit comme spécifique de T. cruzi et permet la réalisation d'un test de radioimmunoprécipitation spécifique de la maladie de Chagas (cf paragraphe 4 de ce chapitre).

2. Relations physicochimiques et immunologiques entre les différentes molécules mises en évidence

Si le composant 5 est constitué de plusieurs molécules, existe-t-il des relations entre celles-ci ? Afchain et al. (1984) montrent qu'il n'existe pas de relation immunologique entre la GP90 et la GP72 par des tests de compétition utilisant les différents anticorps monoclonaux anti-composant 5. Snary (1983) aboutit aux mêmes conclusions. Nogueira et al. (1982) utilisant la technique de "peptides mapping" suivie d'une analyse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide n'ont pas trouvé non plus de relation physicochimique entre les molécules de 75 000 et de 90 000 daltons. Seuls des sérums polyclonaux de lapin anti-composant 5 comme le sérum anti-antigène 24 Kd, interagissent à la fois avec la GP90 et la GP72, ce qui ne veut pas dire qu'ils reconnaissent le même déterminant antigénique et qu'il y ait donc une relation immunologique entre ces deux molécules.

En ce qui concerne la GP72, il est intéressant de noter qu'un sérum polyclonal anti-antigène 24 Kd, permet d'isoler par I.A.D.S., principalement une molécule de 72 000 daltons de poids moléculaire. Il devrait donc exister une relation immunologique franche entre ces deux molécules. D'ailleurs les anticorps monoclonaux anti-composant 5 produits à partir de souris immunisées avec la fraction FEC₅, immunoprécipitent respectivement les molécules de 72 000, 51 000, 43 000 et 24 000 daltons de poids moléculaire (Orozco et al., 1984). Ces derniers auteurs confirment donc nos résultats et montrent aussi que ces quatre molécules possèdent au moins un déterminant antigénique en commun. Les molécules de 51 000, 43 000 et 24 000 daltons pourraient donc correspondre soit à des sous produits de la GP72, libérés lors de la préparation de l'extrait antigénique ou soit aux produits de clivage de cet antigène (GP 72) soumis à l'effet de facteurs enzymatiques du parasite. Plus récemment, l'analyse préliminaire de biosynthèse des protéines dans le processus de culture in vitro après marquage à la méthionine ³⁵S des épimastigotes suivie d'une "chasse" en présence de méthionine froide, a été réalisée par Afchain et al. (1984). Ces auteurs, utilisant la technique d'immunoprécipitation par l'anticorps monoclonal II190/30 suivie d'une analyse en électrophorèse de gel de polyacrylamide SDS-PAGE, montrent que la GP72 devrait correspondre à la molécule entière ; les molécules 51 000 et 43 000 seraient des produits de maturation de la GP 72. Dans les conditions expérimentales utilisées, la molécule de 24 000 daltons n'est pas révélée. Néanmoins, il se peut que lors de cette analyse, le temps de chasse utilisée ne soit pas suffisamment long pour mettre en évidence l'antigène de 24 000 daltons. Il pourrait s'agir aussi d'un produit provenant d'un processus de clivage de la GP72 survenant lors de la préparation antigénique. En effet, la concentration de cette molécule dans l'extrait chloroforme-méthanol insoluble et éthanol insoluble (FEC₅), obtenu par une technique relativement drastique, serait en faveur de la seconde hypothèse. De plus, lorsque l'extrait EC

soumis pour publication).

Connaissant la spécificité du composant 5 de T. cruzi , la remarquable immunogénicité de ce composant dans les infections expérimentales et naturelles (Afchain et al. , 1978) et le problème posé par l'existence de réactions croisées avec d'autres parasitoses (cf paragraphe 4.4. du chapitre "Rappel bibliographique des thèmes de recherche"), nous avons cherché à mettre au point un test spécifique de la maladie de Chagas fondé sur la détection des anticorps anti-composant 5 dans les sérums de patients chroniquement infectés par T. cruzi .

Tout d'abord l'obtention d'un sérum polyclonal anti-composant 5, riche en anticorps, nous a permis d'évaluer un test de microdouble diffusion en gel, déjà utilisé pour d'autres maladies parasitaires (Yarzabal et al. , 1978 ; Bout et al. , 1979), qui consiste à identifier le système de précipitation correspondant au composant 5 par une réaction d'identité d'arc de précipitation utilisant un extrait antigénique total comme source antigénique. Ce test simple d'utilisation et facile d'interprétation, bien que spécifique de T. cruzi , ne se révèle pas suffisamment sensible (81,1 % de sensibilité) pour prétendre au diagnostic spécifique de la phase chronique de la maladie de Chagas.

A la recherche d'une meilleure sensibilité, nous avons utilisé l'immunoélectro-diffusion dans un système de contre-électrosynérèse à l'aide du sérum polyclonal anti-composant 5. Cette technique offre quelques avantages par rapport à la microdouble-diffusion en gel. Elle permet d'analyser des sérums non concentrés et utilise des quantités d'antigènes plus faibles. En outre, elle est beaucoup plus rapide d'exécution car les résultats sont obtenus sur une journée. Bien qu'il s'agisse là encore d'un test sérologique spécifique (précipitation), la sensibilité de ce test (84,7 %) est

inférieure à celle obtenue par les méthodes sérologiques classiques. L'utilisation de fraction antigénique enrichie en composant 5 (la fraction FEC₅ riche en antigène de 24 000 daltons et la fraction E₅₀ obtenue à partir du SMC dans ce test n'augmente pas de beaucoup sa sensibilité (86,6 %).

Enfin, nous avons envisagé la mise au point d'une technique de compétition utilisant un anticorps monoclonal anti-composant 5 (II 190/30) afin de préciser définitivement l'importance de ce composant dans la réalisation d'un test diagnostique spécifique de la maladie de chagas.

