

50376  
1990  
47

59163

50376  
1990  
47

N° d'Ordre : 533

**UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES**  
**de LILLE FLANDRES ARTOIS**

**THESE DE DOCTORAT**

présentée à l'Université de LILLE I

pour l'obtention du titre de

**Docteur en Sciences de la vie et de la Santé**

par

**Philippe VELGE**

**Contribution à l'étude des mécanismes d'interactions  
entre les trypomastigotes de Trypanosoma cruzi  
et les cellules hôtes.**



Présentée le 22 mai 1990 devant la commission d'examen  
Membres du jury :

Président :	Professeur	M. PORCHET
Rapporteurs :	Docteur	D. AFCHAIN
	Docteur	C. AURIAULT
Examineurs :	Professeur	A. CAPRON
	Professeur	B. VRAY
	Docteur	A. OUAISSI

L'ensemble de ce travail a été réalisée :

au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM U 167 - CNRS 624

Institut Pasteur de Lille

1, rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cédex.

Sous la direction du Professeur A. Capron

Dans le groupe du Docteur A. Ouaissi.

**REMERCIEMENTS**

**A Monsieur le Professeur André Capron**

de l'Académie des Sciences.

Je suis très honoré de la confiance que vous m'avez témoignée en m'acceptant parmi vos élèves. Je tiens à vous exprimer ici toute mon admiration pour votre oeuvre scientifique et toute ma reconnaissance pour le soutien que vous m'avez donné. Puisse ce travail ne pas décevoir votre confiance.

**A Monsieur le Professeur Maurice Porchet.**

Vous me faites l'honneur de bien vouloir présider cette thèse, qu'il me soit permis de vous exprimer ici toute ma gratitude.

**A Monsieur le Docteur Daniel Afchain.**

Vous m'avez enseigné la rigueur tant intellectuelle qu'expérimentale. Votre sens aigu de l'honnêteté m'a souvent été une aide précieuse. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.

**A Monsieur le Docteur Claude Auriault.**

Vous avez toujours témoigné un bienveillant intérêt à mon égard et j'ai souvent trouvé en vous un appui précieux. Vos compétences en immunologie cellulaire que vous avez su m'enseigner, m'ont permis d'élargir mes connaissances. Je tiens à vous en remercier et à vous assurer de ma sincère et respectueuse amitié.

**A Monsieur le Professeur Bernard Vray.**

Je suis honoré de pouvoir bénéficier de votre compétence et vous suis reconnaissant d'avoir bien voulu faire partie de ce jury. Soyez assuré de ma gratitude et de ma profonde considération.

**A Monsieur le Docteur Ali Ouaisi.**

Vous êtes l'initiateur des travaux rapportés dans cette thèse et vous m'avez suivi avec bienveillance dans l'évolution de ce travail. Je tiens à vous remercier de toute l'aide que vous m'avez apporté et à vous assurer de mon profond respect.

**A Madame le Docteur Christine Mazingue,**  
**A Madame le Docteur Florence Velge-Roussel,**  
**A Madame le Docteur Martine Damonville,**  
**A Madame le Docteur Marie France Cesbron,**  
**A Monsieur le Professeur Jean Paul Dessaint,**  
**A Monsieur le Docteur Jean Claude Ameisen.**

Vos compétences respectives et vos conseils m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse. J'ai souvent abusé, durant ces quatre années, de votre temps et de votre sens critique dans la rédaction de mes manuscrits, soyez assurés de ma reconnaissance et de mes plus vifs remerciements.

**A Madame Jocelyne Cornette,**  
**A Mademoiselle Béatrice Marty,**  
**A Monsieur Marc Loyens,**  
**A Monsieur Ali Taibi.**

Ces années passées en votre compagnie m'ont été riches d'enseignements et de souvenirs. Votre enthousiasme, votre dynamisme, vos compétences ont représenté pour moi une aide précieuse tant sur le plan théorique que pratique. Je tiens à vous remercier et à vous assurer de ma sincère amitié.

Je rends un hommage particulier à toutes celles et tous ceux de ce laboratoire qui m'ont apporté leurs connaissances et leurs amitiés.

Anne Delannoye,

Francoise Detoef,

Christian Drolez,

Jean Pierre Gazet,

Didier Henry,

Jean Pierre Kusnierz,

Didier Monté,

Jean Loup Neyrinck,

Véronique Pancré,

Joël Plumas,

Pham Bach Nga,

Claudie Verwaerde,

Catherine Vendeville,

Han Vorng,

Hervé Wattier,

Isabelle Wolowczuk,

Je tiens à leur exprimer ma très profonde reconnaissance.

Je remercie également toutes les personnes du centre d'Immunologie de la Faculté de Médecine de Lille ainsi que l'ensemble du personnel des secrétariats, du service de l'animalerie, et de l'entretien du C I B P pour leur constant dévouement.

Je remercie enfin toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

## SOMMAIRE

	<b>page</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>8</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>13</b>
<b>GENERALITES .....</b>	<b>16</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>51</b>
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>120</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>135</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>154</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>165</b>

## RESUME

L'étude des mécanismes d'interaction entre le parasite et son hôte est très importante et constitue un préalable à la définition d'une stratégie vaccinale. Dans le cas de *Trypanosoma cruzi*, l'agent responsable de la maladie de Chagas, le rôle de la fibronectine cellulaire et d'une glycoprotéine parasitaire de 85 kDa dans l'interaction entre le trypomastigote, forme infectante, et le fibroblaste a été montré. Nos travaux mettent en évidence la complexité de ces mécanismes puisque le trypomastigote peut également se fixer à un autre ligand du fibroblaste qu'est le collagène, via un récepteur parasitaire de 58/68 kDa, mais probablement également avec le récepteur T des lymphocytes. En effet, les anticorps monoclonaux dirigés soit vis-à-vis de la gp 58/68, soit vis-à-vis du collagène, pour le fibroblaste, ou du CD3 et du HLA-DR pour le lymphocyte, inhibent *in vitro* l'infection cellulaire par les trypomastigotes. Le résultat le plus original est la démonstration, pour la première fois, que le lymphocyte T est une cellule hôte pour *T. cruzi* et qu'il peut être responsable de sa dissémination dans l'organisme. Cette infection des lymphocytes T, ainsi que la destruction par un mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps des lymphocytes T présentant à leurs surfaces des antigènes parasitaires, modifient profondément la vision que l'on peut avoir de la pathologie de la phase aiguë de la maladie et pourrait être responsable en partie de l'immunosuppression caractéristique de cette phase.



Les travaux présentés ont fait l'objet des publications suivantes:

Ouaissi, M.A., J.P. Kusnierz, H. Gras-Masse, H. Drobecq, Ph. Velge, J. Cornette, A. Tartar & A. Capron (1988). Fluorescence-Activated Cell-Sorting Analysis of Fibronectin Peptides Binding to *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. *Journal of Protozoology* 35: 111-114.

Velge Ph., M.A. Ouaissi, J. Cornette, D. Afchain & A. Capron (1988). Identification and Isolation of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigote collagen binding proteins: Possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97: 255-268.

Fischer E., M.A. Ouaissi, Ph. Velge, J. Cornette & M.D. Kazatchkine (1988). gp 58/68, a parasite component which contributes to the escape of the trypomastigote form of *T.cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* 65: 299-303.

Ouaissi M.A., J. Cornette, Ph. Velge & A. Capron (1988). Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas' disease: Pathological implications. *European Journal of Immunology* 18: 1889-1894.

Velge Ph., M.A. Ouaissi, J.P. Kusnierz & A. Capron (1989). Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR antigens. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 309, Série III: 93-99.

Ouaissi, M.A., A. Taibi, J. Cornette, Ph. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F.S. Rizvi & A. Capron (1989). Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100: 115-124.

Ouaissi, M.A., J.F. Dubremetz, J.P. Kusnierz, J. Cornette, M. Loyens, A. Taibi, B. Marty, Ph Velge, F.S. Rizvi & A. Capron (1990). *Trypanosoma cruzi* : differential expression and distribution of an 85 kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Experimental Parasitology* (sous presse).

Velge, Ph., J.P. Kusnierz, M. Loyens, M.A. Ouaissi & A. Capron (1990). *Trypanosoma cruzi* : antibodies from infected sera induce cell-mediated cytotoxicity against *in vivo* parasitized T lymphocytes. *Journal of Immunology*. (soumis).

#### Communications :

Velge Ph., M. A. Ouaissi & A. Capron (1987). Identification and Isolation of Collagen binding sites in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Strasbourg (France) *Immunobiology* 173 (2-5) 254.

Velge Ph., M.A. Ouaissi & A. Capron (1989). Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR antigens. Caxambu (Brazil) *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 84 suppl. II 88.

## Liste des abréviations

### Milieux de culture et réactifs chimiques

HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
SVF	Sérum de veau foetal
PMSF	Phénylméthanesulfonyle fluorure
PMA	Phorbol myristate acétate
PHA	Phytohemagglutinine A
Con A	Concanavaline A
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i> (lectine de germe de blé)
NP-40	Nodidet P-40
PBS	Tampon phosphate 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM
EDTA	Ethylène Diamino-Tetra Acétate
Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate

### Cellules

CD	Cluster de différenciation (déterminant antigénique présent à la surface des leucocytes et reconnu par un anticorps monoclonal)
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
NK	cellule <i>Natural killer</i>
ADCC	cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante
IgG	Immunoglobuline G
IL-1, -2	Interleukine 1, 2
gp	glycoprotéine
ADN	Acide désoxy ribo nucléique
VLA	<i>Very Late Activation antigen</i>
RGDS	Séquence péptidique : Arg-Gly-Asp-Ser

**Constantes et unités de mesure**

kDa	kilo Dalton
cpm	Coups par minute
Bq	Becquerel (1 Curie = 37 GBq)
Ci	Curie
pb	paire de base nucléotidique

## **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Il est remarquable que dans une période où la plupart des grandes maladies infectieuses humaines sont contrôlées par la vaccination, aucun vaccin n'existe vis-à-vis des infections parasitaires (Sher et Ottesen 1988). Ainsi l'étude de l'induction de l'immunité contre les parasites est devenue un important défi qui a fait émerger une nouvelle discipline depuis 20 ans, l'immunoparasitologie (Sher et Ottensen 1988).

Avant d'aborder toute analyse de la réponse immune vis-à-vis du parasite, il faut comprendre les liens qui l'unissent à son hôte. En effet, pour survivre chez leur hôte vertébré la plupart des parasites doivent persister suffisamment longtemps dans l'organisme afin de permettre la transmission de la maladie aux hôtes intermédiaires. Ainsi la plupart des infections parasitaires se caractérisent par une phase chronique qui se traduit par le maintien durant de longues années d'un équilibre dynamique, entre la réponse immune de l'hôte et la pathogénie du parasite (Capron et Dessaint 1986).

On conçoit dès lors que l'approche vaccinale empirique qui fut fructueuse pour certaines maladies infectieuses, se soit révélée inefficace dans le cas des parasitoses. Ceci est du en partie à l'absence d'analyses suffisamment précises des composantes immunologiques de l'interaction entre le parasite et la réponse immune de l'hôte (Capron et Dessaint 1989). Notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des mécanismes d'interactions tant au niveau membranaire qu'au niveau de la réponse immune entre un protozoaire parasite : *Trypanosoma cruzi* et son hôte vertébré.

*Trypanosoma cruzi* est responsable de la maladie de Chagas, ou trypanosomiase américaine, qui sévit du sud des Etats-Unis au sud de l'Argentine (Brumpt 1980). Celle-ci fait partie des six maladies endémiques parasitaires reconnues comme prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé. La prévalence globale, telle qu'elle ressort des enquêtes sérologiques réalisées, s'établit de 16 à 18 millions de personnes (TDR 9<sup>eme</sup> rapport 1989). Dans certaines régions, les vallées des basses terres de Bolivie par exemple, la prévalence locale peut dépasser 70%.

L'évolution de l'infection est très variable mais, le plus souvent, elle comporte une phase aiguë initiale suivie d'une phase indéterminée qui peut durer jusqu'à 15 ans avant d'aboutir à une phase chronique progressive caractérisée par une pathologie cardiaque et digestive grave.

L'aspect difficilement curable des atteintes chroniques et le fait qu'il n'existe pas de drogues entièrement efficaces et qui ne soient pas sans effets secondaires justifient l'importance d'une prophylaxie et notamment de la vaccination.

Avant d'aborder notre contribution à l'étude des interactions entre ce parasite et le fibroblaste et le lymphocyte de l'hôte vertébré, nous nous proposons de rappeler les principales acquisitions faites dans le cadre de la maladie de Chagas en insistant sur la réponse immune de l'hôte lors de la phase aiguë de la maladie et sur les mécanismes d'interactions entre le parasite et la cellule.

## **GENERALITES**



## GENERALITES

### 1. Agent de la maladie

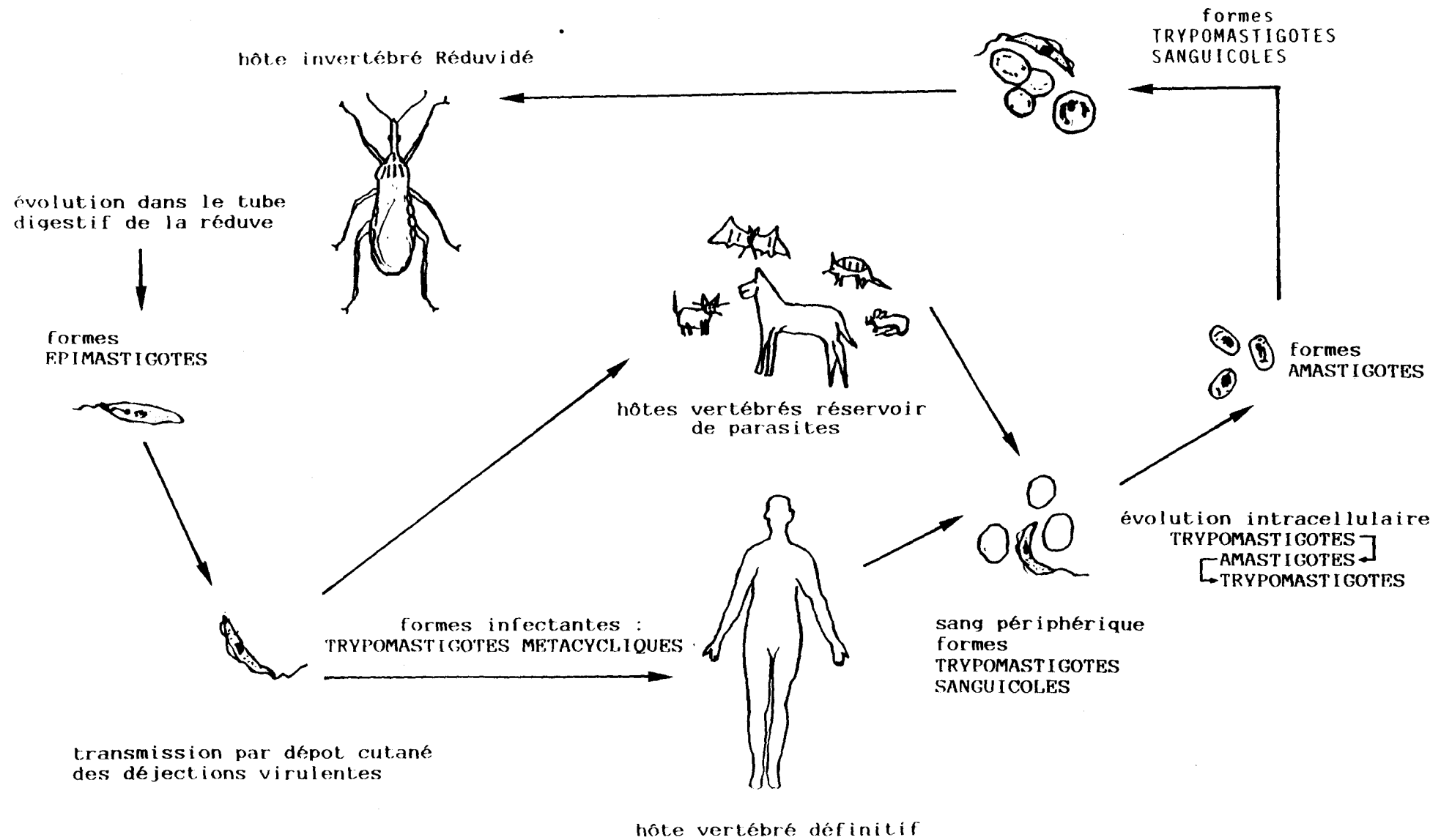
La maladie de Chagas est une Zoonose due à un protozoaire flagellé, *Trypanosoma cruzi* de l'ordre des *Kinétoplastida*, de la famille des *Trypanosomatidae* et du sous-genre des *Schizotrypanum*.

### 2. Cycle évolutif du parasite

Le cycle évolutif de *T. cruzi* se partage entre un insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un mammifère (hôte définitif). La maladie affectait à l'origine des animaux et était transmise par des triatomes sylvatiques. Lorsque l'équilibre écologique a été perturbé par la présence de l'homme, les insectes infectés ont permis à la maladie de gagner le milieu rural en infectant l'homme et les animaux domestiques. Puis, il est probable que la trypanosomiase américaine se soit transformée progressivement en une maladie urbaine en raison de l'émigration de personnes malades et de l'agrandissement des ghettos suburbains (Brumpt 1980).

La maladie est transmise par un insecte hématophage : un réduvidé (*Triatomidae*) dont il existe une centaine d'espèces en Amérique Latine (*Triatoma sp.*, *Rhodnius sp.*, *Panstrongylus sp.*). Chez le vecteur, la transmission s'effectue lors du repas sanguin. Les trypomastigotes sanguicoles atteignent le tube digestif moyen de l'insecte où ils se transforment en épimastigotes qui se multiplient par scissiparité. Dans le tube digestif postérieur, ils se différencient en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes pour l'homme et les autres mammifères (Fig. 1).