L'anticorps monoclonal II 190/30 produit par Orozco (1983) et utilisé dans le test de compétition présente les mêmes propriétés physicochimiques que le clone III 160/18 produit à partir de la fraction FEC₅ ; ils reconnaissent les mêmes molécules tant en surface que vis-à-vis d'un extrait antigénique total et présente la même image particulière en immunofluorescence indirecte (fluorescence interne située à la partie postérieure du parasite). La plus grande affinité du clone II 190/30 par rapport à celle du clone III 160/18 vis-à-vis de l'épitope correspondant constitue la raison essentielle pour laquelle nous avons utilisé le clone II 190/30 plutôt que le clone III 160/18.

Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'utiliser le test de compétition dans le diagnostic spécifique de la phase chronique de l'infection avec une sensibilité analogue à celle présentée par les techniques sérologiques classiques. Par contre, celui-ci ne semble pas trouver d'application dans le dépistage de la phase aiguë de la maladie car seulement 66,7 % des sérums aigus sont positifs dans ce test. L'absence de la GP72 et de ses produits de maturation au niveau des formes trypomastigotes sanguicoles, représentant la forme circulante in vivo contre laquelle sont

synthétisés les premiers anticorps, pourrait expliquer ce résultat. De plus il vient d'être montré dans notre laboratoire, grâce à un test radioimmunologique utilisant l'anticorps monoclonal II 190/30 marqué à ^{125}I , la présence d'antigène circulant correspondant, en phase aiguë de l'infection. Mais là encore, le faible pourcentage de sérums de patients contenant cet antigène (20 %) ne permet pas l'utilisation de ce test dans le diagnostic de la phase aiguë de la maladie.

Par ailleurs, le fait que les sérums de patients infestés par divers parasites autres que T. cruzi, ne rentrent pas en compétition avec l'anticorps monoclonal II 190/30 démontre la spécificité du déterminant antigénique commun à la GP72 et à ses sous-produits. De même, le ou les déterminants antigéniques portés par la GP90 et reconnus par les sérums de patients chagasiques semblent spécifiques de T. cruzi (Schechter et al., 1983). Ces résultats démontrent l'absence des anticorps anti-composant 5 dans le sérum de patients infectés par des parasites apparentés à T. cruzi et viennent donc confirmer la spécificité du composant 5 pour T. cruzi déjà mise en évidence par l'étude immunostructurale réalisée par Afchain et al. (1978).

Nous avons pu aussi montrer que l'utilisation de la fraction FEC_5 en comparaison avec l'extrait EC NaCl xp permet d'augmenter la sensibilité du test de compétition. En effet, la moyenne des densités optiques obtenues avec les sérums négatifs est plus élevée lorsque la fraction FEC_5 est utilisée, accentuant l'écart entre les sérums négatifs et les sérums positifs. L'existence dans l'extrait EC NaCl xp de déterminant(s) antigénique(s) responsable(s) de réactions non spécifiques avec les sérums témoins (parenté antigénique de hasard ou même présence de "récepteurs" pour les immunoglobulines), qui ne seraient pas présents dans la fraction FEC_5 , pourrait expliquer cette différence. D'autre part, dans le cas des

sérums pauvres en anticorps anti-composant 5, l'utilisation de la fraction FEC_5 permet d'éliminer les nombreux faux-négatifs objectivés avec l'extrait EC NaCl xp. En effet, il est admis que les sérums de patients en phase chronique de l'infection sont riches en anticorps circulants. Aussi, ces derniers vont réagir spécifiquement avec les nombreux déterminants antigéniques présents dans l'extrait EC NaCl xp. Il pourrait donc se créer une situation d'encombrement stérique empêchant les anticorps anti-composant 5 de se fixer normalement aux déterminants antigéniques leur correspondant et venant donc gêner la réaction de compétition. Avec la fraction FEC_5 , cette situation d'encombrement stérique devrait être minimisée puisqu'elle est enrichie en déterminants antigéniques intéressant la réaction de compétition et est antigéniquement moins complexe et permettrait d'expliquer l'augmentation de la sensibilité du test.

Enfin, le test ELISA mis au point par Schechter et al. (1983) utilisant la GP90 ainsi que le test radioimmunologique décrit par Scharfstein et al. (1983) utilisant l'antigène 25 Kd, passent par la purification d'un antigène spécifique de T. cruzi. Mais, la difficulté et le coût de la préparation d'un antigène purifié ainsi que les faibles rendements souvent obtenus posent de réels problèmes dans la réalisation d'un test diagnostique spécifique utilisant comme source antigénique un antigène purifié. C'est pourquoi le test de compétition ELISA que nous avons mis au point peut être considéré comme une autre alternative ne passant pas par la purification d'un antigène parasitaire à savoir l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique d'espèce et d'une fraction enrichie en composant 5. Ce test spécifique est simple d'utilisation, rapide (5 heures) et facile d'interprétation. De plus, il utilise peu de matériel, en effet, 2,5 mg de la fraction FEC_5 (obtenue à partir de 20 mg d'extrait EC NaCl) et 3,5 mg d'anticorps monoclonal purifié (correspondant à 0,6 ml de liquide d'ascite) permettent d'analyser 1750 sérums. Ce test pourrait donc faire l'objet d'une évaluation plus grande, notamment dans des zones ou la super-

position des distributions géographiques de certaines infections à flagellés avec celle due à T. cruzi soulignent la possibilité d'infections concomitantes et donc où le manque de spécificité des techniques sérologiques classiques ne permet pas de diagnostiquer avec certitude la maladie de Chagas.

- ABELEV, G.I. (1960) Modification of the agar precipitation method for comparing two antigen-antiserum systems. *Folia Biol.*, 6, 56
- AFCHAIN, D. (1976) Le caractère antigénique des trypanosomatidae hétéroxènes parasites de l'homme : Trypanosoma (S) cruzi, Trypanosoma (T), B gambiense et Leishmania donovani. Thèse, Univ. des Sciences et Techniques de Lille, p. 162.
- AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1969) Etude préliminaire des antigènes solubles de Trypanosoma cruzi. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *C.R. Acad. Sci. Paris, D* 269, 272.
- AFCHAIN, D., CAPRON, A. & PRATA, A. (1970) Les anticorps précipitants dans la trypanosomiase américaine humaine. *Gaz. Med. Bahia*, 3, 141.
- AFCHAIN, D., FRUIT, J., YARZABAL, L. & CAPRON, A. (1978) Purification of a specific antigen of Trypanosoma cruzi from culture forms. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27, 478.
- AFCHAIN, D., LE RAY, D., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1979) Trypanosoma cruzi culture forms : identification of a specific component. *J. Parasitol.*, 65, 507.
- AFCHAIN, D., OROZCO, O., LEMESRE, J.L. & CAPRON, A. (1984) Structure moléculaire (GP 90 et GP 72) du composant 5 de Trypanosoma cruzi. Répercussions diagnostiques. Coloquio Internacional sobre la Enfermedad de Chagas. Santa Cruz de la Sierra, Bolivie.
- ALMEIDA, J.O. (1956) Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation tests. *J. Immunol.* 7, 259.
- ALVAREZ, M., CERISOLA, J.A., ROHWEDDER, R.W. (1969) Test de immunofluorecencia para diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasit.*, 23, 4.
- ALVES, M.J.M., COLLI, W. (1974) Agglutination of Trypanosoma cruzi by concanavalin A. *J. Protozool.*, 2, 575.

- ALVES, M.J.M. & COLLI, W. (1975) Glycoproteins from Trypanosoma cruzi : partial purification by gel chromatography. *Febs Lett.*, 52, 188.
- ALVES, M.J.M., SILVEIRA, J.F., PAIVA, C.H.R., TANAKA, C.T., COLLI, W. (1979) Evidence for the plasma membrane localization of carbohydrate-containing macromolecules from epimastigote forms of Trypanosoma cruzi. *Febs Lett.*, 99, 81.
- AMATO NETO, V. & DIAS, A.F. (1969) Comentarios sobre caso de transmissao da doenca de Chagas por transmissao de sangue e largo periodo de incubacao. *Rev. Soc. Brasil Med. Trop.*, 3, 273 .
- ANDRADE, S.G. (1979) Biological characterization of strains of Trypanosoma cruzi. *Anais. Cong. Int. Doenca de Chagas (Rio de Janeiro)*, p.9.
- ANDRADE, S.G., ANDRADE, Z.A. (1966) Doenca de Chagas e alteracoes neuronais no plexo de averbach. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 8, 219.
- ANTHONY, R.L., CODY, T.S., CONTAMINE, N.T. (1981) Antigenic differentiation of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli by means of monoclonal hybridoma antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 1192.
- 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, 969.
- ARAUJO, F.G. (1976) Immunology of Chagas'disease. I. Circulating antigens in mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. *Rev. Int. Med. Trop. Sao Paulo*, 18, 433.
- ARAUJO, F.G. (1982) Detection of circulating antigens of Trypanosoma cruzi by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 76, 25.
- ARAUJO, F.G., SHARMA, S.D., PAT COX, REMINGTON, J.S. (1982) Monoclonal antibodies to stages of Trypanosoma cruzi : characterization and use for antigen detection. *Infect. Immun.*, 344.

- AVRAMEAS, S. (1969) Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, 6, 43.
- BALDY, S.L., TAKAOKA, L., CHIEFFI, P.P., MUCELIN, A.J. & BRANDINA, L. (1979) Doença de chagas por transfusão de sangue em Londrina Paraná. Relato de dois casos agudos tratados com Nifurtimox. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 21, 155.
- BARUFFA, G. & ALCANTARA FILHO, A. (1975) Comparação entre fixação do complemento em placa, a hemaglutinação e a prova de aglutinação com latex no diagnostico serologico da doença de Chagas na zona sul do Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 9, 121.
- BERGENDI, L., KNIERIM, F. & APT, W. (1970) Trypanosoma cruzi : immunological properties of a soluble extract of culture forms. *Exp. Parasit.*, 28, 258.
- BIAGI, F.F., TAY, J. & MARTINEZ, M.R. (1964) La reaccion de immuno fluorescencia en el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Ofic San. Panam.* 57, 237.
- BIGUET, J., CAPRON, A., TRANS VAN KY, P. & ROSE, F. (1965) Présence de substances de type C dans les antigènes vermineux et de protéine anti-C au cours des helminthiases humaines ou expérimentales. I. Etude immunologique préliminaire et répercussions pratiques. *Rev. Immunol. (Paris)*, 29, 233.
- BITTENCOURT, A.L., BARBOSA, H.S., ROCHA, T., SANTOS, I. & SODRE, A. (1972) Incidencia da transmissão congenita da doença de chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 14, 131.
- BONGERTZ, V. & DVORAK, A.J. (1982) Antigenic analysis of clones Trypanosoma cruzi stocks. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Abstracts of the Fifth International Congress of Parasitology, Toronto, Canada, supplément p. 646.