Figure 1 CYCLE EVOLUTIF DE TRYPANOSOMA CRUZI CHEZ L'HOTE VERTEBRE ET INVERTEBRE



Par l'intermédiaire des déjections déposées par les insectes sur la peau au moment où ils l'érodent pour piquer, les trypomastigotes métacycliques pénètrent dans le sang. En partie sous l'effet de la différence de température, le parasite se différencie en trypomastigote sanguicole qui pénètre dans certaines cellules sanguines et musculaires, notamment les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les fibroblastes, pour s'y transformer en amastigotes. Les amastigotes, forme intracellulaire, vont se multiplier puis se différencier en trypomastigotes sanguicoles, qui seront libérés à nouveau dans le sang périphérique après rupture des cellules infectées où ils pourront être prélevés par l'insecte (Fig. 1bis).

Cette parasitose fut découverte en 1909 par Carlos Chagas au Brésil à l'occasion d'une enquête épidémiologique sur le paludisme (Chagas, 1909). Il rapporta, plus tard, les manifestations cliniques de l'infection (Chagas, 1911). Ainsi un seul médecin décrivit le transmetteur, le parasite, le réservoir et les formes cliniques de la maladie qui porte son nom. Le cycle décrit dès 1909 par C. Chagas, a été confirmé par d'autres auteurs notamment Brumpt en 1912. Néanmoins comme nous le montre le cas de *Trypanosoma brucei* où l'on a découvert récemment une multiplication sexuée du parasite chez l'anophèle (Jenni et coll. 1986), il ne faut pas croire que les cycles de ces parasites soient parfaitement connus. Ainsi Brack en 1968, par une étude de frottis colorés, a trouvé dans le tube digestif de l'insecte des formes trypomastigotes rondes flagellées qu'il a appelé sphaeromastigotes. Ces formes ont été décrites chez l'hôte vertébré en 1978 (Pan et coll. 1978). D'autre part, en 1988, Ley et coll. montrent que les amastigotes ne sont pas seulement les formes répliquatives intracellulaires mais qu'ils peuvent également infecter des monocytes et des fibroblastes.

MULTIPLICATION DE *TRYPANOSOMA CRUZI* SOUS SA FORME  
TRYPOMASTIGOTE ET AMASTIGOTE EN CULTURE CELLULAIRE

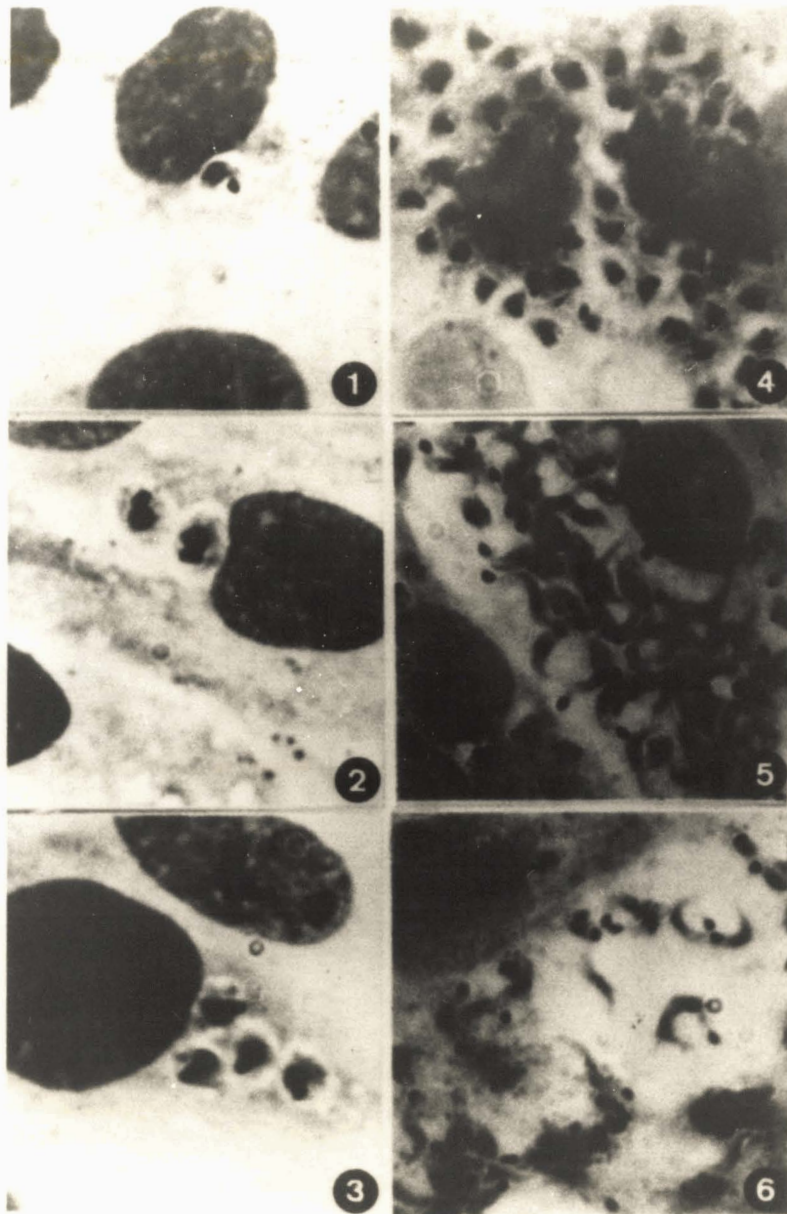


Figure 1 bis : Multiplication de *trypanosoma cruzi* dans les fibroblastes à 37°C

- 1 Forme amastigote, 3-4 h après sa pénétration dans un fibroblaste.
- 2 Division binaire des amastigotes (4-8 h après infection).
- 3 Amastigotes 24 h après infection.
- 4 Infection du fibroblaste après 4 jours.
- 5 Différenciation en trypomastigotes.
- 6 Libération des trypomastigotes de la cellule.

### 3. Mode de transmission

La maladie de Chagas est habituellement transmise par le contact des déjections de triatomidés infectés. Les trypomastigotes traversent facilement les muqueuses saines (Brumpt, 1912b) mais ne pénètrent pas dans une peau intacte. Celle-ci doit être porteuse d'érosions ou de lésions de grattage. La transmission est également possible par voie transplacentaire ainsi qu'à l'occasion de greffes d'organes et d'accidents de laboratoires. Le risque de transmission par transfusion sanguine est souvent fatal. Ce mode de transmission constitue bien sûr, un risque dans les régions endémiques où il importe de traiter les dons du sang (actuellement au violet de gentiane), mais également dans les pays où la population sud américaine immigrante est importante. Ainsi lors d'une enquête sérologique récente conduite chez les immigrants d'Amérique centrale venus s'installer dans la région de Washington (U.S.A.), on a observé une prévalence de 4,9% pour l'infection par *T. cruzi* (Kirchhoff 1987).

### 4. Moyens de lutte contre la maladie de Chagas.

Lors de la phase aiguë de la maladie, *T. cruzi* est présent dans le courant circulatoire, il est alors la source de la pathologie, et pour de nombreux auteurs, la gravité de la phase chronique dépend de la maîtrise de l'infection aiguë (Charles 1987).

#### 4. 1. Moyens thérapeutiques.

Dans les médicaments trypanocides, deux ont une activité reconnue : le nifurtimox et le benznidazole. Le nifurtimox est le trypanocide utilisé lors de la phase aiguë, néanmoins il est responsable d'effets secondaires : atteintes digestives, insomnies, polyneuropathies. Il est souvent associé à une corticothérapie. Le benznidazole serait actif lors de la phase chronique. Les effets secondaires sont surtout des neuropathies périphériques.

#### 4. 2. Prophylaxie.

La lutte contre l'infection par *T. cruzi* passe par l'élimination du vecteur transmetteur dans les habitations rurales. La technique la plus utilisée est l'épandage d'insecticide à fort pouvoir rémanent, dans tous les logements et leurs annexes, l'opération devant être répétée jusqu'à la disparition des triatomes dans au moins 95% des logements. Deux méthodes sont en cours de mise au point : les peintures insecticides et les cartouches fumigènes.

L'élimination du vecteur passe également par l'amélioration de l'habitat, notamment par le remplacement du toit de chaume et le plâtrage des murs.

### 5. Aspects cliniques de la maladie de Chagas

La maladie de Chagas évolue en deux phases : la première phase ou phase aiguë dure 1 à 2 mois chez l'homme et passe souvent inaperçue. La deuxième phase de la maladie est la phase chronique qui dure toute la vie de l'individu. Elle est souvent l'occasion de la reconnaissance de la maladie. Entre ces deux phases, une longue période de latence d'une à plusieurs années peut s'établir.

#### 5. 1. La phase aiguë

Cette phase est souvent asymptomatique et n'est détectable que chez les sujets jeunes ou âgés. Près de 10% des sujets atteints meurent pendant la phase aiguë et la jeunesse du malade rend le pronostic pessimiste (Charles, 1987). Les signes généraux apparaissent entre 3 et 20 jours après l'infection : asthénie, anorexie, céphalées, fièvres, tachycardie. 50% des patients présentent le signe de Romana ou le chagome qui traduisent l'entrée du parasite. Néanmoins, la principale caractéristique est la présence de parasites dans la sang et les tissus.

## 5. 2. La phase chronique

Les manifestations cliniques de la phase aiguë disparaissent en 2 à 4 mois. Les manifestations de la phase chronique n'apparaîtront en général qu'après un temps de latence clinique très variable pouvant atteindre 20 ans. C'est habituellement à ce stade que la maladie sera reconnue. C'est aussi la période la plus sérieuse de la maladie. Les lésions les plus connues sont localisées au niveau du coeur. Elles vont de simples modifications de l'électrocardiogramme à des insuffisances cardiaques graves et parfois à la mort subite par rupture du coeur. Les atteintes du système nerveux autonome peuvent entraîner des pathologies digestives avec dilatations organiques telles que mégaoesophage et mégacôlon. La maladie peut aussi persister sous la forme asymptomatique chez de nombreux sujets infectés. Ces formes asymptomatiques posent un problème important au niveau des transfusions sanguines qui jouent un rôle considérable dans la transmission de la maladie. En effet, la parasitémie est extrêmement faible, détectable seulement par xénodiagnostic, les parasites étant séquestrés dans les tissus de l'hôte (Joskowicz et coll. 1985). La parasitémie semble être sous un contrôle actif du système immunitaire. Ainsi le traitement d'un animal en phase chronique, par un immunosuppresseur, provoque l'apparition d'une nouvelle phase aiguë.

## 6. La réponse immune de l'hôte.

En parasitologie, les situations d'immunité stérilisante entraînant la guérison clinique et une résistance de longue durée à la réinfection sont très rares chez l'homme. La leishmaniose cutanée et la toxoplasmose sont les seuls exemples de maladies parasitaires capables d'induire une immunité protectrice qui puisse durer toute la vie. Le plus souvent, l'immunité permet seulement le contrôle du parasitisme. Dans le cas de *T. cruzi*, le parasite semble capable d'échapper à la réponse immune lors de la phase aiguë, réponse

immune qui au lieu de protéger l'homme, pourrait être à l'origine des manifestations cliniques de la phase chronique. Ce type d'évolution se retrouve également dans l'onchocercose.

#### 6. 1. Immunité naturelle à *T. cruzi*.

L'existence d'une immunité naturelle contre l'infection à *T. cruzi* a été mise en évidence chez les animaux à sang froid et les oiseaux (Dias, 1944). Par contre plus de 100 espèces de mammifères sont susceptibles d'être infectées (Brener, 1973). Il existe cependant de grandes variations dans la susceptibilité à l'infection. C'est ainsi que l'on classe les souris en souches sensibles (C<sub>3</sub>H), moyennes (BALB/c) ou résistantes (C57/bl).

#### 6. 2. L'immunité acquise

Très rapidement il a été suggéré que les mécanismes immunitaires de l'hôte intervenaient dans le déroulement de l'infection à *T. cruzi*. En effet, le nombre important de trypomastigotes circulants pendant la phase aiguë de l'infection diminue au moment de l'initiation de la phase chronique. Pendant cette phase chronique, les parasites ne sont pas détectés par l'examen direct du sang, mais subsistent chez l'hôte durant toute sa vie avec l'établissement d'un équilibre entre la pathogénie du parasite et la réponse immune de l'hôte.

Les premières démonstrations du rôle de la réponse immune ont été réalisées par Seah et Marsden (1969) en immunisant des souris avec des trypomastigotes avirulents. Ils ont ainsi observé une protection de ces animaux vis-à-vis d'une infection, normalement létale, par des formes virulentes.

Ces travaux ne sont pas aussi évidents qu'ils y paraissent. D'abord parce qu'ils montrent qu'il est possible d'induire une protection, c'est à dire une diminution de la parasitémie et de la mortalité consécutive à la phase aiguë (aucun travail n'a été réalisé en



revanche, sur la modulation de la pathologie de la phase chronique). De plus il est important de connaître les mécanismes du système immunitaire capable de lutter efficacement contre le parasite, afin de les favoriser lors d'une stratégie vaccinale. C'est ainsi que l'on sait que les anticorps spécifiques constituent la principale défense vis-à-vis des trypanosomes africains, alors que dans les Leishmanioses cutanées c'est surtout la réponse cellulaire qui intervient dans l'élimination du parasite (Roitt et coll. 1985). A la lumière des travaux réalisés, il semble que, dans la maladie de Chagas, la réponse humorale et la réponse cellulaire interviennent dans la survie des animaux infectés par *T. cruzi* (Trischman et coll. 1978).

#### *6. 2. 1. Importance de la réponse anticorps.*

##### *6. 2. 1. 1. Démonstration du rôle des anticorps dans l'élimination du parasite.*

L'infection par *T. cruzi* est suivie d'une très forte augmentation de la taille de la rate et des ganglions lymphatiques. Ceci est lié dans la majorité des cas avec une augmentation du nombre de lymphocytes B. Une controverse existe au sujet de l'évolution du taux d'immunoglobulines et de leurs spécificités durant la phase aiguë de la maladie. Néanmoins, de nombreux travaux s'accordent pour admettre qu'une partie de la réponse anticorps soit spécifique du parasite (Frasch 1989).

Les premières études concernaient la démonstration de la présence d'anticorps précipitants et (ou) agglutinants lors de la phase aiguë et de la phase chronique (Muniz et Freitas 1944). L'apparition de nouvelles techniques (immunofluorescence, l'ELISA, etc.) ont permis de mettre en évidence des anticorps dirigés contre le parasite dans les sérums humains et d'animaux infectés (Cerisola 1970, Krettli et Brener 1976).

Le rôle des anticorps dans la résistance contre l'infection à *T. cruzi* a été démontré par transfert passif. Il semble que la protection contre l'infection, par des anticorps spécifiques, puisse être importante pour certaines souches de *T. cruzi*. McHardy (1977) démontre qu'une seule dose de sérum anti-*T. cruzi* de souris en phase chronique, appliquée un jour après l'infection homologe, donne une protection très significative par rapport aux contrôles ayant reçu du sérum normal. Cependant les résultats sont plus faibles avec des sérums d'animaux en phase aiguë (Hauschka et coll. 1950), ceci est sans doute lié à l'activation polyclonale observée lors de cette phase de la maladie.

Il existerait une spécificité des anticorps vis-à-vis de la souche de parasite, en effet un sérum de souris en phase chronique dirigé contre la souche Y induit une protection plus faible, par transfert passif, si les souris sont infectées par la souche Tulahuén, par rapport à un contrôle infecté par la souche homologe. Une spécificité de stade semble également présente, puisque des sérums dirigés contre les formes épimastigotes confèrent une protection plus faible (cette forme n'est pas présente chez l'hôte vertébré) que des sérums dirigés contre les formes infectantes trypomastigotes (Hanson 1976).

Les travaux utilisant le transfert passif de cellules B montrent que celle-ci jouent un rôle important dans la protection (Scott 1981; Rowland et Ritter 1984), bien que les résultats de Reed (1980) attribuent un rôle prépondérant aux lymphocytes T.

Les résultats concernant les taux d'immunoglobulines dans les sérums humains et d'animaux infectés sont contradictoires. On note souvent chez l'homme une augmentation des IgG et (ou) des IgM lors de la phase aiguë, ces taux pouvant revenir à la normale ou rester élevés pendant la phase chronique. Chez la souris les perturbations portent essentiellement sur les IgG2 et (ou) IgG1 dont le taux très augmenté au pic de parasitémie ne diminue que tardivement lors de la phase chronique (Capbern et coll. 1974).

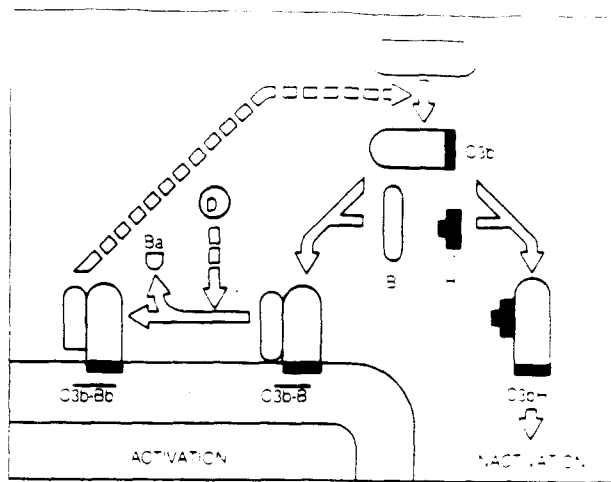
### 6. 2. 1. 2. Mécanisme d'action des anticorps.

Les anticorps peuvent intervenir dans l'élimination des parasites par différents mécanismes.