- BONGERTZ, V., HUNGERER, K.D., GALVAO-CASTRO, B. (1981) Trypanosoma cruzi : circulating antigen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 76, 71.
- BORST, P., FASE-FOWIER, F., FRASCH, A.C.C., HDEIJ-MAKERS, J.G.J. & WEJJERS, P.J (1980) Characterization of DNA from Trypanosoma brucei and related trypanosomes by restriction endonuclease digestion. Mol. Biochem. Parasitol., 1, 22.
- BOUISSET, L., DUCOS, J. & RUFFIE, J. (1960) Technique d'hémagglutination passive dans la recherche de l'immunisation trypanosomienne. Path. Biol. (Paris), 8, 91.
- BOUT, D. (1977) Approche immunochimique du Schistosome (S. mansoni). D.E.R.B.H., Univ. du Droit et de la Santé, Lille II, p 33.
- BOUT, D., CARLIER, Y. & CAPRON, A. (1979) Immunodiagnosis of hydatidosis using monospecific immune serum anti-ag 5. Biomedecine, 31, 214.
- BRENER, Z. (1965) Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trop. Med. Parasit., 59, 19.
- BRENER, Z. (1973) Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol., 27, 347.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. (1963) Observações sobre a fase chronica da doença de Chagas experimental no Camundongo. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 5, 128.
- BRENIERE, F.S., CARASCO, R., MIGUEZ, H., LEMESRE, J.L. & CARLIER, Y. (1984) Comparisons of immunological tests for serodiagnosis of Chagas disease in bolivian patients. Soumis pour publication.
- BRONZINA, A.A., d'ALESSANDRO, A. & SEGURA, E. (1980) Diferencias y similitudes antigenicas entre T. rangeli y T. cruzi. Medicina (Buenos Aires), 40, 45.
- BROWN, K.N. (1977) Antigenic variation in malaria. in "Immunity to Blood Parasites of animals and man" (L.H. Miller, J.A. Pino & J.J. Mc Kelvey, eds) P.5, Plenum, New York.
- BRUMPT, E. (1939) Mode de transmission de la maladie de Chagas. Ann. Parasitol. Hum. Comp., 17, 320.

- BRUMPT, E. (1914) Xenodiagnostico. Aplicação ao diagnostico de algumas infecções parasitárias e, em particular, à tripanosomose de Chagas. Am. Paul. Méd. Cirurg., 3, 97.
- BUSSARD, A. (1959) Biochem. Biophys., 34, 258.
- CAMARGO, M.E. (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 8, 227.
- CAMARGO, M.E., HOSHINO-SHIMIZU, S., MACEDO, V., PERES, B.A. & CASTRO, C. (1977) Diagnostico serologico da infecção humana pelo Trypanosoma cruzi estudo comparativo de testes de fixação do complemento imunofluorescencia, hemaglutinação e floculação em 3624 soros. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 19, 254.
- CAMARGO, M.E., HOSHINO, S., CORREA, N.S. & PERES, B.A. (1971) Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with Trypanosoma cruzi extracts. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 13, 45.
- CAMARGO, M.E. & REBONATO, C. (1969) Cross-reactivity in fluorescence tests for Trypanosoma and Leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18, 500-505.
- CAMARGO, M.E. & TAKEDA, G.K.F. (1979) Diagnostico de laboratorio. In : "Trypanosoma cruzi e doença de Chagas". Brenner, Z. & Andrade, Z. (Eds), Rio de Janeiro, Guanabara, pp. 175-198.
- CAMPBELL, D.H. & WELIKY, N. (1967) Immunoabsorbents : preparation and use of cellulose derivated. in : "Methods in immunology and immunochemistry, Williams & Chase eds, Academic Press, New York, vol. I, 365 pp.

- CAMPOS-NETO, A., VANHOEGAERDEN, M. (1982) Purification of different stages of trypanosomatidae parasites by monoclonal antibody immunoabsorbant columns. Dans : "Properties of the Monoclonal Antibodies Produced by Hybridome Technology and their Application to the study of Diseases". Proceedings of a Symposium held at the National University of Singapore, 1981, p. 87.
- CARLIER, Y., BOUT, D. & CAPRON, A. (1979) Automation of enzyme linked immuno-adsorbent assay (ELISA). J. Immunol. Meth., 31, 237.
- CERISOLA, J.A (1972) Valor del inmunodiagnostico en la infeccion chagasica in Simposio Internacional Enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Parasitologia. Buenos Aires, p. 115 .
- CERISOLA, J.A., ALVAREZ, M., BOCK, M. & WEGNER, D. (1971) A comparison of an 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., ALVAREZ, M. & DE RISSIO, A.M. (1970) Inmunodiagnostico da doenca Chagas. Evolucao serologica de pacientes com doenca de chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 12, 103.
- CERISOLA, J.A., ROHWEDDER, R., SEGURA, EL, DEL PRADO, C.E., ALVAREZ, M. & DE MARTINI, G.J.W. (1974) El xenodiagnostico. Instituto Nacional de Diagnostico e Investigacion de la enfermedad de Chagas Dr Mario Fatala Chabeu, Buenos Aires.
- CHAFFEE, E.F., FIFE, E.H. & KENT, J.F. (1956) Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection by complement fixation test. Am. J. Trop. Med. Hyg., 5, 763.
- CHAGAS, C. (1909) Neue Trypanosomen, T. minasense n. sp., T. cruzi n. sp. Arch. Schiffs. Tropenhyg., 13, 120.
- CHIARI, E., DIAS, J.C. (1975) Nota sobre uma nova tecnica de hemocultura para diagnostico parasitologico da doenca de Chagas na sua fase cronica. Rev. Soc. Bras. Med. trop., 9, 133.

- COONS, A.H. (1951) Fluorescent antibodies as histochemical tools. Fed. Proc. 2, 558.
- COSSIO, P.M., LAGUENS, R.P., DIEZ, C., SZARFMAN, A., SEGAL, A., ARANA, R.M. (1974) Chagasic cardiopathy-antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. Circulation, 50, 1252.
- COURA, J.R. (1966) Contribuição ao estudo da doença de chagas no estado da Guanabara. Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop., 18, 9.
- COURA, J.R. (1976) Evolutive pattern in Chagas' disease and the life span of Trypanosoma cruzi in human infection. Pages 378-383 in American Trypanosomiasis Research. Pan America Health Organisation Publication N°318.
- CURNOW, J.A. (1973) Studies on antigenic changes and strain differences in Babesia argentina. Australian Veterinary, 49, 279.
- D'ALESSANDRO (1976) Biology of Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli. Tejera 1920. In : "Biology of the Kinetoplastida", vol. I, Lumsden & Evans (Eds), London, Academic Press, pp. 328 .
- DAO, L. (1949) Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guarico, (Venezuela). Formas agudas e cronicas. Observacion sobre enfermedad de Chagas congenita. Rev. Policlin. Caracas, 18, 17.
- DARMAN, M. (1941) Multiplication du Trypanosoma cruzi dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. Ann. Parasitol. (Paris), 18, 166.
- DAVALO, A.R., GARCIA, J.A., ARANO, R. & MOSCOSO, E. (1979) Formas clinicas de la enfermedad de Chagas. Enfermedad de Chagas, p. 319 , Los Amigos del Libro (Ed), Bolivie.

- DESJEUX, P., ARANDA, E., ALIAGA, O. & MOLLINEDO, S. (1983). Human visceral leishmaniasis in Bolivia : first proven case from "Los Jungas". Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 851.
- DESJEUX, P., QUILICI, M. & LA PIERCE, J. (1974) A propos de 113 cas de leishmaniose cutanée et cutanéomuqueuse observés en Bolivie. Etude séro-immunologique de 71 cas. Bull. Soc. Path. Exot., 67, 387.
- DIAS, E. (1949) Os riscos de propagacao da doença de Chagas pelos serviços de transfusao de sangue. Bol. Sanit. Panam., 28, 910.
- DODIN, A. & BRIGOO, E.R. (1968) Technique modifiée d'électrosynérèse. Son application à l'identification rapide de germes, toxines, d'antigènes et d'anticorps. C.R. Soc. Biol., 192, 7.
- DOYLE, J.J. (1977) Antigenic variation in Babesia. In : Immunity to Blood Parasites of Animals and Man, Miller I.H., Pino, J.A. & Mekelvey J.J. (Eds), p. 27, Plenum Press, New York.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem., 28, 350.
- DUXBURY, R.E. & SADUN, E.H. (1964) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 13, 525.
- DZBENSKI, T.H. (1974) Exoantigens of Trypanosoma cruzi "in vivo". Topenmed. und Parasitol., 25, 485.
- FIFE, Jr E.H. & KENT, J.F. (1960) Protein and carbohydrate complement fixing antigens of Trypanosoma cruzi. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 9, 512.
- FIFE, E.H. & MUSCHEL, L.H. (1959) Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of Trypanosoma cruzi infection. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 101, 540.
- FRUIT, J., AFCHAIN, D., PETITPREZ, A. & CAPRON, A. (1978) Trypanosoma cruzi : Location of a specific antigen on the surface of bloodstream trypomastigote and culture epimastigote forms. Exp. Parasitol., 45, 183.

- FUCHS, A.P., FIORATTI, V.L., MELLO, V.A. & BOAINAIN, E. (1980) Diagnostico serologico na doença de chagas estudos comparativo de diferentes technicas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 22, 242.
- GALLIARD, H., LAPIERRE, J. & COSTE, M. (1962) Contribution à l'étude d'une souche pathogène de Trypanosoma cruzi (souche Tulahuen, Chili). I. L'infection chez la souris. Evolution. Effets de la splénectomie, des traitements par la cortisone et l'hormone somatotrope. Ann. Parasit. (Paris), 37, 495.
- GAM, A.A. & NEVA, F.A. (1977) Comparison of cell culture with epimastigote antigens of Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg., 26, 47.
- GOCKE, D.J. & HOWE, C. (1970) Rapide detection of Australia antigen by counter-immunoelectrophoresis. J. Immunol., 104, 1031.
- GONZALEZ-CAPPA, S.M. (1975) Antigenic variation, antigenic typing, exoantigens and prospect for vaccines. Proceedings of an International Symposium : New Approaches in American Trypanosomiasis Research, 18-21 march, Belo Horizonte. PAHO-WHO Scientific Publication 318 : 170.
- GONZALEZ-CAPPA, S.M. & KAGAN, I.G. (1973) Antigenicity of fractions of a somatic antigen of Trypanosoma cruzi. J. Parasit., 59, 1080.
- 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 american 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.
- GRABAR, P. & BURTIN, P. (1964) Immuno-electrophoretic analysis. Applications to human biological fluids. Amsterdam, Elsevier, 302 pp.

- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. (1913) Da reacção de Bordet e Gengon, na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnostico. *Brasil Méd.*, 27, 225.
- GUIMARÃES, M.C., 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 anti-Trypanosoma and anti-Leishmania antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30, 942.
- HOARE, C.A. (1966) The classification of mammalian trypanosomes. *Ergebn. Mikrobiol.*, 39, 43.
- HOWELLS, R.E. & CHIARI, C.A. (1975) Observations on two strains of Trypanosoma cruzi in laboratory mice. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 69, 435.
- JADIN, J.B. & PIERREUX, G. (1960) Un milieu de culture pour Trypanosomidés. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 40, 903.
- JADIN, J.B., LE RAY, D. (1969) Acquisitions récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Med. trop.*, 49, 331.
- KELSER, R.A. (1937) A complement-fixation test for Chagas' disease employing an artificial culture antigen. *Am. J. Trop. Med.*, 16, 405.
- KHOURY, E.L., RITACCO, V., COSSIO, P.M., LAGUENS, R.P., SZARFMAN, A., DEZ, C. & ARANA, R.M. (1979) Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.*, 36, 8.
- KLOETZEL, J. & CARMAGO, M. (1976). Immunological typing of Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop. Saô 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.
- KNIERIM, F. (1972) Reaccion de Hemagglutinacion indirecta o passiva en la enfermedad de Chagas. Simposio internacional sobre la enfermedad de Chagas Buenos Aires, p 135 .