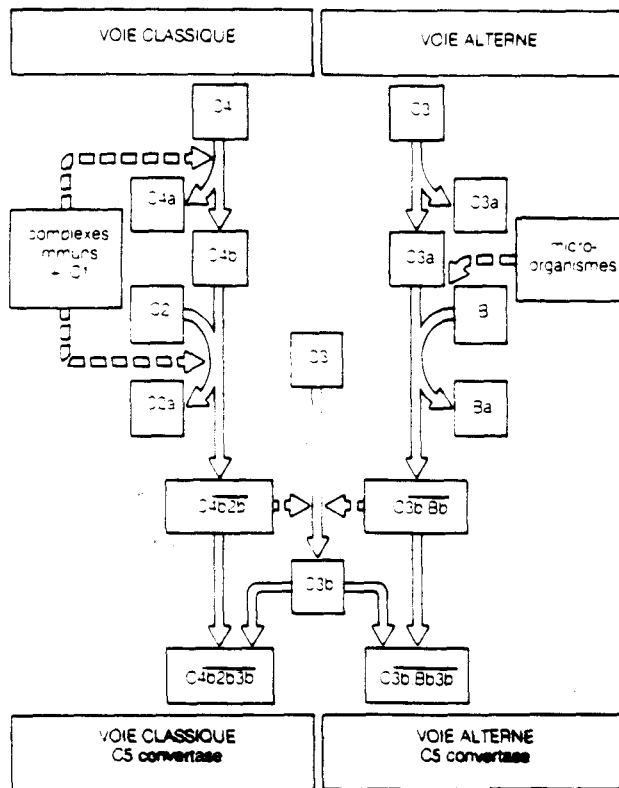
- Le parasite est opsonisé par le fragment C3b du complément qui est déposé sur sa membrane, ou par les anticorps qui permettent l'augmentation de l'adhésion et donc de la phagocytose par les macrophages et les monocytes.
- Les anticorps se fixent sur les récepteurs spécifiques d'attachement du parasite, empêchant ainsi son adhésion et sa pénétration dans les cellules hôte potentielles. Nous étudierons ce mécanisme plus loin dans l'exposé.
- Les anticorps peuvent participer aux mécanismes de cytotoxicité cellulaire. Le phénomène d'ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) résulte de la collaboration entre des anticorps spécifiques de la cible et des "cellules tueuses" possédant des récepteurs Fc.

Ce mécanisme de cytotoxicité a été démontré dans la lyse des formes trypomastigotes et épimastigotes. La plupart des cellules possédant un récepteur Fc ont été décrites comme cellules effectrices : les éosinophiles vis-à-vis des épimastigotes (Sanderson et coll. 1977), et des trypomastigotes (Kipnis et coll. 1981), les neutrophiles (Kipnis et coll. 1981), les macrophages et les lymphocytes (Okabe et coll. 1980) ainsi que les basophiles (Tambourgi et coll. 1989) vis-à-vis des formes infectantes, les trypomastigotes.

Les anticorps peuvent intervenir directement dans la lyse de la cible par l'intermédiaire du complexe multiprotéique du système du complément. Les complexes immuns, IgM ou IgG fixés sur une membrane cellulaire ou sur le "cell-coat" activent la voie classique et (ou) la voie alterne du complément provoquant la lyse cellulaire (Fig. 2a, 2b).



**Fig. 2c La voie alterne.** C3b et le facteur B se lient pour former C3b-B qui est converti en une C3 convertase active, C3b-Bb par perte d'un petit fragment Ba sous l'action du facteur D. C3b-Bb augmente la conversion de C3 en C3b qui va se combiner à nouveau au facteur B et perpétuer ainsi la boucle de rétro-action positive. La captation du facteur B par le C3b survient lorsque C3b est lié à une surface activatrice de phase liquide ou sur une surface non activatrice. C3b liera préférentiellement le facteur H empêchant ainsi la formation de C3b-B.



**Fig. 2b Analogies d'action entre les voies classique et alterne.** Les 2 voies donnent naissance à une C3 convertase : C4b2b pour la voie classique et C3b-Bb pour la voie alterne. Dans la voie classique, le C1 active par l'anticorps complexe clive C4 et C2 avec perte des petits fragments C4a et C2a. Les principaux composants forment C4b2b. Dans la voie alterne, le C3b préexistant se lie au facteur B qui est clivé et perd un petit fragment, Ba. Le fragment principal, Bb, reste lié pour former C3b-Bb. L'enzyme convertit plus de C3, perpétuant la boucle de rétro-action positive. Les surfaces activatrices, situées par exemple sur des micro-organismes, facilitent la liaison du facteur B et de C3b, et favorisent l'activation de la voie alterne. Les C3 convertases des 2 voies peuvent fixer davantage de C3 pour donner naissance aux enzymes qui activent le composant suivant de la séquence, C5 : C5 convertase de la voie classique (C4b2b3b), et C5 convertase de la voie alterne (C3b-Bb3b).

d'après Roitt et coll., 1985

La capacité de ces anticorps, appelés anticorps lytiques, à détruire les formes trypanomastigotes a été bien étudiée *in vitro* par Krettli et coll. (1979). Chez des souris infectées par la souche Tulahuen, l'épuisement du complément avec le facteur isolé du venin de cobra (qui épuise le facteur C3 du complément) entraîne une forte exacerbation de la maladie. Ceci suggère que le contrôle de la parasitémie est dû à la lyse *in vivo* des trypanomastigotes sanguicoles (Budzko et coll. 1975). De même Yoshida (1986) montre que la présence des anticorps lytiques est fortement liée à la protection *in vivo*.

Cependant Dalmaso et Jarvinen (1980) démontrent que les courbes de parasitémie et de mortalité, chez les souris déficientes en C5 sont similaires à celles obtenues chez la souris normale. Ces mêmes auteurs remarquent qu'il n'y a pas de différence au cours de l'infection entre un cobaye déficient en C4 et le témoin.

Ces différences seraient dues au fait que la lyse puisse faire intervenir soit la voie alterne du complément soit la voie classique. Elles peuvent être également expliquées par les travaux de Nogueira et coll. (1975), qui montrent que les trypanomastigotes sont capables de résister à la lyse médiée par le complément et les anticorps spécifiques du parasite. Ainsi les trypanomastigotes libèrent des substances inhibitrices de l'activité C<sub>3</sub> convertase de la voie classique et de la voie alterne du complément (Joiner et coll. 1987). De plus, la présence à la surface des trypanomastigotes d'un accepteur pour les Fc ou le Fab des immunoglobulines qui permet la protéolyse des anticorps par les enzymes parasitaires pourrait expliquer certains résultats négatifs (Cicarelli et Lopes 1989). Le même phénomène est d'ailleurs retrouvé sur le schistosomule qui est capable de fixer les immunoglobulines par leur partie Fc et de les couper (Auriault et coll. 1981).

Ainsi, aucun argument ne permet d'affirmer de façon définitive que les anticorps lytiques participent activement à l'élimination des parasites *in vivo*.

### 6. 2. 2. Importance des lymphocytes T dans la résistance à l'infection.

Des études faites chez le rat et la souris montrent que la réponse primaire à *T. cruzi* est sous la dépendance de la réponse cellulaire. De plus les expériences de transfert passif de cellules suggèrent fortement un rôle important des cellules lymphoïdes. Le transfert de lymphocytes B et T sensibilisés entraîne d'ailleurs une protection chez des receveurs murins susceptibles (Roberson et Hanson 1974).

Néanmoins si l'on essaye de déterminer la sous-population lymphocytaire jouant le rôle majeur dans la résistance au parasite, les résultats deviennent contradictoires. Ainsi Reed (1980) montre que la sous-population enrichie en lymphocytes T confère une protection plus efficace que la sous-population enrichie en lymphocytes B. De même, on observe une augmentation de la sévérité de l'infection à *T. cruzi* lors : de la thymectomie néonatale chez la souris; de l'administration de sérum anti-thymocytes (Roberson et coll. 1973); de l'infection de souris "nude" (Kierszenbaum et Piewkowski 1979). Ces différents travaux suggèrent un rôle important des cellules T dans l'élimination du parasite. Néanmoins Trischmann et coll. (1980) démontrent une protection plus importante lors d'un transfert passif de lymphocytes appauvries en cellules T que la sous-population T elle même.

Ces résultats parfois divergents peuvent s'expliquer par le double rôle des lymphocytes T : dans les mécanismes cellulaires et dans l'effet "helper" de la réponse humorale. Cette double activité des lymphocytes T a été bien étudiée par Trischmann (1984). En effet si l'on transfère des lymphocytes T à des souris déprimées en lymphocytes B, on observe une diminution de la parasitémie, ce qui suggère un rôle de la réponse cellulaire. Mais si ce transfert est réalisé chez des souris normales, on observe une forte baisse de la parasitémie, ce qui est en faveur du rôle "helper" des lymphocytes T.

Un rôle réel des lymphocytes T dans la réponse anti-parasitaire n'a pas été clairement établi lors de la phase aiguë de la maladie. La plupart des auteurs s'accordent pour admettre que la réponse T cytotoxique est rendue inefficace par le parasite. Plata (1985) montre que des souris BALB/c qui rejettent naturellement les tumeurs induites par le "Gross virus" grâce aux CTL, en sont incapables quand elles sont infectées par *T. cruzi*. Ceci semble lié à une baisse du nombre de CTL dirigés contre le virus. La réponse T cytotoxique paraît donc entièrement déprimée et non spécifique lors de la phase aiguë de la maladie (Petry et coll. 1989).

Lors de la phase chronique, les lymphocytes T retrouvent une spécificité vis-à-vis des antigènes parasitaires. Ainsi les CTL d'animaux en phase chronique peuvent détruire *in vitro* des cellules cardiaques et des fibroblastes infectées par *T. cruzi* (Santos Buch et Teixeira 1974; Kuhn et Murnane 1977). Néanmoins ces CTL seraient en partie responsables de la pathologie de la phase chronique. En effet la cardiopathie peut être transférée par les lymphocytes T d'animaux en phase chronique (Laguens 1981).

Le rôle des cellules NK est très mal connu. Hatcher et Kuhn (1982) ont montré l'existence de cellules NK cytotoxiques vis-à-vis des formes trypomastigotes et épimastigotes *in vitro*, pourtant l'importance *in vivo* de ces cellules dans l'immunité anti-parasitaire est encore très discutée.

A la lumière de ces résultats, il semble que les lymphocytes T puissent jouer un rôle important dans l'élimination du parasite, néanmoins, l'immunosuppression très importante observée lors de la phase aiguë de la maladie diminue fortement leurs capacités protectrices.

### 6. 2. 3. Importance des macrophages dans la résistance à l'infection.

Le macrophage est à la fois une cellule hôte pour le trypomastigote et une cellule pouvant intervenir dans la clearance du parasite.

Si le macrophage n'est pas activé, le trypomastigote pénètre dans la cellule, détruit la vacuole parasitophore, et se multiplie dans le cytoplasme entraînant à court terme la mort de la cellule (Hoff 1975). Par contre, une fois activé, le macrophage est capable de détruire les trypomastigotes intracellulaires. Les premiers travaux montrant la capacité des macrophages à éliminer les parasites ont été réalisés par Taliafero et coll. (1955). Des macrophages de souris immunisées avec du BCG sont capable de détruire plus efficacement *T. cruzi in vitro* que des macrophages d'animaux sains (Hoff 1975), de même des macrophages d'animaux immuns vis-à-vis de *Toxoplasma gondii* possèdent une cytotoxicité exacerbée contre le trypomastigote (Williams et coll. 1976). Cette cytotoxicité non spécifique est liée à un accroissement de l'activité respiratoire du macrophage, conduisant à la production de métabolites de l'oxygène (superoxyde, peroxyde) qui sont cytotoxiques pour la majorité des parasites : les toxoplasmes, les leishmanies, les filaires, les schistosomes etc... (Roitt et coll. 1985).

Dans ce contexte, les différentes cytokines capables d'activer le macrophage, induisent *in vitro* et *in vivo* une diminution de la charge parasitaire : interferon alpha et gamma (Wirth et coll. 1985; Reed et coll. 1988), "Tumor Necrosis Factor" (de Titto et coll. 1986; Black et coll. 1989).

L'étude de l'immunité ne serait pas complète si elle ne tenait pas compte de l'existence de mécanismes d'échappement qui vont permettre au parasite de se défendre contre la réponse immune de son hôte.



## 7. Mécanismes d'échappement de *T. cruzi* à la réponse immune de l'hôte.

Malgré la diversité et l'efficacité des mécanismes effecteurs précédemment décrit, le parasite survit chez son hôte. Ceci est le résultat d'un équilibre subtil entre les mécanismes effecteurs de l'hôte et les mécanismes de défense mis en oeuvre par le parasite.

Ces mécanismes peuvent être répartis schématiquement en trois groupes :

- Le travestissement antigénique.
- La multiplication intracellulaire.
- La modulation de la réponse immune de l'hôte.

### 7. 1. Le travestissement antigénique.

#### 7. 1. 1. Variation antigénique du parasite.

S'il n'a pas été mis en évidence de variations antigéniques durant l'infection comme chez les trypanosomes africains, des différences entre les souches de *T. cruzi* ont été observées depuis longtemps. Ces différences se situent au niveau de la morphologie, de l'évolution de l'infection chez l'hôte, de l'affinité pour les tissus chez le modèle animal. Romanha et coll. (1982) classifient les souches de *T. cruzi* en quatre groupes ou zymodèmes en se basant sur l'étude des isoenzymes. D'un autre côté Morel et coll. (1980) classifient les parasites en schizodèmes suivant leur migration électrophorétique après digestion de l'ADN kinétoplastique par des enzymes de restriction. Dans une étude récente Carneiro et coll. (1990) ont montré que le zymodème et le schizodème d'un clone de *T. cruzi* pouvait se modifier lors d'un maintien pendant 18 mois de ce clone, chez l'animal. Ces résultats suggèrent donc une certaine variation antigénique du parasite, dans le temps.

### 7. 1. 2. *Mimétisme moléculaire.*

Il semble que les trypomastigotes soient capables d'exprimer à leur surface des antigènes très semblables voir identiques à ceux de l'hôte (Wood et coll. 1982). Par ce "masquage" moléculaire le parasite détourne en partie la réponse immune de l'hôte et est capable d'induire une réponse de type auto-immune. Cette réponse auto-immune serait, selon certains auteurs, importante dans la pathologie de la phase chronique (Petry et coll. 1989).

### 7. 1. 3. *Acquisition d'antigènes d'hôte.*

La conséquence de ce mécanisme est la même que pour le mimétisme moléculaire, c'est à dire détourner la réponse immune de l'hôte. Ce mécanisme a été décrit pour les épimastigotes qui sont capables d'exprimer à leur surface les protéines du milieu de culture (Kierszenbaum et coll. 1987). De même les trypomastigotes qui émergent de la cellule hôte possèdent à leur surface des antigènes cellulaires (Chess et coll. 1983).

### 7. 2. *Développement intracellulaire du parasite.*

Une fois à l'intérieur de la cellule, le parasite peut se multiplier à l'abri des agressions immunes, c'est donc pour lui une façon d'échapper à la réponse immune de l'hôte.

*T. cruzi* est capable de pénétrer dans de nombreuses cellules d'espèces différentes. Il se multiplie aussi bien dans les cellules phagocytaires que dans les cellules musculaires. Le macrophage est actuellement la cellule privilégiée pour étudier ce mécanisme de survie dans le cytoplasme. Contrairement aux formes épimastigotes (non infectieuses pour les mammifères) qui sont détruites à l'intérieur du macrophage, les trypomastigotes (formes infectantes) échappent à cette destruction. Ce mécanisme d'échappement est probablement

un mécanisme actif de la part du parasite, en effet il semble que le lysosome macrophagique fusionne avec la vacuole parasitophore contenant le parasite qui secrète alors une hémolysine, protéase active à pH acide. Cette hémolysine détruit le phagolysosome permettant la libération du parasite dans le cytoplasme où il se multiplie (Andrews et Whitlow 1989).

Ce mécanisme est différent des autres protozoaires intracellulaires. En effet, les leishmanies se multiplient dans la vacuole phagocytaire où elles résistent à l'action destructrice des enzymes lysosomiaux. Le cas de *Toxoplasma gondii* est encore très discuté, il semble que le parasite inhibe la fusion des lysosomes secondaires avec le phagosome dans lequel vivent les tachyzoïtes (Roitt et coll. 1985).

### 7. 3. *Modulation de la réponse immune de l'hôte.*

L'infection par *T. cruzi* provoque une rupture dans le système immunitaire de l'hôte durant la phase aiguë et chronique de la maladie, conduisant aux phénomènes pathologiques connus sous le nom de maladie de Chagas.

#### 7. 3. 1. *Immunopathologie de la phase aiguë.*

Si tous les auteurs admettent que la phase aiguë est caractérisée par une suppression importante de la réponse immunitaire qui touche principalement les cellules lymphoïdes, très peu s'accordent sur les mécanismes responsables de cette immunosuppression.

Dès le début de l'infection, on observe une forte activation du système immunitaire, en partie dirigée contre les trypanostigotes, comme en témoignent les travaux décrivant une réponse humorale et cellulaire spécifique du parasite (Rowland et Masters 1987; Frasch 1989). La transformation blastique est suivie d'une forte augmentation du nombre de lymphocytes B et d'une augmentation de la taille de la rate (O'Daly et coll. 1984).

Néanmoins très rapidement, intervient une activation polyclonale lymphocytaire qui dévie la réponse immune, du parasite. Cette activation serait sous la dépendance des lymphocytes T "helper". En effet le traitement de souris en phase aiguë de la maladie, par des anticorps dirigés contre les cellules  $L_3T_4$ , provoque une diminution de l'activation polyclonale (Minoprio et coll. 1987).

Après 7 à 15 jours d'infection, suivant les animaux et les souches de parasites, apparaît une suppression de la réponse proliférative *in vitro* des lymphocytes aux antigènes parasitaires ou aux mitogènes (Clinton et coll. 1975) et une diminution de la réponse humorale (O'Daly et coll. 1984). L'origine de cette suppression est mal connue et très controversée, de plus il est souvent difficile de faire la part entre la cause et la conséquence.

L'immunosuppression serait liée suivant les auteurs :

- à une diminution du nombre de lymphocytes T lors du pic de parasitémie (Hayes et Kierszenbaum 1981);
- à une diminution de la réponse T "helper" et une augmentation concomitante des cellules suppressives (lymphocytes T supresseurs (Tarleton et Scott 1987), ou macrophages supresseurs (Cunningham et Kuhn 1980));
- actuellement de très nombreux travaux montrent une diminution du taux d'IL-2 et une augmentation du taux de son récepteur soluble;
- à une activation polyclonale des lymphocytes B;
- à l'existence de substances immunosuppressives d'origine parasitaire ou cellulaire.

#### 7. 3. 1. 1. Modulation de l'IL-2 et de son récepteur cellulaire.

L'incapacité des cellules à produire de l'IL-2 pourrait provenir soit de la présence des lymphocytes T supresseurs soit de l'incapacité des cellules à produire de l'IL-2 après stimulation (Harel Bellan et coll. 1983).