- KNIERIM, F. & SAAVEDRA, P. (1966) Técnica de la reacción de hemaglutinación aplicada al diagnóstico sorológico de las parasitosis. *Bol. Chil. Parasit.* 21, 39.
- KNIGHT, R.A., ROCHA, H. & KAYE, D. (1976) Comparison of the complement fixation test and counter-electrophoresis test for the detection of antibodies in Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* 3, 67.
- KÖBERLE, F. (1968) Chagas' disease and Chagas' syndrome : the pathology of American Trypanosomiasis. *Adv. Parasitol.*, 6 : 63-116.
- KRETTLI, A.U., BRENER, Z. (1976) Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infection. *J. Immunol.*, 116, 755.
- KRETTLI, A., THOMAS, N. & EISEN, H. (1980) Escape mechanisms of Trypanosoma cruzi from the host immune system. *Les colloques de l'INSERM. Cancer Immunology and Parasite Immunology*, L. Israël, P. La Grange, J.C. Salomon, Eds INSERM, 97, 553.
- KUHN, R.E., MURNANE, J.E. (1977) Trypanosoma cruzi : immune destruction of parasitized fibroblasts in vitro. *Exp. Parasitol.*, 41, 66.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*, 227, 680.
- LANAR, D.E., LEVY, L.S. & MANNING, J.E. (1981) Complexity and content of the DNA and RNA in Trypanosoma cruzi. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 3, 327.
- LARANJA; F.S., DIAS, E. & NOBREGA, B. (1948) Clínica e terapêutica da doença de Chagas. *Mem. Inst. Osw. Cruz.*, 46, 473.
- LEÃO, A.E. (1923) Do diagnóstico das trypanosomoses pela reação de desvio do complemento. *Sciencia Med.*, 1, 126.
- LEDERKREMER, R.M., ALVES, M.J.M., FONSECA, G.C. & COLLI, W. (1976) A lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. *Biochem. Biophys. Acta*, 444, 85.
- LEDERKREMER, R.M., TANAKA, C.T., ALVES, M.J.M. & COLLI, W. (1977) Lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi. *Eur. J. Biochem.*, 74, 263.

- LEMESRE, J.L. & TIBAYRENC, M. (1983) Trypanosoma cruzi : measurement of DNA quantity in different isoenzymic strains. Inferences on the ploidy of these strains. Ann. Sco. belge Med. Trop., 63, 313.
- LE RAY, D. (1969) Analyse immunoélectrophorétique des formes de culture de Trypanosoma brucei. C.R. Soc. Biol., 163, 2783.
- LE RAY, D. (1975) Structures antigéniques de Trypanosoma brucei (Protozoa, Kineoplastida). Analyse immunoélectrophorétique et étude comparative Ann. Soc. belge Méd. trop., 55, 129.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.N, FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.
- MAEKELT, G.A. (1973) Aspectos seroepidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med., 5, 95..
- MAEKELT, G.A. (1962) Fracciones antigenicas del Schizotrypanum cruzi como fijador del complemento. Arch. Venez. Méd. Trop. y Parasitol. Méd., 4, 213.
- MAEKELT, G.A. (1960) Die Komplement bindus reaktion der chagaskrankheit. Z. Tropenmed. Parasitol., 11, 152.
- MAEKELT, G.A. (1964) Diagnostico de laboratorio de las tripanosomiasis americanas. Rev. Venez. Sanid. Asist. Soc., 29, 1.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O. & HERMANS, J.F. (1965) Immunochemical quantitations of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2, 235.
- MANSO ALVES, M.J., AIKAWA, M. & NUSSENZWEIG, R.S. (1982) Monoclonal antibodies to Trypanosoma cruzi inhibit mobility and nucleic acid synthesis of culture forms. Infect. Immun., 39, 377.
- MARCIPAR, A.J., LENTWOJT, E., SEGARD, E., AFCHAIN, D., FRUIT, J. & CAPRON, A. (1982) PNA affinity chromatography of Trypanosoma cruzi glycoproteins. Parasite Immun., 4, 109.

- MAYER, M. & RICHARDS-LIMA, H. (1914) Zum Verhalten von Schizotrypanum cruzi in Warmblütern und Arthropoden. Arch Schiffs Tropen. Hyg., 18, 101.
- MELO, R.C. & BRENER, Z. (1978) Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol., 64, 475.
- MILES, M.A., LANHAM, S.M., SOUZA, A.A. de & POVOA, M. (1980) Further enzymic characters of Trypanosoma cruzi and their evaluation for strain identification. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74, 221.
- MOREL, C., CHIARI, E., PLESSMAN, N., CAMARGO, E., MATTEI, D.M., ROMANHA, A.J. & SIMPSON, L. (1980) Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 6810.
- MOURAO, O.G. & MELLO, O.C. (1975) Hemoculturas para o diagnostico parasitologico na fase cronica da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. trop. 9, 183.
- Muniz, J. (1950) Comportamiento de hematias sensibilizadas com a fração poli-sacaridico do Schizotrypanum cruzi quando em presença de soros especificos "Hemolise condicionada", um caso particular dentro das reações de imunidade. Hospital 37, 199.
- MUNIZ, J., FREITAS, G. (1945) Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. Brasil-Med. 60, 337.
- NAIRN, R.C. (1969) Fluorescent protein tracing. Livingstone, Edinburgh and London, 3e Ed.
- NEAL, R.A. & MILES, R.A. (1970) Indirect haemagglutination test for Chagas's disease, with a simple method for survey work. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 12, 325.
- NERY-GUIMARAES, LAGE, H.A., VENANCIO, I.A. & GRYNBERG, N.F. (1969) Estudo comparativo da reação indirecta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, leishmanioses tegumentares e calazar com vari antigens de Leishmania e Trypanosoma. O Hospital (Rio de Janeiro) 75, 1811

- 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.
- NOGUEIRA, N., CHAPLAN, S. & COHN, Z. (1980) Trypanosoma cruzi : factors modifying ingestion and fate of blood from macrophages. J. exp. Med., 142, 447.
- NOGUEIRA, B.N., CHAPLAN, S., TYDING, J.D., UNKELESS, J. & COHN, Z. (1981) Trypanosoma cruzi : surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med., 153, 629.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z.A. (1978) Trypanosoma cruzi : in vitro induction of macrophage microbial activity. J. exp. Med., 148, 288.
- NOGUEIRA, N., UNKELESS, J. & COHN, Z. (1982) Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of Trypanosoma cruzi. Proc. Nat. Acad. Sci., 79, 1259.
- NUSSENZWEIG, J., DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. (1962) Diversidade na constituição antigenica de amostras de Trypanosoma cruzi isolados do homem e de gambas. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 4, 409.
- NUSSENZWEIG, V., DEANE, L.M. & KLOETZEL, J. (1963) Differences in antigenic constitution of strains of Trypanosoma cruzi. Exp. Parasitol., 14, 221.
- NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F.C. (1966) Further studies on the antigenic constitution of strains of Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi. Exp. Parasitol., 18, 224.
- OROZCO, O. (1983) Production d'anticorps monoclonaux anti-antigène 5 de Trypanosoma cruzi. Thèse, Univ. du Droit et de la Santé, Lille II.
- OROZCO, O., AFCHAIN, D., DISSOUS, C., RODRIGUEZ, C., OVLAQUE, G., LEMESRE, J.L. LOYENS, M. & CAPRON, A. (1984) Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for Trypanosoma cruzi. Am. J. Trop. Med. Hyg. (in press).
- OUCHTERLONY, O. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy, 5, 1.

- PATTO, O. (1931) Fixacao do complemento no bocio endemico. An. Fac. Med. Univ. Minas Gerais, 3, 95.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. (1971) Comparison of the latex slide test agglutination and complement fixation test for the diagnosis of Chagas'disease. J. Parasitol., 57, 771.
- PEREIRA, N.M., TIMM, S.L., DA COSTA, S.C.G., REBELLO, M.A. & De SOUZA, W. (1978) Trypanosoma cruzi isolation and characterisation of membrane and flagella fractions. Exp. Parasitol., 46, 225.
- PESENDORFER, F., KRASSNITZKY, O. & WEWALKA, F. (1970) Immunelectrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-associated antigen" (Au/SH-antigen). Klin. Wschr., 48, 38.
- PETANA, W.B. (1975) Sensitivity of the direct fluorescence test for Chagas' disease in large scale serology surveys. Scientific Publ. Pan Am. Hlth Org., 318, 289.
- 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.
- PORATH, J., FLODIN, P. (1959) Gel filtration : a method for desalting and group separation. Nature, 183, 1657.
- POULAIN, D., VERNES, A., POPEYE, R. & DUMORTIER, M.F. (1984) Serodiagnosis of candida infections : usefulness of a Co-counter immunoelectrophoresis method using a reference experimental antiserum. Europ. J. Clin. Microbiol., in press.
- PRINCE, M. (1970) The high voltage immunoelectro-osmophoretic (IEOP) technique for detection of SH antigen : application to blood donor screening and to study of liver disease. Vox. Sang., 19, 205.

- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. (1980) Trypanosoma cruzi : Immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol., 40, 36.
- ROMANA, C. (1935) "Acerca de un simtoma inicial de valor para el djagnostico de la forma aguda de Chagas. La conjuntivis esquizo-tripanosomica unilateral. ME.P.R.A., 16,
- SALEMCE, 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.
- SALFELDER, A. & MANNWEILER, E. (1981). Immundiagnostische befunde an seren von Leishmaniose. Chagas, malaria und amöbiasis. Patienten in endemiegebieten Venezuelas. Tropenmedizin und Parasitologie, 32, 194.
- SALGADO, A.A., MAYRINK, W. & DIAS, J.C.P. (1970) Estudo comparativo entre a reaçao de fixaçao do complemento com os antigenos benzeno-chloroformado e metilico e o xenodiagnostico. Rev. Inst. Med. Trop. Saô Paulo, 12, 36.
- SANTIAGO, A.R., AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1981) Specific antigens of Trypanosoma cruzi amastigotes and Trypomastigotes. Ann. Soc. belge Med. Trop. 61, 369.
- SCHARFSTEIN, J., RODRIGUEZ, M.M., ALVES, C.A., de SOUZA, W., PREVIATO, J.O. & PREVIATO, N.M. (1983) Trypanosoma cruzi : description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. J. Immunol., 131, 972.
- SCHECHTER, M., VOLLER, A., MARINKELLE, C.S., FLINT, J.E., GUHL, F. & MILES, M.A. (1983) Purified Trypanosoma cruzi specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south american trypanosomiasis (Chagas'disease). Lancet, october 22, 934.
- SCHENONE, H., ALFARO, E. & ROJAS, A. (1974). Bases y rendimiento del xenodiagnostico en la infeccion chagasica humana. Bol. Child. Parasit., 29, 24.