La première hypothèse est confortée par le fait que l'injection *in vivo* d'IL-2 restaure en partie la réponse anti-parasitaire ce qui abouti à une baisse de la parasitémie (Choromanski et Kuhn 1987).

La deuxième hypothèse est reprise par Tarleton (1988) qui suggère que les lymphocytes sont incapables de répondre à l'IL-2 *in vitro*, ceci étant probablement du à un état d'activation très élevé. Ainsi si l'on prélève des cellules de la rate d'animaux en phase aiguë et qu'on les stimule par la Con A, il n'y a pas d'augmentation de la sécrétion d'interleukine. Par contre si on laisse en culture pendant 36 h ces mêmes cellules, puis qu'on les stimule, on observe une augmentation de la sécrétion d'IL-2, sécrétion qui est inhibable par l'addition, lors de la mise en culture, de trypomastigotes fixés.

La forte diminution de récepteurs à l'IL-2 à la surface des lymphocytes T pourrait expliquer également l'incapacité des lymphocytes à répondre à l'IL-2 (Kierszenbaum et coll. 1989a). Ainsi si l'on fait une coculture de trypomastigotes avec des lymphocytes humains on observe une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* sans modification de la sécrétion d'IL-2. Dans le cas de lymphocytes murins, on observe à la fois une baisse de la prolifération et du taux d'IL-2 (Beltz et Kierszenbaum 1987). Le facteur commun aux deux espèces serait la forte diminution du nombre de cellules présentant le récepteur à l'IL-2, que ce soit celui de forte ou de faible affinité (Kierszenbaum et coll. 1989b). L'absence du récepteur à l'IL-2 sur les lymphocytes serait due soit à un facteur soluble relargué par les trypomastigotes (Kierszenbaum et coll. 1989a) soit à une substance sécrétée par les cellules spléniques d'animaux infectés (Rottenberg et coll. 1989).

Cette diminution de la sécrétion d'interleukine et de la présence du récepteur à l'IL-2 n'est observé qu'au pic de parasitémie. En effet, au début de l'infection, la sécrétion d'IL-2 et la quantité de récepteur à l'IL-2 sur les lymphocytes sont augmentées (Rottenberg et coll. 1989).

### 7. 3. 1. 2. *Activation polyclonale des lymphocytes B.*

Alors que la capacité de produire des anticorps vis-à-vis d'antigènes parasitaires est fortement diminuée, paradoxalement une hyper-immunoglobulinémie est constatée lors de la phase aiguë de la maladie (Minoprio et coll. 1986). Ceci serait le résultat d'une activation polyclonale des lymphocytes B. Ce phénomène est en relation avec l'immunosuppression car la phase de synthèse anarchique d'immunoglobulines est suivie d'un épuisement des cellules B réactives qui seraient alors incapables de répondre aux stimuli antigéniques (Corsini et coll. 1977).

Cette hyper-immunoglobulinémie est retrouvée dans la trypanosomiase africaine (de type IgM), dans la malaria (de type IgG et IgM), dans les helminthiases (de type IgE) (Cohen 1974).

### 7. 3. 1. 3. *Origine des substances immunosuppressives.*

Deux hypothèses sur l'origine des substances suppressives de la réponse immune présentes dans le sérum des animaux en phase aiguë, peuvent être avancées. Elles sont, soit libérées par les cellules de la rate soit d'origine parasitaire.

La première hypothèse est basée sur les résultats suivants : si l'on met en présence des cellules de rate d'animaux en phase aiguë avec des cellules d'animaux sains, on observe une diminution de la réponse aux mitogènes des lymphocytes sains (Cunningham et Kuhn 1980). Cette substance non parasitaire (Liew 1988), mais non encore purifiée et identifiée, pourrait activer les cellules suppressives (Serrano et O'Daly 1987); de plus sa présence est liée à l'apparition de l'immunosuppression.

D'autres travaux sont en faveur de la deuxième hypothèse. En effet le contact de trypomastigotes sanguicoles ou d'un sonicat de trypomastigotes avec des lymphocytes *in vitro* inhibe la réponse de ces cellules aux mitogènes (Con A, LPS). Cet effet suppresseur n'est observé qu'après une incubation des antigènes parasitaires de 24 heures, avec les cellules cibles (Maleckar et Kierszenbaum 1983).

Il est évident que ces deux types d'observation peuvent agir simultanément pour provoquer l'immunosuppression, caractéristique de la phase aiguë de cette maladie. Cette suppression de la réponse immune n'est pas un phénomène propre à *T. cruzi*, en effet on retrouve ces différents mécanismes dans la plupart des autres parasitoses dues à des protozoaires ou à des helminthes mais également lors d'infection virale comme le syndrome d'immunodéficience humaine ou l'encéphalite japonaise B due à *Trichinella spiralis*.

### 7. 3. 2. Immunopathologie de la phase chronique.

La pathogénie de cette phase est controversée. Deux grandes explications ont cours : persistance du pouvoir pathogène du parasite ou séquelles de la phase aiguë; une troisième est fortement discutée : l'auto-immunité.

Pour beaucoup d'auteurs, les lésions observées lors de la phase chronique sont dues à l'agression continue des parasites, commencée pendant la phase aiguë et poursuivie à travers les foyers inflammatoires. Ainsi il existe des antigènes parasitaires adsorbés sur les cellules musculaires infectées et non infectées et en particulier cardiaques, ce qui provoque à court terme leur destruction par le système immun (Arauyo 1985). Ces antigènes pourraient provenir directement des parasites encore présents dans les tissus et dont la multiplication est sous le contrôle actif du système immun.

Pour Koberle (1969), la pathogénie des manifestations chroniques résulte d'une destruction nerveuse qui se produit pendant la phase aiguë et dont elle représente les séquelles.

Il existe dans la maladie de Chagas des signes d'une maladie auto-immune (Petry et coll. 1989) : réaction immunitaire à médiation cellulaire anti-soi (cytotoxicité et hypersensibilité retardée anti-tissu de l'hôte), activation polyclonale des cellules B, suppression de la réponse spécifique aux antigènes et production d'auto-anticorps.

De nombreux travaux ont montré le rôle des lymphocytes T cytotoxiques dans la pathologie chagastique. En 1974, Santos-Buch et coll. ont montré que des lymphocytes T de lapins infectés chroniquement par *T. cruzi* sont capables de lyser des cellules cardiaques parasitées ou non. De plus, des cellules cytotoxiques vis-à-vis de cellules cardiaques saines sont présentes chez des malades chagastiques (Teixeira et coll. 1978). La pathologie serait liée également à des réactions d'hypersensibilité retardée médiée par des cellules T helper. En effet le transfert passif de lymphocytes L3T4+ de souris infectées en phase chronique à des souris saine induit des foyers inflammatoires avec atteintes des muscles et des nerfs (Minoprio et coll. 1987).

Le syndrome auto-immun de la maladie de Chagas comprend aussi des facteurs humoraux tels que la présence d'auto-anticorps chez les malades. Deux types d'auto-anticorps ont plus particulièrement retenu l'attention : les anticorps anti-EVI et les anticorps anti-tissu nerveux. Les anticorps anti-EVI réagissent avec la membrane plasmique des muscles striés et les cellules endothéliales. Ils sont retrouvés chez 95% des malades cardiopathiques et 45% des malades asymptomatiques (Cossio et coll. 1974). Les anticorps anti-tissu nerveux sont présents de manière parallèle chez les porteurs d'anticorps anti-EVI (Khoury et coll. 1979). Dans les deux cas, l'adsorption des sérums sur des épimastigotes inhibe leur capacité à reconnaître les cellules de l'hôte. Ces résultats suggèraient l'existence d'une réactivité croisée entre les tissus de l'hôte et *T. cruzi*. Ceci a été confirmé par l'existence d'anticorps monoclonaux réagissant à la fois avec l'hôte et le parasite (Wood et coll. 1982). L'immunisation d'animaux avec ces antigènes parasitaires présentant des réactions croisées, reproduit en partie les lésions typiques de la maladie de Chagas (Acosta et Santos-Buch 1985).

Néanmoins Kierszenbaum et coll. (1987) affirment que les épimastigotes sont capables d'ingérer des composants du milieu de culture et que la présence des cellules T cytotoxiques est une conséquence de la destruction cellulaire et non une cause.



## 8. Stratégie vaccinale.

Les études de la pathologie de la maladie ont mis en évidence la difficulté d'établir une politique vaccinale qui consisterait à utiliser un extrait brut de *T. cruzi*. Elles constituent une importante raison de se tourner vers l'utilisation de protéines purifiées.

Les travaux de Snary (1983) montrent que l'immunisation par la gp 72, protéine majeure des épimastigotes, permet la survie d'animaux infectés par les trypanomastigotes métacycliques mais ne protège pas vis-à-vis d'une infection par les trypanomastigotes sanguicoles. L'immunisation de souris par la protéine de 90 kDa qui est commune à tous les stades du parasite, permet de les protéger efficacement d'une infection par les trypanomastigotes métacycliques et sanguicoles (Scott et Snary 1979). Des travaux plus récents (Arauyo et Morein 1988) ont montré que l'immunisation de souris avec une protéine flagellaire de 45 kDa induit une protection très significative vis-à-vis de l'infection par *T. cruzi*. Néanmoins, malgré la forte diminution, chez les animaux immunisés, de la parasitémie lors de la phase aiguë, certains passent en phase chronique. Ces différents exemples montrent quand même, que le parasite est vulnérable à la réponse immune de l'hôte et ceci laisse supposer que le développement d'une stratégie vaccinale contre la maladie de Chagas est possible.

Cette stratégie exige un certain nombre de conditions (Goldenberg et coll. 1983) : le vaccin ne doit pas produire d'infection, doit conférer une protection stérilisante, doit être dirigé contre les différentes souches du parasite, ne doit pas provoquer une agression auto-immune et finalement ne doit pas induire un état d'immunosuppression.

Deux stratégies sont envisagées actuellement :

- La formation d'une banque génomique de *T. cruzi*, afin d'identifier les gènes spécifiques codant pour les antigènes de surface des trypanomastigotes.
- L'identification des récepteurs impliqués dans les phénomènes d'adhésion et de pénétration, suivie de la production d'anticorps qui pourraient alors inhiber l'invasion de la cellule hôte par le parasite.

Cette dernière stratégie implique de connaître tous les récepteurs d'adhésion du parasite et donc de connaître toutes les cellules infectées par le trypanostigote lors de sa pénétration dans l'organisme.

Dans cette stratégie vaccinale visant à produire des anticorps capables de bloquer l'invasion de la cellule hôte, le modèle de *Theileria annulata* est actuellement le plus avancé. Ainsi un anticorps monoclonal (Ac Mc) dirigé vis-à-vis du sporozoïte, inhibe *in vitro* l'invasion du lymphocyte à 80%. Cet anticorps a permis de cloner une protéine spécifique de stade de masse moléculaire de 135 kDa et de produire un sérum polyclonal vis-à-vis de la protéine recombinante qui inhibe à près de 100% l'infection *in vitro* des lymphocytes par *Theileria annulata* (Carter et coll. 1988).

### **9. Interaction parasite-cellule.**

L'invasion cellulaire pour certains parasites est un stade vital dans leur cycle de développement. C'est le cas de *T. cruzi*, parasite intracellulaire obligatoire, dont la pénétration dans les cellules de mammifères nécessite une phase d'adhésion. L'identification des molécules de *T. cruzi* intervenant dans l'interaction entre le trypanostigote et la cellule hôte est donc une étape obligatoire pour comprendre les différents processus de pénétration et est essentielle pour prévenir la maladie.

Les premiers travaux effectués dans ce domaine ont montré qu'une préparation brute des protéines de membrane du parasite, inhibe partiellement la pénétration du trypanostigote (Kierszenbaum et Stiles 1985), ce qui suggère que des composants de la membrane parasitaire participent à l'infection. Les composants glucidiques ont un rôle très important dans cette association entre le parasite et la cellule hôte potentielle. Ainsi l'infection de cellules musculaires par le parasite est inhibée partiellement par des lectines telles que la concanavaline A, la lectine du germe de blé... (Henriquez et coll. 1981). Si l'on traite des cellules de vertébré avec des monosaccharides, aucune modification de la pénétration du parasite n'est observé. Par contre le traitement des trypanostigotes par

certaines monosaccharides entraîne une diminution de l'infectivité (Crane et coll. 1982) et l'inhibition de la synthèse des glycoprotéines parasitaires modifie l'attachement du parasite. La puromycine bloque le pouvoir d'adhésion et de pénétration du parasite à la différence de la tunicamycine qui ne bloque que l'infectivité du trypomastigote (Piras et coll. 1982a).

Ces différents résultats suggèrent que l'adhésion et la pénétration sont deux événements distincts du processus infectieux et que des glycoprotéines sont impliquées dans la phase de pénétration.

Il apparaît que des parasites récemment libérés par les cellules possèdent un pouvoir infectieux plus faible que des parasites restés pendant quelques heures dans le milieu de culture (Piras et coll. 1982b). L'utilisation de la trypsine suggère que la phase d'adhésion du trypomastigote sur les fibroblastes fait intervenir une protéine membranaire qui est présente sur les trypomastigotes récemment libérés de la cellule, mais sous forme inactive. Pendant la maturation extracellulaire du parasite, cette protéine est activée ou démasquée probablement par un processus de protéolyse endogène (Piras et coll. 1985).

La phase de pénétration nécessiterait la synthèse d'une glycoprotéine, sensible à la tunicamycine, dont l'expression serait affectée par des constituants du sérum. En fait, l'infectivité du parasite (mais non son attachement) est augmentée dans un milieu frais par rapport à un milieu contenant du sérum inactivé. Le composant thermolabile qui augmente la pénétration serait une ou des protéines du complément ou des sialo-glycoprotéines comme la fétuine (Piras et coll. 1986). La fétuine agirait, comme les autres sialo-glycoprotéines par transfert des acides sialiques sur les protéines des trypomastigotes qui deviendraient actives et interviendrait dans la pénétration.

Au niveau moléculaire, Lima et Villalta (1989) ont observé que les trypomastigotes sanguicoles, prélevés chez l'animal, sont composés de sous-populations parasitaires très hétérogènes avec des capacités d'adhésion très variables. Par clonage des trypomastigotes, ils observent qu'il existe des clones possédant une forte capacité d'adhésion qui est

correlée avec la présence d'une glycoprotéine de 83-85 kDa. Cette glycoprotéine se fixe de façon spécifique et réversible sur les cellules cardiaques. Ces résultats suggèrent qu'une glycoprotéine de 83-85 kDa intervient dans l'attachement du parasite aux cellules de mammifères.

D'autres études ont également montré que le candidat potentiel serait une glycoprotéine de 83-85 kDa comme récepteur parasitaire alors que pour la cellule hôte la fibronectine serait le site d'attachement du trypanostigote à la cellule. Avant de décrire l'état actuel des connaissances sur cette interaction ligand-récepteur, étudions quelques composants qui interviennent dans les phénomènes d'adhésion.

#### *9. 1. Les molécules d'adhésion.*

Les propriétés d'adhésion des cellules interviennent dans des processus aussi divers que la migration au cours de l'embryogenèse, la différenciation, la cicatrisation, la destruction par les lymphocytes de certaines cibles. L'adhésion se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires dont l'analyse devait indiquer qu'il s'agissait de molécules voisines, vraisemblablement dérivées, au cours de l'évolution, d'un gène ancestral commun. Ruoslahti et Pierschbacher (1986) devaient déceler au niveau de ces récepteurs des sites de reconnaissance comportant la séquence arginine-glycine-aspartate et le plus souvent, sérine (RGDS). Il faut bien différencier la notion d'adhésiotope, élément peptidique qui constitue des signaux probablement universels de reconnaissance des molécules d'adhésion cellulaire, et la description des "adhésines ou intégrines" qui constituent des récepteurs glycoprotéiques pour ces adhésiotopes (Tableau 1). Ces récepteurs sont constitués de deux types de sous-unité : la sous unité alpha qui est très variable et la sous-unité bêta qui est relativement constante à l'intérieur d'une même famille (Hynes 1987).

Tableau 1

PROTEINES CONTENANT LA SEQUENCE  
 ARGININE-GLYCINE-ASPARTATE-SÉRINE (RGDS)  
 OU DES SEQUENCES APPARENTÉES

Séquence	Protéine
RGD	<ul style="list-style-type: none"> <li>- récepteur de l'EGF (epithelial growth factor)</li> <li>- <math>\beta</math>-transforming growth factor (TGF-<math>\beta</math>)</li> <li>- facteur von Willebrand</li> <li>- laminine</li> </ul>
RGDS (active)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- protéase alpha-lytic Myxobacter 495</li> <li>- protéine récepteur du phage Lambda (<i>E. coli</i>)</li> <li>- polyprotéine d'enveloppe (Sindbis virus)</li> <li>- VPI (virus des maladies des pieds et de la bouche)</li> <li>- protéine basique testiculaire (rat)</li> <li>- fibrinogène chaîne alpha (homme)</li> <li>- fibronectines : site de liaison à la cellule</li> </ul>
RGDA (active)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- collagène chaîne alpha-1 (type I) (bœuf et homme)</li> <li>- collagène chaîne alpha-2 (type I) (poulet)</li> <li>- thrombine (bœuf et homme)</li> <li>- discoidine I, chaîne A</li> <li>- précurseur de la vitellogénine I (drosophile)</li> <li>- 3 Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase (porc)</li> </ul>
RGDT (active)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- collagène chaîne alpha-2 (type I) (homme)</li> <li>- P1 (homme : virus de l'influenza)</li> </ul>
RGDV (active)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- second site de liaison à la cellule fibronectine de rat</li> <li>- vitronectine</li> </ul>
RGDP (inactive)**	<ul style="list-style-type: none"> <li>- collagène chaîne alpha-1 (type IV)</li> </ul>
RGDK (inactive)**	<ul style="list-style-type: none"> <li>- collagène chaîne alpha-2 (type I)</li> </ul>
RFDS (inactive)**	<ul style="list-style-type: none"> <li>- domaine alpha-1 des protéines de classe I du CMH</li> <li>- domaine alpha-1 des protéines de classe II du CMH</li> <li>- chaîne polypeptidique codée par la famille de virus HIV (SIDA)</li> </ul>
SDGR (active)*	<ul style="list-style-type: none"> <li>- domaine alpha-2 des protéines de classe I du CMH</li> </ul>
DGR	<ul style="list-style-type: none"> <li>- fibroblast growth factor (FGF)</li> <li>- ubiquitine</li> </ul>

d'après Thiéry et coll. 1987

### 9. 1. 1. *Les molécules d'adhésion des lymphocytes T.*

Les lymphocytes T circulent dans le sang et la lymphe ou sont immobilisés dans un organe lymphoïde, les molécules d'adhésion du lymphocyte T interviennent à la fois dans la fixation de la cellule dans les organes et dans l'interaction du lymphocyte avec les cellules présentant l'antigène ou avec les cellules cibles. L'adhésion peut être soit spécifique de l'antigène via le récepteur T (TcR) soit de façon non spécifique grâce à différents récepteurs d'adhésion. Ces molécules d'adhésion se regroupent en deux familles moléculaires : l'une est la famille des gènes apparentés à ceux des immunoglobulines qui regroupent le TcR, le CD2, le CD4, le CD8 dont chaque ligand a été identifié (Tableau 2); l'autre regroupe les protéines LFA-1, CR3, p150.95 qui appartiennent à une famille de molécules d'adhésion intercellulaire telles que le récepteur fibronectine. Certaines de ces molécules comporteraient des adhésiotopes, ainsi Auffray et coll. (1986) ont montré que, dans les molécules du CMH de classe II, la séquence RFDS (Arg-Phe-Asp-Ser) était conservée et qu'elle pourrait réagir avec la séquence RADS présente dans le CD4. On retrouve également à la surface des lymphocytes les antigènes VLA ("Very Late Activation antigen") des lymphocytes T. Ces récepteurs reconnaissent comme les intégrines, la fibronectine, le collagène ou la laminine.

### 9. 1. 2. *Les molécules d'adhésions de la matrice extracellulaire.*

#### 9. 1. 2. 1. *Les fibronectines.*

Les fibronectines constituent une classe de glycoprotéine de haut poids moléculaire, formée de deux sous unités de 220 à 250 kDa reliées par deux ponts disulfures. Cette structure peut être subdivisée en domaines qui semblent responsables chacun d'une des propriétés de fixation de la fibronectine sur la fibrine, le collagène, l'héparine et les cellules (Yamada et Hynes 1982). Il existe plusieurs types de

Tableau 2  
LES MOLECULES D'ADHESION DES LYMPHOCYTES T

Denomination	Structure Poids moléculaire	Expression cellulaire	Fonction	Ligand
LFA-1 (CD11a)*	dimérique 177,93 kD	leucocytes	adhésion	ICAM 1 - ?
CD2 (T11) (récepteur pour les glo- bules rouges de mouton)	50 kD	T (NK)**	adhésion, activation T	LFA-3
CD4 (T4)	60 kD	T (monocyte, cellule follicu- laire dendriti- que, système nerveux)	adhésion, régulation négative ?	molécules HLA de classe II
CD8 (T8)	30 kD dimérique	T (= NK)**	adhésion, régulation négative ?	molécules HLA de classe I

\* CD : cluster de différenciation. Chaque molécule membranaire des leucocytes est définie par un CD et identifiée par un numéro (LFA-1 : CD11a, T11 : CD2, T4 : CD4, T8 : CD8...).

\*\* NK = Natural Killer.

d'après Fischer et coll. 1987

fibronectine, les plus connus étant la fibronectine cellulaire de surface (1 à 3% des protéines de surface des fibroblastes cultivés *in vitro*) et la fibronectine libre ou circulante que l'on retrouve dans le plasma des mammifères (300 à 400 mg/l). Ces deux types de fibronectine présentent de grandes homologues de structure et de fonction. Les différences observées résultent de maturations différentes de l'ARN transcrit à partir d'un seul gène (Hynes 1986). La molécule est constituée de petites séquences d'acides aminés répétées plusieurs fois dont on distingue trois types (I, II, III). La séquence RGDS caractérise les séquences répétées de type III appartenant aux domaines d'ancrage aux cellules. Cette séquence joue un rôle fondamental dans la fixation de la fibronectine aux récepteurs cellulaires (Pierschbacher et Ruoslahti 1984) qui sont des complexes glycoprotéiques de 140 kDa (Akiyama et coll. 1986).

#### 9. 1. 2. 2. *Les collagènes.*

L'unité élémentaire de la molécule de collagène, appelée tropocollagène, est composée de trois chaînes polypeptidiques hélicoïdales enroulées les unes autour des autres en triple hélice. Chaque extrémité de la molécule se termine par une courte séquence non hélicoïdale de 20 acides aminés appelée télépeptide où se forment les liaisons covalentes. Les principaux acides aminés rencontrés sont la glycine (30%), la proline et l'hydroxyproline (20% pour ces deux derniers). Certains résidus hydroxylysine, autre acide aminé caractéristique du collagène, portent, sur leur groupement hydroxyle, des glycanes (galactose ou glucosylgalactose) permettant de classer le collagène parmi les glycoprotéines.

Cinq types de collagène génétiquement distincts (type I à V) ont été décrits biochimiquement et morphologiquement (Bornstein et Sage 1980). Ils constituent les collagènes majeurs. Les fibres de collagène de type I sont présentes dans la plupart des tissus conjonctifs et même forment la totalité du collagène au niveau de l'os et de la dentine. Le collagène de type II est localisé au niveau des cartilages et du corps vitré de l'oeil. Le collagène de type III est souvent associé au collagène de type I dans la plupart des tissus conjonctifs. Il est particulièrement abondant dans les tissus à grande flexibilité



(tissus embryonnaires, derme, paroi des gros vaisseaux sanguins). Le collagène de type IV se retrouve au niveau de la membrane basale c'est un collagène très flexible. Initialement, le collagène de type V fut classé comme collagène de membrane basale. Des études plus récentes ont décrit une localisation péri-cellulaire ou en association avec des fibres de collagène interstitiel (Adamson 1983). On trouve également les collagènes embryonnaires et les collagènes mineurs. La séquence RGD se retrouve dans la chaîne  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la triple hélice (Bernard et coll. 1983).

#### *9. 2. Mécanisme d'adhésion du trypanostigote à la cellule hôte.*

Des études récentes ont montré un rôle important de la fibronectine dans la phase d'attachement du trypanostigote au fibroblaste (Ouaissi et coll. 1984) ou au macrophage (Wirth et Kierszenbaum 1984). En effet, la fibronectine purifiée ainsi que les anticorps anti-fibronectine modulent la capacité de pénétration des parasites dans les cellules de mammifères (Ouaissi et coll. 1985). L'identification du récepteur parasitaire pour la fibronectine a révélé un ensemble de protéines de poids moléculaire compris entre 80 et 85 kDa (Ouaissi et coll. 1986b). Des anticorps polyclonaux dirigés contre les glycoprotéines de 85 kDa inhibent la pénétration des trypanostigotes dans les fibroblastes. En utilisant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement vis-à-vis du domaine de la fibronectine contenant la séquence RGDS ainsi que des petits peptides synthétiques, Ouaissi et coll. (1986a) ont montré que le récepteur parasitaire reconnaissait la séquence RGDS de la fibronectine présente à la surface des fibroblastes. Ces travaux ont été confirmés par Vray et coll. (1986) et par Lima et coll. (1989) sur le macrophage. Par ailleurs, l'utilisation d'un peptide synthétique contenant la séquence RGDS conjugué à l'anatoxine tétanique induit une diminution significative de la parasitémie chez des souris immunisées puis infectées par *T. cruzi* (Ouaissi et coll. 1986a).

Ces observations tout à fait originales suggéraient que la fibronectine présente à la surface cellulaire pouvait jouer un rôle dans la reconnaissance et l'adhérence des parasites aux cellules. Elles pouvaient dès lors constituer une approche nouvelle vers une stratégie de vaccination. Cette stratégie impliquait néanmoins de connaître tous les récepteurs d'adhésion du parasite et donc de connaître toutes les cellules infectées par le trypanostigote lors de son entrée dans l'organisme.

Mon travail a donc consisté à rechercher les autres "portes d'entrée" possibles du parasite dans la cellule hôte.

Nous avons ainsi démontré le rôle du collagène cellulaire dans l'adhésion du trypanostigote aux fibroblastes; de façon plus intéressante encore nous avons mis en évidence que les lymphocytes T sont des cellules hôtes pour le parasite et que leur infection peut avoir une influence importante sur la pathologie de la phase aiguë. Ce modèle nous a permis également d'apprécier la complexité des phénomènes d'interactions parasite-cellule.

## **RESULTATS**

## RESULTATS

Etant donné le rôle de la fibronectine dans l'interaction entre le trypomastigote et la cellule hôte, nous nous sommes intéressés aux autres glycoprotéines de la matrice extracellulaire. En effet de nombreux travaux ont montré que les composants glucidiques peuvent avoir un rôle très important dans l'association entre le parasite et la cellule hôte. C'est ainsi que Henriquez et coll. (1981) ont mis en évidence que l'infection de cellules musculaires par le parasite est inhibée partiellement par des lectines et des monosaccharides, notamment la N-acétyl-D glucosamine.

Des expériences préliminaires nous avaient montré qu'un anticorps polyclonal anti-collagène de type III (donné par le Dr J. Aubry de Nantes) inhibait l'infection *in vitro* de fibroblastes par les trypomastigotes. Nous nous sommes donc intéressés au rôle possible de cette glycoprotéine de la matrice extracellulaire dans les mécanismes de reconnaissance entre le trypomastigote et le fibroblaste.

### **1. Rôle du collagène dans l'interaction entre le trypomastigote et le fibroblaste.**

La démonstration de l'existence d'un récepteur pour le collagène à la surface des trypomastigotes repose sur trois critères :

- Identification d'un site de fixation de la molécule de collagène radio-marquée à la surface des trypomastigotes.
- Purification par chromatographie d'affinité des protéines parasitaires ayant une affinité pour le collagène.
- Etude du rôle des anticorps dirigés contre ce récepteur dans l'infection cellulaire.

### 1. 1. Présence d'un récepteur pour le collagène à la surface des trypomastigotes.

Afin de vérifier l'existence de protéines parasitaires fixant le collagène, des trypomastigotes sont incubés en présence de doses croissantes de collagène marqué à l'iode  $^{125}$ . Deux préparations de collagènes de type I, suivant la nomenclature de Bornstein et Sage (1980), ont été utilisées : le type Sigma n° III, isolé de l'épithélium de veau et le type Sigma n° VIII, isolé du placenta humain. La fixation du collagène à la surface des trypomastigotes est, quelque soit le type de collagène étudié, un processus saturable, spécifique et réversible, la fixation non spécifique étant appréciée en présence de 100 fois la quantité de collagène froid et retranchée du résultat obtenu en utilisant la glycoprotéine radio-marquée (Fig. 3).

Ces résultats suggèrent la présence de sites de fixation spécifiques du collagène sur les trypomastigotes de *T. cruzi*.

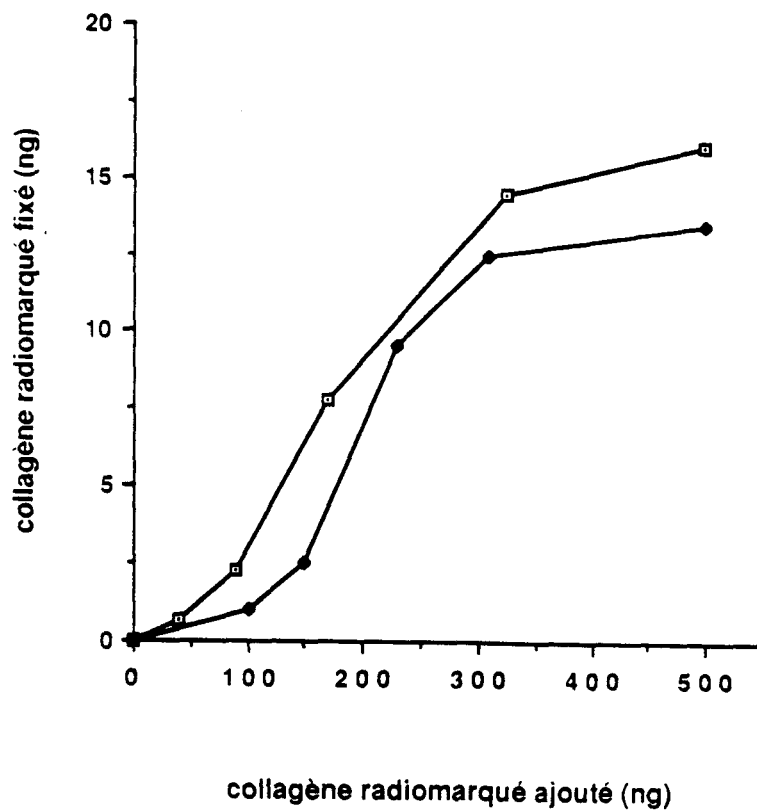
### 1. 2. Purification du récepteur pour le collagène.

Nous avons choisi la chromatographie d'affinité pour purifier le ou les récepteurs parasitaires; Une colonne d'Ultrogel gélatine a donc été utilisée, la gélatine étant la forme dénaturée du collagène.

Le passage d'un lysat total de trypomastigotes marqués préalablement en surface à l' $^{125}$ I, sur la colonne d'Ultrogel gélatine a permis de mettre en évidence deux groupes de protéines d'affinités différentes. En effet, le profil d'élution par l'urée 4M montre 2 pics distincts (Fig. 4a).

- Le premier pic, élué très rapidement, représente les protéines de faible affinité. Il est composé d'une protéine de 98 kDa qui est extrêmement mineure en quantité puisqu'elle n'est détectable que marquée à  $^{125}$ I (Fig. 4b I). Cette protéine représente d'ailleurs moins de 0,01% des protéines parasitaires marquées en surface.

- Le second pic correspond aux molécules d'affinité plus élevée pour la gélatine. L'analyse en SDS PAGE des protéines contenues dans la fraction 25-80 ml révèle, après coloration



**Figure 3 : Fixation du collagène de type I à la surface des trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

Les trypomastigotes ( $10^6$ ) sont incubés avec des quantités croissantes de collagène : type Sigma n° III (●-●-) ou n° VIII (□-□-). Après 1 heure à 37°C, les parasites sont lavés et la radioactivité fixée à leur surface est appréciée dans un compteur Gamma. La radioactivité spécifique fixée est calculée en soustrayant de la fixation totale, la fixation en présence de 100 fois l'excès de collagène froid.

**Figure 4 : Isolement et identification des protéines du trypomastigote fixant la gélatine.**

A) Profil d'élution par l'urée 4 M à 4°C, des protéines de trypomastigotes marqués en surface à l'iode 125 fixées sur une colonne d'Ultrogel-Gélatine.

B) Analyse en SDS P.A.G.E. des protéines éluées.

-I, autoradiographie des protéines contenues dans la fraction 5-10 ml en conditions réduites (A) et non réduites (B). Les poids moléculaires utilisés sont de marque Pharmacia.

-II, Coloration en nitrate d'argent du gel de polyacrylamide contenant la fraction 25-80ml. Conditions réduites (D) et non réduites (C). Les deux pistes C correspondent à deux préparations différentes. Les poids moléculaires de type Sigma sont utilisés (F).

-III, Coloration en nitrate d'argent de la fraction 60-63 ml analysée en gel de polyacrylamide en condition non réduite (E).