- SCHMUNIS, G.A., SZARFMAN, A., COARA, L., YANOVSKI, J.F. & BULL, A. (1975)
El diagnostico de infeccion reciente por T. cruzi. Argentina - Chapadmalá
oct., 22-25.
- SCOTT, M.T., MOYES, L. & WOOD, J.N. (1982) Lack of identify between the 90 K
protective glycoprotein of Trypanosoma cruzi and hybridoma (CE5)-defined
T. cruzi antigen which cross reacts with mammalian neurones. Trans. Roy.
Soc. Trop. Med. Hyg., 76, 698.
- SCOTT, M.T. & SNARY, D. (1979) Protective immunization of mice using cell
surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi. Nature, 282, 73.
- SEGURA, E.L., CURA, E.N., PAULONE, I., VASQUEZ, C. & CERISOLA, J.A. (1974)
Antigenic makeup of subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. J. Pro-
tozool, 21, 571.
- 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.
- SENEKJIE, H.A. & LEWIS, R.A. (1944) Diagnosis of leishmaniasis by slide
agglutination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 57, 17.
- SHER, A. & SNARY, D. (1982) Specific inhibition of the morphogenesis of
Trypanosoma cruzi by a monoclonal antibody. Nature, 300, 639.
- SIQUEIRA, A.F., FERRIOLIFILHO, F. & CARVALHEIRO, J.R. (1966) Um antígeno solu-
vel presente no soro de ratos infectados com Trypanosoma cruzi. Rev.
Inst. Med. Trop. São Paulo, 8, 148.
- SNARY, D. (1983) Cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi : protective
immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. Trans.
Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 126.
- SNARY, D. (1980) Trypanosoma cruzi : antigenic invariance of the cell surface
glycoprotein. Exp. Parasitol., 49, 68.

- SNARY, D., FERGUSON, M., SCOTT, M. & ALLEN, A. (1981) Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi : use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol. 3, 343.
- SNARY, D. & FERGUSON, M.A.J. (1982) Protective antigens of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. Suppl. Abstracts of the fifth international Congress of Parasitology, Toronto, Canada, p. 49.
- SNARY, D. & HUDSON, L. (1979) Trypanosoma cruzi cell surface proteins : identification of one major glycoprotein. Febs Lett., 100, 166.
- SOUZA, O.E. & JOHNSON, C.M. (1971) Frequency and distribution of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli in the Republic of Panama. Am. J. Trop. Med. Hyg., 20, 405.
- 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.
- TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. (1955) Connective tissue reaction in normal and immunised mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi. J. Infec. Dis., 96, 199.
- TARTANT, C.J., FIFE, E.H. & ANDERSON, R.I. (1965) Serological characteristics and general chemical nature of the in vitro exoantigens of T. cruzi. J. Parasit., 51, 277.
- TEIXEIRA, A.R.L., SANTOS-BUCH, C.A. (1974) The immunology of experimental Chagas'disease. II. Delayed hypersensibility to Trypanosoma cruzi antigens Immunology, 28, 401.
- TEIXEIRA, A.R.L., TEIXEIRA, G., MACEDO, V. & PRATA, A. (1978) Trypanosoma cruzi-sensitized T-lymphocyte mediated Cr release from human heart cells in Chagas'disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27, 1097.

- TIBAYRENC, M., CARIOU, M.L. & SOLIGNAC, M. (1981) Interprétation génétique des zymogrammes de flagellés des genres Trypanosoma et Leishmania. C.R. Acad. Sci. Paris, 292, 623.
- TIBAYRENC, M., ECHALAR, L., BRENIERE, F., LEMESRE, J.L., BARNABE, C. & DESJEUX, P. (1983) Sur le statut taxonomique et médical des souches isoenzymatiques de Trypanosoma cruzi. Considérations sur la valeur taxonomique et immunogénique des différentes isoenzymes. C.R. Acad. Sci. Paris, 296, 721.
- TIBAYRENC, M. & MILES, M.A. (1983) A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of Trypanosoma cruzi. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 77, 76.
- VAITUKAITIS, J., ROBBINS, J.B., NIESCHLAG, E. & ROSS, T.G. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. Metabol., 33, 988.
- VATTUONE, N.H. & YANOVSKY, J.F. (1971) Agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. Exp. Parasitol., 30, 349.
- VICKERMAN, K. & LUCKINS, A.G. (1969) Localization of variable antigens in the surface coat of Trypanosoma brucei using feritin conjugated antibody. Nature (Lond.), 224, 1125.
- VOLLER, A., DRAPER, C., BIDWELL, D.E. & BARTLETT, A. (1975) Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. Lancet 1, 426.
- WALTON, B.C., CHINEL, L.V. & EGUIA, O.E. (1973) Onset of espundia after many years of occult infection with Leishmania braziliensis. Am.J. Trop. Med. Hyg., 22, 616.
- WELLER, T.H. & COONS, A.H. (1954) Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 86, 789.

- WESTPHAL, O. & JANN, K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 5, 83.
- W.H.O. (1981) Application of biochemical micromethods for the investigation of Tropical Disease Pathogens. WHO Publications, Geneva.
- WOOD, J.N., HUDSON, L., JESSELL, T.M. & YAMAMOTO, M. (1982) A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and Trypanosoma cruzi parasites. *Nature* 296, 34.
- YARZABAL, L.A., De ALBORNOZ, M.B., De CABRAL, M.A. & SANTIAGO, A.R. (1978) Specific double diffusion microtechnique for the diagnosis of aspergillosis and paracoccidioidomycosis using monospecific antisera. *Sabouraudia* 16, 55.
- ZINGALES, B., ANDREWS, N., KUWAJIMA, V., COLLI, W. (1982) Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi : possible correlation with the interiorisation process in mammalian cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 6, 111.