Fig. 4a

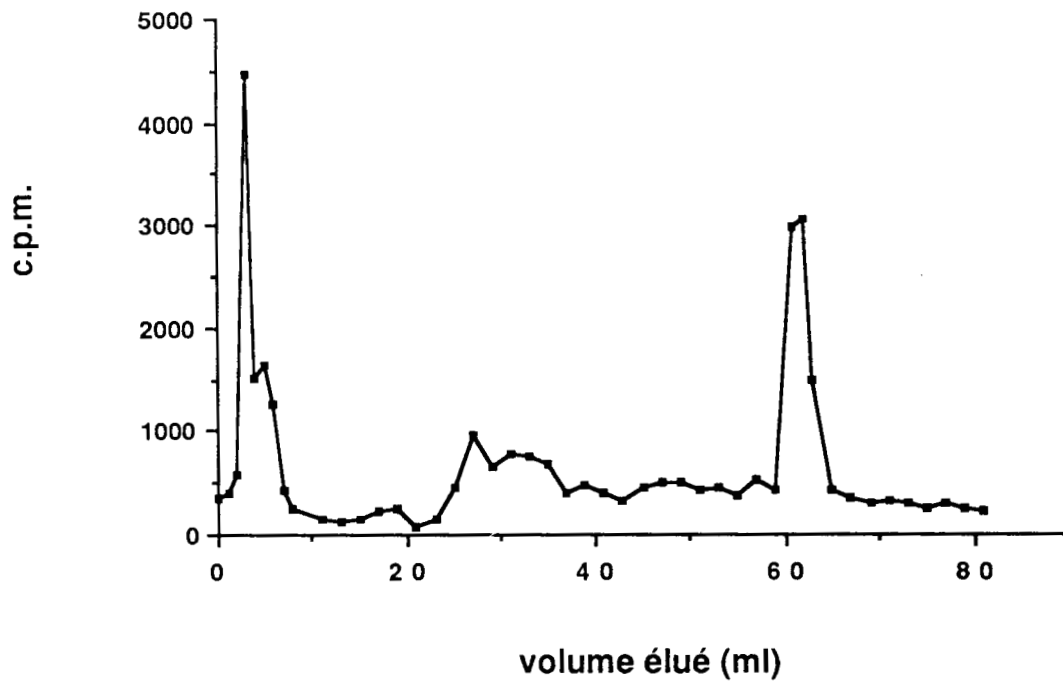
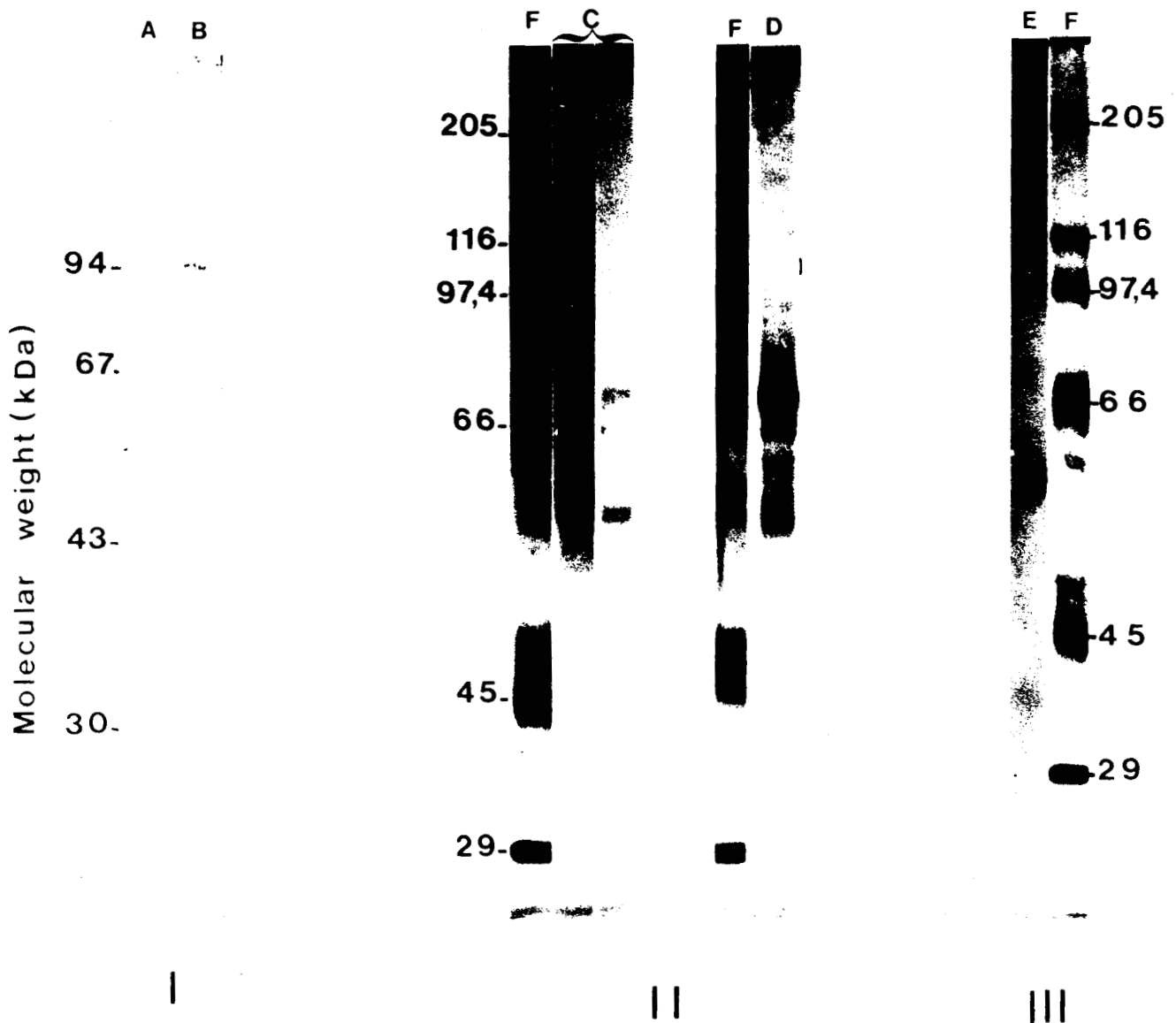


Fig. 4b





par le nitrate d'argent, un ensemble de protéines de poids moléculaires apparent de 85 à 40 kDa avec un composant majeur de 58 kDa en conditions non réductrices et un poids moléculaire apparent de 68 kDa en conditions réductrices (Fig. 4b II). Cette protéine est retrouvée fortement enrichie dans la fraction 60-65 ml (Fig. 4b III) et représente environ 0,2% des protéines totales du trypomastigote. La variation de poids moléculaire en SDS PAGE (58 versus 68 kDa) suggère que cette molécule possède une structure compacte stabilisée par des ponts disulfures intracaténaux.

Cette protéine de forte affinité pour la gélatine a été ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de lectine de germe de blé (WGA) à partir des protéines du trypomastigotes extraites en présence d'un détergent non ionique (Fig. 5). Cette purification sur lectine WGA permet de dire que la 58/68 kDa est une glycoprotéine puisqu'elle est éluée par la N-acétyl D glucosamine 0,2 M. Cette glycoprotéine est retrouvée à la fois dans les formes trypomastigotes de culture (Fig. 5 I, III) et les formes sanguicoles (Fig. 5 II). Nous l'avons purifiée également à partir de deux souches différentes (souche Y et souche Tehuantepec). Ces observations suggèrent que cette glycoprotéine est commune aux différentes souches de *T. cruzi*.

### *1. 3. Contrôle de l'affinité des glycoprotéines parasitaires pour le collagène.*

Les protéines parasitaires étant purifiées sur une colonne de gélatine, il était nécessaire de vérifier leur affinité pour le collagène. En test radio-immunologique, le collagène de type I marqué à l'iode 125 se fixe aux deux glycoprotéines de 58/68 kDa et de 98 Kda fixées sur plaque, alors qu'il ne se lie pas à l'albumine bovine (Fig. 6). En revanche, le contrôle positif qui consistait à utiliser de la fibronectine montre nettement que ce test est fonctionnel.

**Figure 5 : Purification sur lectine WGA de la glycoprotéine de 58/68 kDa.**

Un extrait, par un détergent NP40, de protéines de trypanostigotes est fixé sur la lectine pendant une nuit à 4°C. Après un lavage par 10 fois le volume de la colonne, les glycoprotéines sont éluées par la N acétyl D glucosamine, dialysées et analysées en SDS PAGE en conditions réductrices (C) ou non réductrices (B). La révélation est réalisée par la coloration au nitrate d'argent, des poids moléculaires de type Sigma servent de témoin de migration (A).

Différentes sources d'antigènes sont utilisées : I, trypanostigotes de culture de la souche Y, II, trypanostigotes sanguicoles de la souche Y, III, trypanostigotes de culture de la souche Tehuantepec.

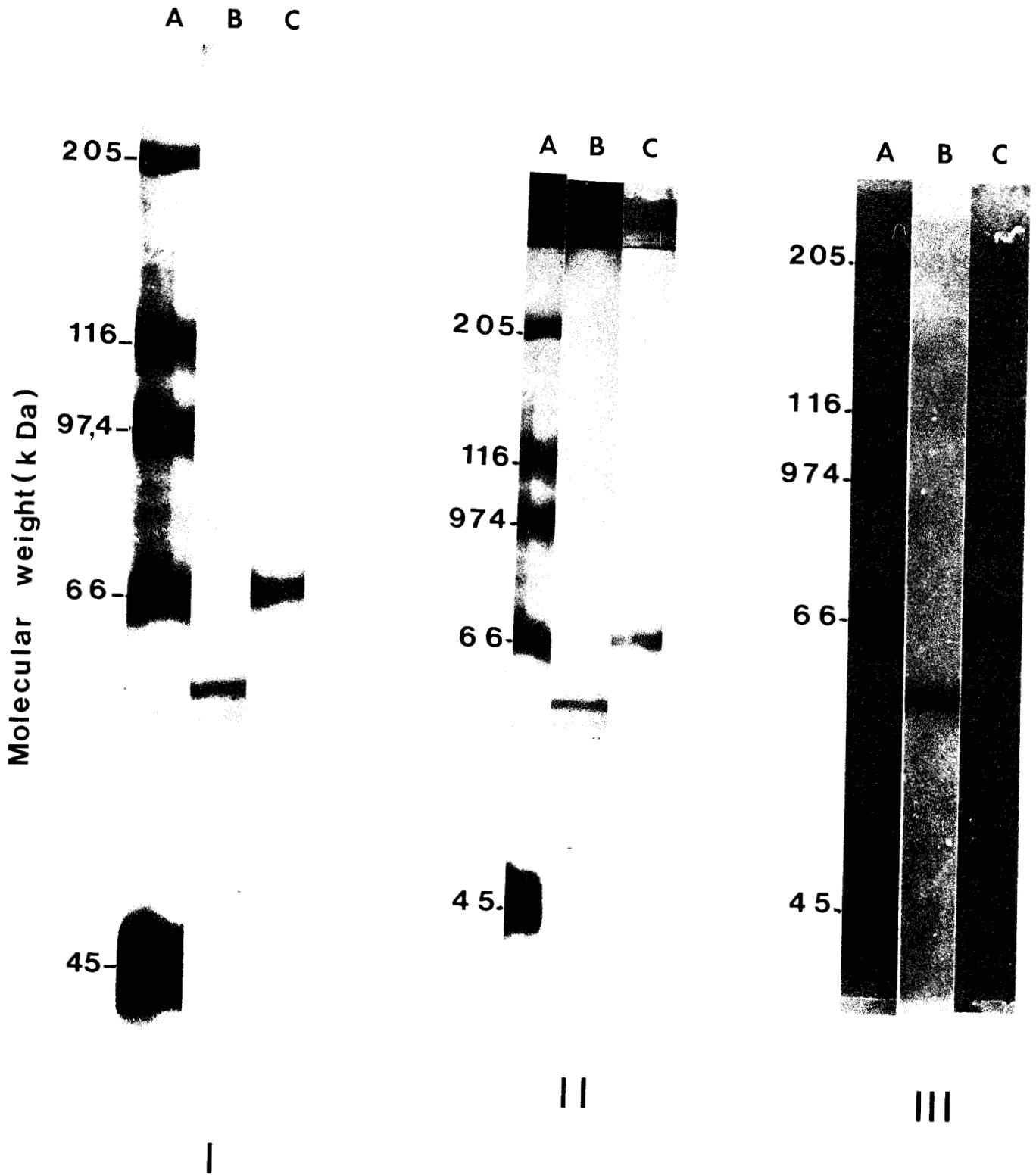
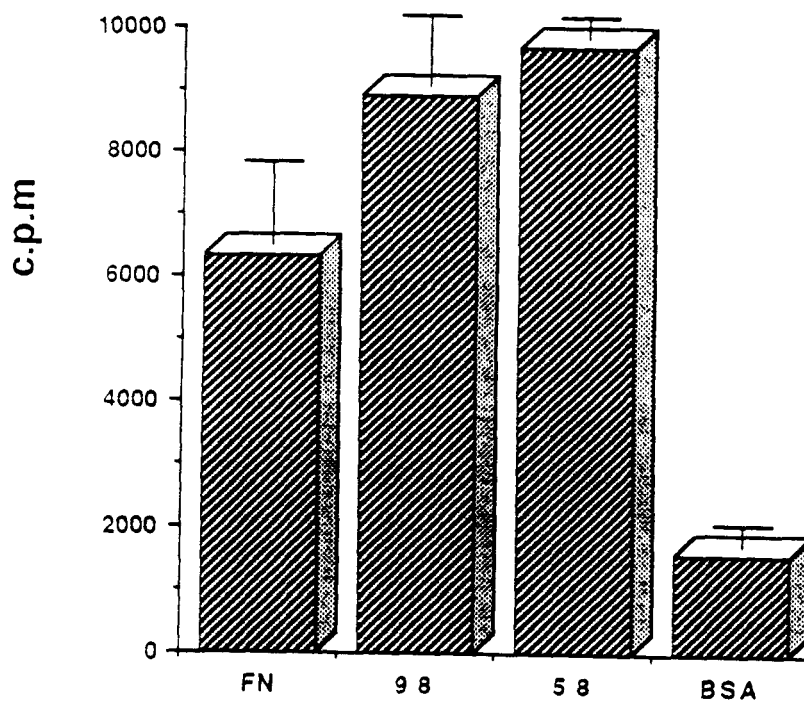


Fig 5



**Figure 6 : Fixation du collagène radio-marqué sur les protéines purifiées.**

Les protéines parasitaires purifiées de faibles affinités (98 kDa) ou de fortes affinités (58/68 kDa) ou la fibronectine (FN) et l'albumine bovine (BSA) sont fixées sur plaque (8 µg/puits). 140 000 cpm de collagène marqué à l' $^{125}\text{I}$  sont incubés 3 h à 37°C puis lavés. La radioactivité fixée est ensuite comptée dans un compteur gamma.

#### 1. 4. Caractérisation des récepteurs parasitaires pour le collagène.

La faible immunogénicité et le manque de matériel ne nous ont pas permis d'étudier de façon plus approfondie la protéine de faible affinité pour la gélatine identifiée précédemment. Par contre, des anticorps polyclonaux et un anticorps monoclonal ont été produits par immunisation de souris avec la gp 58/68 kDa.

L'analyse en immunoempreinte montre que les sérums anti-gp 58/68 reconnaissent majoritairement en conditions non réductrices, dans les antigènes du trypomastigote, deux composants : le premier de poids moléculaire 58 Kda et un deuxième de façon plus faible de 160 kDa (Fig. 7 I). Ces protéines sont absentes des formes épimastigotes comme le montre l'absence de réactivité des sérums anti-gp 58/68 vis-à-vis d'un extrait d'antigènes d'épimastigotes.

En immunoprécipitation des antigènes de surface de trypomastigotes marqués à l' $^{125}\text{I}$ , on remarque que les sérums polyclonaux anti-gp 58/68 reconnaissent en conditions non réductrices, à la fois le composant de forte affinité mais aussi le composant de 160 kDa qui a un poids moléculaire apparent de 85 kDa en conditions réductrices (Fig. 7 II, 7 III). Ces différentes protéines de *T. cruzi* ne sont pas reconnues par un Ac Mc anti-promastigote de *Leishmania donovani*.

De même l'immunoprécipitation des antigènes du trypomastigote marqué au  $^{35}\text{S}$ , par le sérum polyclonal anti-gp 58/68 nous a permis d'identifier les composants de 58 et de 85 kDa parmi d'autres composants de faibles poids moléculaires. Par contre, l'Ac Mc 155D3 anti-gp 58/68 n'immunoprécipite, dans les produits métaboliques marqués, que la molécule de 85 kDa (Fig. 7 IV). La présence de la molécule de 160 kDa dans ces produits métaboliques est variable alors que le composant de 85 kDa est toujours identifié en conditions réductrices.

Ces résultats montrent donc que les composants de 85 et de 58/68 kDa sont d'origine parasitaire.

**Figure 7 : Analyse de la spécificité des anticorps anti-gp 58/68.**

I, Analyse en immunoempreinte de la réactivité d'un sérum polyclonal anti gp 58/68 vis-à-vis d'un extrait de trypomastigotes (B) ou d'épimastigotes (D). Les contrôles sont réalisés avec un sérum de souris saine sur un extrait de trypomastigotes (A) ou d'épimastigotes (C).

II, Immunoprécipitation des antigènes de trypomastigotes marqués en surface à l'iode 125 par : un Ac Mc anti-*leishmania donovani* (A), un Ac Mc 155D3 anti-gp 58/68 (C), un sérum polyclonal anti-gp 58/68 (B) en conditions non réductrices (II) et réductrices (III). (D) profil total des antigènes parasitaires marqués.

III, Immunoprécipitation des antigènes de trypomastigotes marqués par la méthionine <sup>35</sup>S. Les trypomastigotes sont marqués pendant 3 h à 37°C (A) puis une chasse métabolique est réalisée pendant 21 h (B) par de la méthionine froide. Ces antigènes sont immunoprécipités par l'anticorps monoclonal 155D3 (C), un sérum polyclonal anti-gp 58/68 (D), un sérum de souris saine (E).

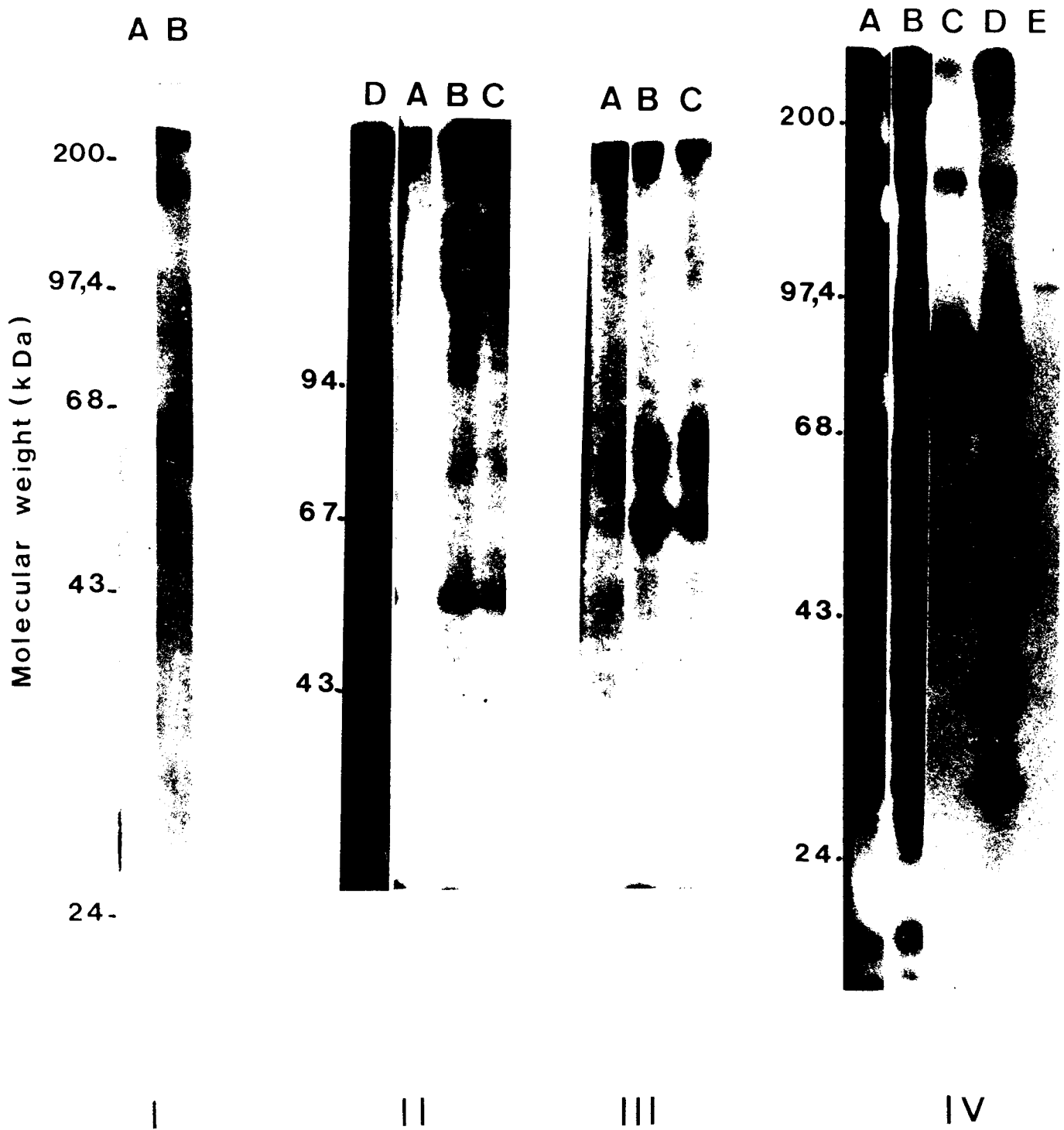


Fig 7

1. 5. *Inhibition, par les anticorps anti-récepteurs parasitaires, de l'infection in vitro des fibroblastes.*

Le rôle des glycoprotéines cellulaires et des récepteurs parasitaires dans l'interaction entre *T. cruzi* et les fibroblastes a été apprécié par un test d'infection des fibroblastes en plaque. Dans ce test *in vitro*, on constate que des anticorps monoclonaux dirigés contre le collagène de type III (Fig. 8A), ou des immunoglobulines purifiées anti-collagène de type I ou de type III (Fig. 8C) inhibent l'infection des fibroblastes par les trypomastigotes; ceci en comparaison de l'action d'un surnageant du myélome SP<sub>2</sub>O ou d'immunoglobulines purifiées anti-IgE humaine. De même, les différents sérums polyclonaux (Fig. 8B) et l'Ac Mc 155D3, dirigés contre la gp 85 kDa et la gp 58/68 kDa (Fig. 8A), inhibent de façon significative l'infection des fibroblastes par les trypomastigotes. Les valeurs d'inhibition varient entre 40 et 80% pour des dilutions d'anticorps entre 1/30<sup>e</sup> et 1/240<sup>e</sup>. En revanche, un surnageant de myélome SP<sub>2</sub>O, un sérum de souris saine ou des IgG anti-IgE humaines n'ont aucun effet notable sur l'infection.

Ces différents travaux suggèrent que la glycoprotéine parasitaire de 58/68 kDa d'une part et que le collagène d'autre part participent à l'interaction entre le trypomastigote et le fibroblaste.

1. 6. *Conclusions.*

L'utilisation de collagènes de type I marqués à l'iode nous a permis de montrer que la fixation de cette glycoprotéine à la surface des trypomastigotes est spécifique, saturable et réversible, ce qui suggère la présence de sites de fixation du collagène sur les trypomastigotes de *T. cruzi*.

Par chromatographie d'affinité, nous avons purifié une glycoprotéine majeure de 58/68 kDa qui fixe de façon importante le collagène. Par ailleurs, nous avons vérifié en



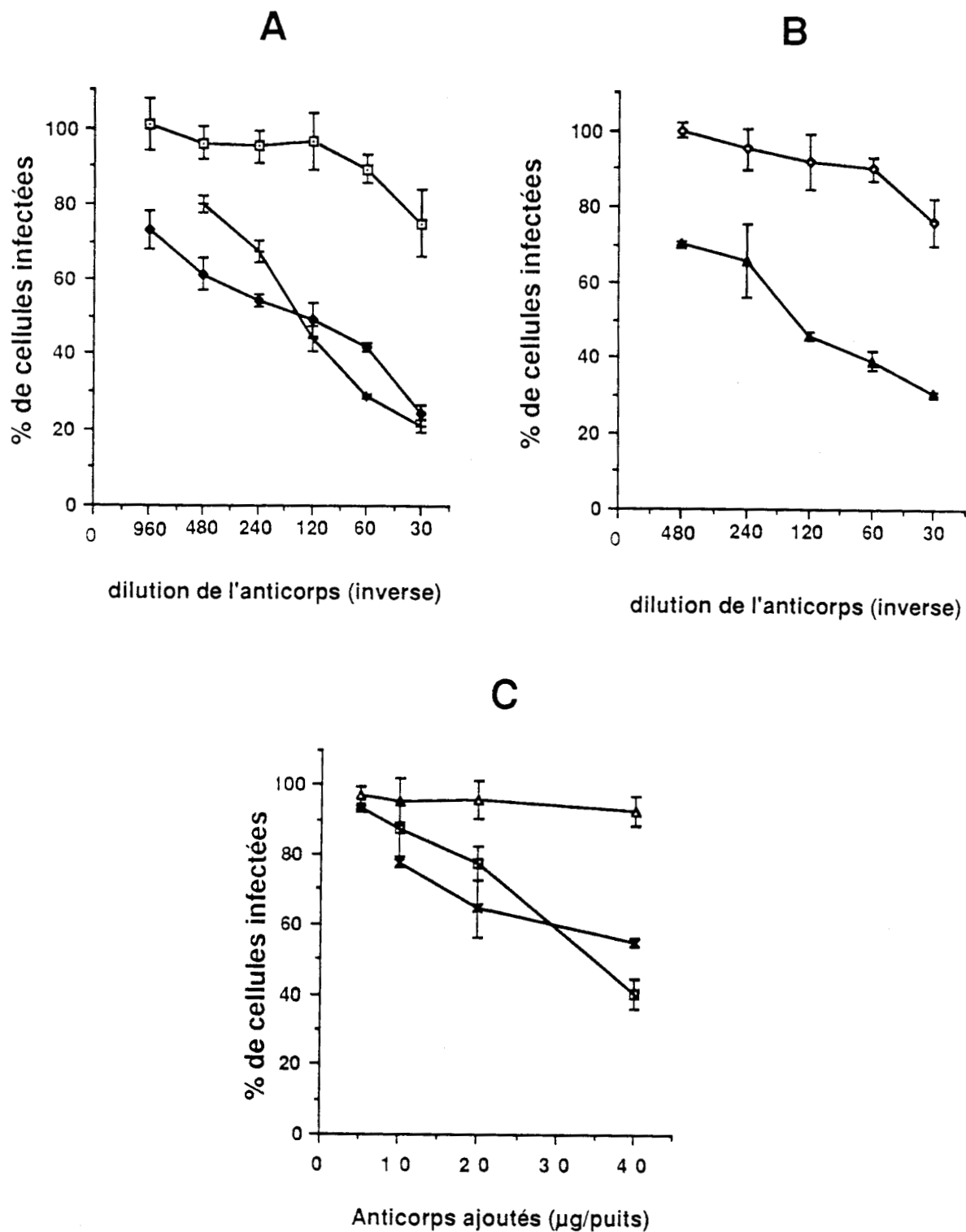


Figure 8 : inhibition de l'infection in vitro des fibroblastes par les trypanomastigotes à l'aide d'anticorps spécifiques.

A : +—+ Ac Mc anti collagène de type III; ●—● Ac Mc 155D3 anti-récepteur parasitaire pour le collagène; □—□ surnageant des cellules myélomateuses SP<sub>2</sub>O.

B : ▲—▲ sérum de souris anti-58/68 kDa; ◆—◆ sérum de souris saine.

C : ×—× immunoglobulines purifiées anti-collagène de type I; ■—■ immunoglobulines purifiées anti-collagène de type III; ▲—▲ immunoglobulines purifiées anti-IgE humaine.

utilisant un sérum de lapin anti-fibronectine, que cette protéine n'est pas un fragment de clivage de la fibronectine associé à la surface du parasite et isolé par chromatographie sur colonne de gélatine. De plus, les trypomastigotes utilisés pour purifier cette glycoprotéine sont lavés plusieurs fois ce qui élimine toute fibronectine contaminante comme nous l'a démontré l'immunofluorescence indirecte sur les trypomastigotes avec le sérum polyclonal de lapin anti-fibronectine.

Des anticorps polyclonaux et un anticorps monoclonal (155D3) ont été produits et sont capables d'inhiber l'infection *in vitro* des fibroblastes par les trypomastigotes. De plus en cytofluorimétrie en flux, l'Ac Mc 155D3 montre que la quantité de récepteurs à la surface du trypomastigote augmente avec la maturation extracellulaire de celui-ci. Ceci est à rapprocher des travaux de Piras et coll. (1983) qui ont montré que les trypomastigotes sortant de la cellule ont besoin d'une maturation extracellulaire pour devenir infectants.

Ces différents travaux suggèrent que l'interaction entre le trypomastigote et le fibroblaste fait intervenir une glycoprotéine parasitaire de 58/68 kDa et le collagène cellulaire.

## **2. Utilisation à des fins vaccinales du récepteur parasitaire pour le collagène.**

Après avoir montré la capacité des anticorps anti-récepteurs parasitaires à inhiber *in vitro* la pénétration du parasite, il était intéressant de vérifier la validité de ces résultats *in vivo*.

### **2. 1. Potentialité vaccinale des récepteurs parasitaires dans le modèle souris.**

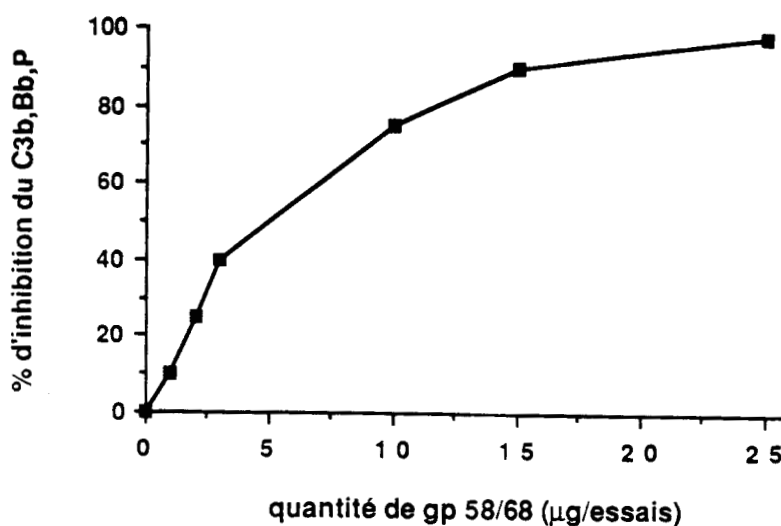
Les différentes tentatives d'immunisation de souris par la gp 58/68 en adjuvant complet ou incomplet de Freund, suivie d'une infection par voie intra-péritonéale de  $10^5$  trypomastigotes sanguicoles ne nous ont pas permis d'obtenir des taux de protection très importants. De même, le transfert passif de l'Ac Mc 155D3 avant infection, ne confère qu'une protection très faible. Seule l'utilisation d'un peptide synthétique contenant la

séquence RGDS conjugué à l'anatoxine tétanique, induit une diminution significative de la parasitémie et de la mortalité de l'ordre de 40%, chez des souris immunisées puis infectées par *T. cruzi* (Ouaissi et coll. 1986a).

Nous avons tenté de comprendre ces résultats assez négatifs, en nous appuyant sur les études de la pathologie de la maladie de Chagas qui ont mis en évidence que les antigènes parasitaires peuvent inhiber ou dévier la réponse immune de l'hôte. De plus de nombreux travaux ont montré que les trypomastigotes sont capables de résister à la lyse médiée par le complément et les anticorps spécifiques du parasite (Nogueira et coll. 1975). Sur cette base, en liaison avec le Dr E. Fischer et le Dr M.D. Kazatchkine de l'hôpital Broussais à Paris, nous avons recherché l'action de la gp 58/68 sur le système du complément.

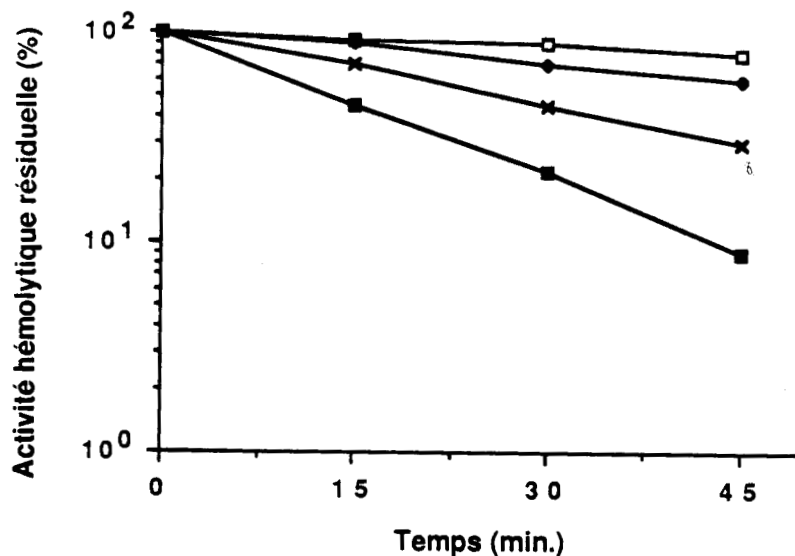
## *2. 2. Inhibition de l'activité de la C<sub>3</sub> convertase préformée par la gp 58/68.*

L'effet de la gp 58/68 sur l'activité de la C<sub>3</sub> convertase de la voie alterne du complément a été étudié. Des érythrocytes ( $1 \times 10^7$ ) ayant à leur surface le complexe anticorps et C<sub>4b,3b</sub> du complément sont incubés avec des doses croissantes de gp 58/68 dans un milieu contenant le facteur B du complément, un excès de properdine qui stabilise la C<sub>3</sub> convertase et un excès de facteur D du complément qui permet le clivage du facteur B en facteur Ba et Bb. Après une incubation de 30 min. à 30°C du sérum de rat sain en présence d'EDTA est ajouté pour permettre la lyse des érythrocytes via la voie alterne du complément. L'addition de la gp 58/68 inhibe la formation du complexe C<sub>3b,Bb,P</sub> d'une façon dose dépendante (Fig. 9). On obtient ainsi 50% d'inhibition de la lyse des érythrocytes avec 4 µg de gp 58/68. Différentes expériences ont montré que la gp 58/68 ne peut dissocier le complexe C<sub>3b,Bb</sub> déjà formé (Fisher et coll. 1988).



**Figure 9 : Inhibition de l'activité de la  $C_3$  convertase préformée par la gp 58/68.**

Des érythrocytes ( $1 \times 10^7$ ), ayant à leurs surfaces le complexe anticorps- $C_{4b,3b}$  du complément, sont incubés avec des doses croissantes de gp 58/68 dans un milieu contenant le facteur B et D du complément ainsi qu'un excès de properdine. La formation du complexe  $C_{3b,Bb,P}$  est révélée par l'ajout de sérum de rat sain et mesurée par la lyse des érythrocytes.



**Figure 10 : Inhibition de la formation d'une  $C_3$  convertase primitive.**

Les facteurs  $C_3$ , B et D du complément sont incubés à  $37^\circ\text{C}$  en présence de gp 58/68 (  $\blacklozenge$  7,5 g,  $\times$  15 g ) ou dans le tampon seul (  $\blacksquare$  ). La formation du complexe  $C_{3b,Bb}$  est déterminée en mesurant l'activité hémolytique du facteur B résiduel. Un essai avec le facteur B et D seul est réalisé comme témoin (  $\square$  ).

### 2. 3. *Inhibition de la formation d'une C<sub>3</sub> convertase primitive.*

Dans ce test, les facteurs C<sub>3</sub>, B, D, du complément sont incubés à 37°C en présence ou non de gp 58/68 à différents temps, puis l'activité hémolytique du facteur B résiduel est testée. Dans ces conditions la gp 58/68 inhibe la consommation du facteur B qui a pour conséquence d'inhiber l'activité hémolytique résiduelle (Fig. 10).

### 2. 4. *Conclusions.*

Il apparaît que la gp 58/68 est capable d'inhiber l'activité et la formation de la C<sub>3</sub> convertase de la voie alterne du complément d'une façon dose dépendante. L'action de cette glycoprotéine diffère des autres protéines de régulation humaines de type DAF ou CR1, par le fait qu'elle n'a aucune action sur la voie classique du complément.

Ce récepteur parasitaire jouerait donc un rôle dans les mécanismes d'échappement du parasite en inhibant la voie alterne du complément et en permettant ainsi au parasite d'éviter la lyse dépendante du complément.

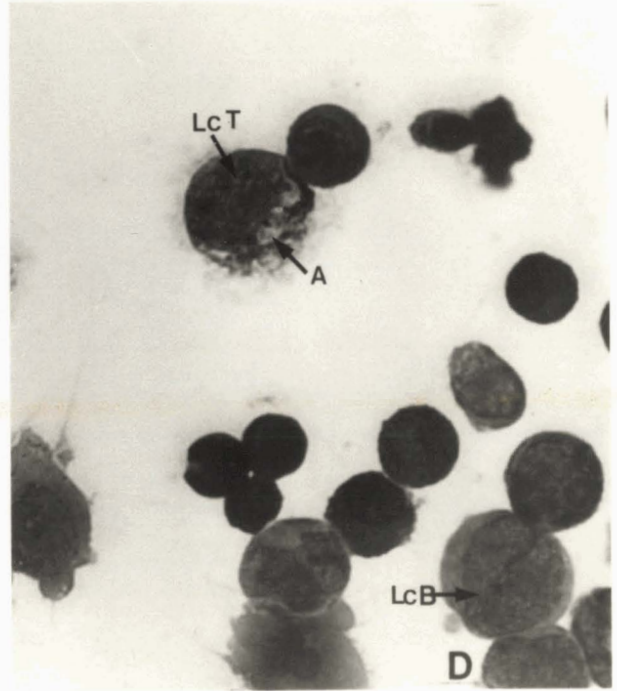
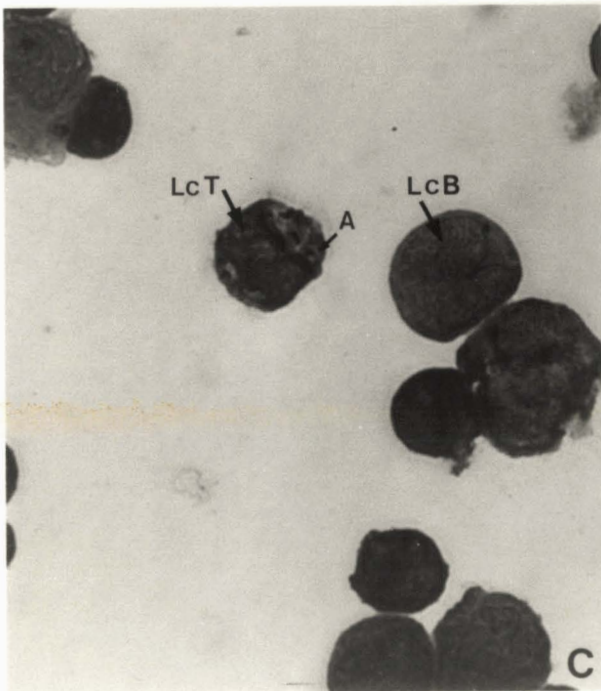
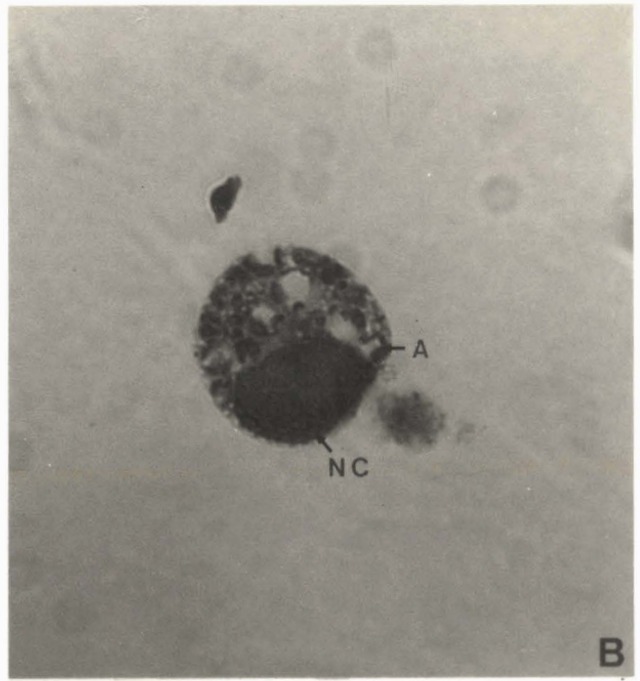
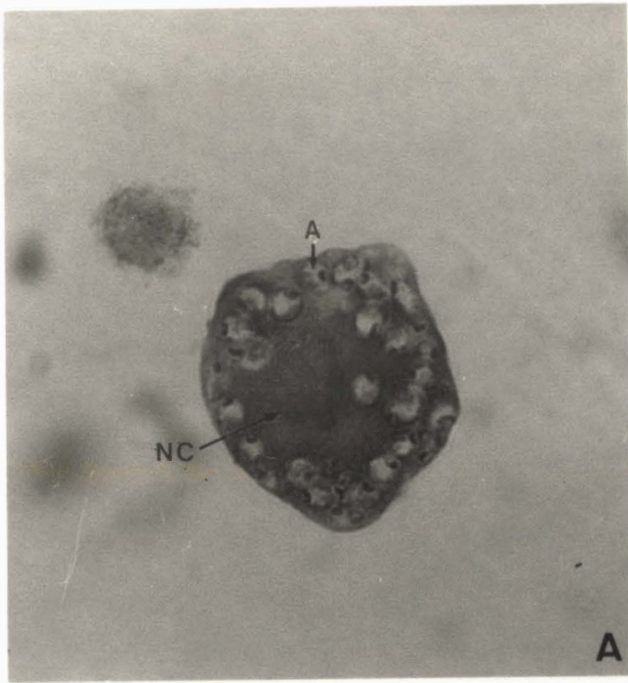
### 3. Infection des lymphocytes T par *T. cruzi*.

Afin d'étudier plus en détail les phénomènes d'adhésion liés à la fibronectine et au collagène, et notamment la participation de ces glycoprotéines dans les mécanismes de pénétration du parasite dans la cellule, nous avons choisi comme cible cellulaire le lymphocyte. En effet, cette cellule, considérée jusqu'à maintenant dans la littérature comme non infectable par le parasite, ne synthétise pas de fibronectine et de collagène à la différence du fibroblaste, mais est susceptible de les fixer par ses récepteurs. Lors de nos premières expériences, nous avons mis en évidence que le lymphocyte T pouvait être infecté *in vitro* par *T. cruzi*. Cette observation tout à fait originale nous a permis d'analyser les différents mécanismes qui pourraient avoir des implications importantes dans la pathologie de la phase aiguë.

#### 3. 1. Infection *in vitro* des lymphocytes T par *T. cruzi*.

De nombreuses expériences durent être entreprises afin de démontrer clairement la réalité de cette infection. Pour ce faire, nous avons utilisé différents types de lymphocytes et mis au point différentes techniques pour démontrer et mesurer cette infection tant *in vitro* que *in vivo*.

La principale difficulté que nous avons eu à surmonter a été le faible taux d'infection des lymphocytes, inférieur à 5%, ce qui est généralement dans la marge d'erreur de nombreux appareils de mesure ou des méthodes de purification des cellules sanguines.



**Figure 11 : Observation en microscopie optique de l'infection *in vitro* des lymphocytes T.**

**A :** Lymphome T Jurkat, **B :** Lymphocyte T humain.

Les cellules sont infectées *in vitro* par *T. cruzi*, cytocentrifugées, colorées par le RAL 555 puis observées au microscope optique (grossissement X 1200).

**C-D :** Observation de lymphocytes T murins infectés *in vitro* par *T. cruzi* après cytocentrifugation, marquage peroxydase indirecte avec l'Ac Mc de rat anti-Thy 1.2 et contre coloration par le RAL 555 (grossissement X 1000).

**A :** amastigote; **NC :** noyau cellulaire; **LcT :** lymphocyte T marqué à la peroxydase, **Lc B :** lymphocyte non marqué par l'Ac Mc anti-Thy 1.2.

### 3. 1. 1. Observation en microscopie optique.

Les premières études ont été réalisées sur des lymphocytes T purifiés sur gradient de Ficoll-Paque suivie d'un épuisement des lymphocytes B et des monocytes par passage sur une colonne de laine de nylon et de billes de verre recouvertes d'immunoglobulines et d'anti-IgG. La population enrichie est contrôlée en cytofluorimétrie en flux. Elle est en général à 90-95% CD3 positive et porte à 9-11% des immunoglobulines, ce qui correspond à 90% de lymphocytes T et 10% de cellules B.

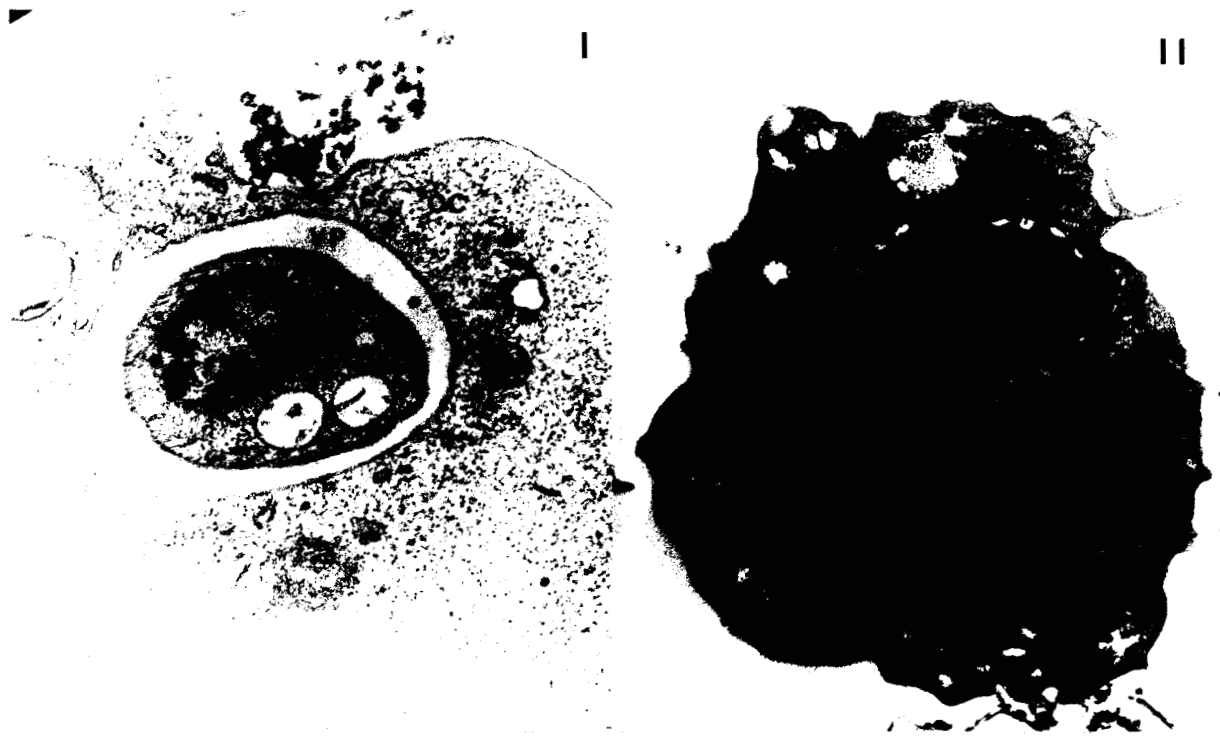
L'infection de ces lymphocytes T a été observée après un simple contact des cellules avec les trypomastigotes de culture en milieu R10, 16 h à 37°C. Les cellules infectées sont visualisées après cytocentrifugation et coloration par le RAL 555, au microscope optique (grossissement x 1000) (Fig. 11B).

Les taux de purification de 95% des cellules et le pourcentage de cellules infectées (de l'ordre de 2 à 3%), n'apportaient pas une preuve suffisamment convaincante. Nous avons donc utilisé des lymphomes qui constituent une population cellulaire homogène. Nous avons observé que les lymphomes T humains (Jurkat, MOLT4) et murins (EL4) sont également infectés de l'ordre de 3 à 5% (Fig. 11A).

Néanmoins l'utilisation de ces lymphomes restait un modèle très artificiel par le caractère prolifératif en l'absence d'antigène de ces cellules. Dans des études plus récentes, nous avons pu disposer d'un clone T humain, spécifique d'un antigène nucléaire soluble, produit par le Dr Pham Bach Nga dans notre laboratoire. Ce clone présente deux avantages : de constituer une population homogène et de conserver des caractères très voisins des lymphocytes T humains. Il s'est avéré que ce clone T était infecté par les trypomastigotes (Fig. 13) et qu'il était même plus susceptible à l'infection puisque 10 à 15% des cellules sont infectées par *T. cruzi* après 16 h de culture.

La nature lymphocytaire T ou B de ces différentes cellules a été démontrée également par la technique utilisant l'immunopéroxydase indirecte avec des anticorps monoclonaux (Fig. 11C, 11D).





**Figure 12 : Observation en microscopie électronique de lymphocytes T infectés *in vitro* par *Trypanosoma cruzi*.**

I : lymphome T Jurkat; II : lymphocyte T humain normal.

A : amastigote; N : noyau du parasite; VP : vacuole parasitophore;  
CC : cytoplasme cellulaire; NC : noyau cellulaire.

Les lymphocytes T de souris sont marqués par un Ac Mc de rat anti-Thy 1.2 et révélé par des F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-Ig de rat, marqués à la peroxydase. Les lymphocytes B sont révélés par des F(ab')<sub>2</sub> de chèvre anti-Ig de souris, marqués à la peroxydase.

Par contre, bien que le parasite soit capable d'adhérer à la surface des cellules B, nous n'avons jamais observé l'infection de lymphome B murin (SP<sub>2</sub>O) ou humain (LICR et U266). De même nous n'avons jamais observé dans des préparations de lymphocytes B + T infectés *in vitro*, de cellules infectées et marquées en immunoperoxydase par un anticorps anti-immunoglobulines. Ceci suggère fortement que le lymphocyte B n'est pas infecté par *T. cruzi*.

### 3. 1. 2. Observation en microscopie électronique.

L'infection des différents lymphomes ou des lymphocytes T humains purifiés a été visualisée en microscopie électronique (Fig. 12) de même que l'infection du clone T humain (Fig. 13). Ces observations montrent que le parasite pénètre dans ces cellules le plus souvent dans une vacuole parasitophore (Fig. 12 I) qui dans certains cas peut être détruite laissant l'amastigote dans le cytoplasme (Fig. 12 II). Néanmoins dans la majorité des cas, l'amastigote semble se multiplier dans une vacuole comme le démontre la Fig. 13 II. Ces observations sont extrêmement originales puisque les travaux actuels montrent que, dans les autres cellules, l'amastigote détruit la vacuole parasitophore pour se multiplier directement dans le cytoplasme (Milder et Kloetzel 1980). D'autres études en microscopie électronique sont en cours pour comprendre les mécanismes de vie intracellulaire du parasite.

### 3. 1. 3. Test quantitatif de l'infection parasitaire par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée.

La méthode de quantification de l'infection en microscopie optique était sujette à caution parce que subjective et fastidieuse. Nous nous sommes donc attachés à mettre au point un test quantitatif de l'infection des lymphocytes.



Figure 13 : Observation en microscopie électronique d'un clone T humain infecté *in vitro* par *Trypanosoma cruzi*.

A : amastigote; N : noyau du parasite; K : kinétoplaste; F : flagelle rudimentaire; VP : vacuole parasitophore; CC : cytoplasme cellulaire; NC : noyau cellulaire.

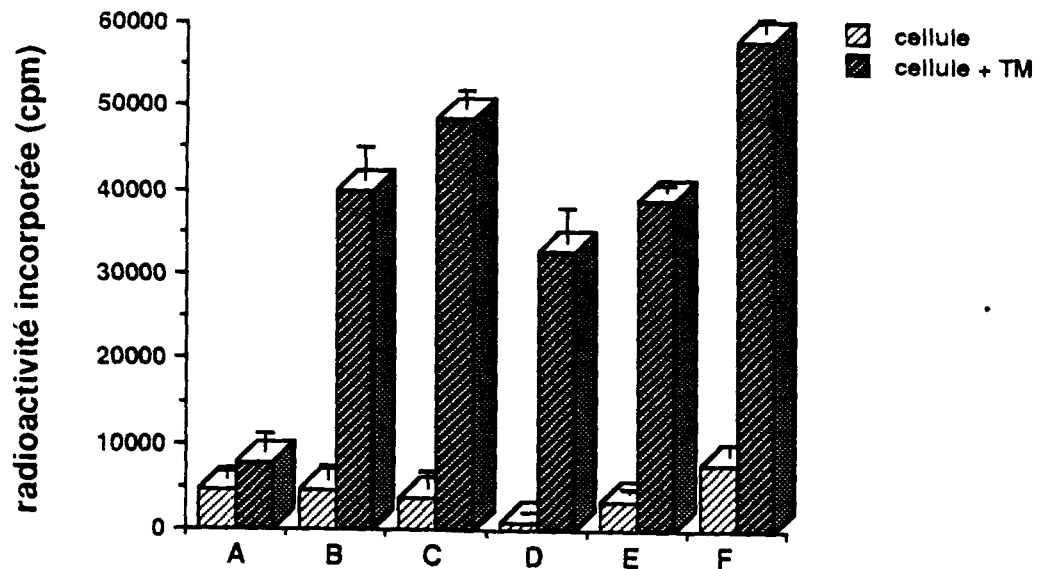
Ce test consiste en l'incorporation d'hypoxanthine tritiée par les amastigotes intracellulaires lors de leurs multiplications dans des cellules irradiées (Fig. 14). Dans ce test les cellules sont infectées classiquement et l'hypoxanthine tritiée est ajoutée au milieu 40 h après l'infection. L'incorporation se poursuit pendant 72 h puis l'ADN parasite et cellulaire est recueilli sur filtre de verre. Dans ce test les cellules sont préalablement irradiées afin de diminuer l'incorporation par les cellules prolifératives. Néanmoins cette irradiation des cellules ne modifie pas la pénétration ni la multiplication du parasite comme on le constate avec les lymphocytes T humains purifiés, irradiés ou non (Fig. 14). Les parasites extracellulaires sont éliminés par des centrifugations différentielles. L'incorporation du marqueur tritié, par les sphaeromastigotes contaminants ne dépasse pas 5 000 cpm. Dans ces conditions expérimentales, on observe une différence d'un facteur 10 entre l'incorporation des cellules seules et des cellules infectées. On peut noter également qu'il n'y a pas d'incorporation du traceur radioactif par les lymphomes B mis en présence de trypanomastigotes. Ceci confirme que les lymphomes B ne sont pas infectés par *T. cruzi*, et montre que le contact des parasites avec les lymphocytes n'induit pas d'incorporation artéfactuelle d'hypoxanthine.

Ce test démontre que les trypanomastigotes pénètrent et se multiplient dans les lymphocytes T. Néanmoins il restait à confirmer le fait que cette cellule soit une cellule hôte à part entière.

### 3. 2. *Démonstration du lymphocyte T comme cellule hôte de T. cruzi.*

#### 3. 2. 1. *Développement intracellulaire du parasite*

Dans cette expérience les parasites sont laissés 16 h en contact avec les cellules T Jurkat, après élimination des parasites extracellulaires la maturation du parasite est poursuivie entre 24 et 144 h. La multiplication intracellulaire du parasite est stoppée à différents temps par cyto-centrifugation et coloration au RAL 555.



**Figure 14 : Quantification de l'infection lymphocytaire par les trypanostigotes.**

A: plasmocytome U266 irradié; B: lymphome T murin EL4 irradié; C: lymphome T humain MOLT4 irradié; D: lymphocytes T humains purifiés (95% CD3+) et irradiés; E: lymphocytes T humains non irradiés; F: clone T humain irradié.

$3 \times 10^6$  cellules sont incubées en présence de  $30 \times 10^6$  trypanostigotes (cellules + TM) ou sans parasites (cellules seules), 16 h à 37°C puis lavées pour éliminer les parasites extracellulaires. 185 kBq d'hypoxanthine tritiée ont été ajoutés 40 h après l'infection et laissés pendant 72 h. Les résultats sont exprimés en radioactivité incorporée, ils sont la moyenne d'expériences faites en triples.

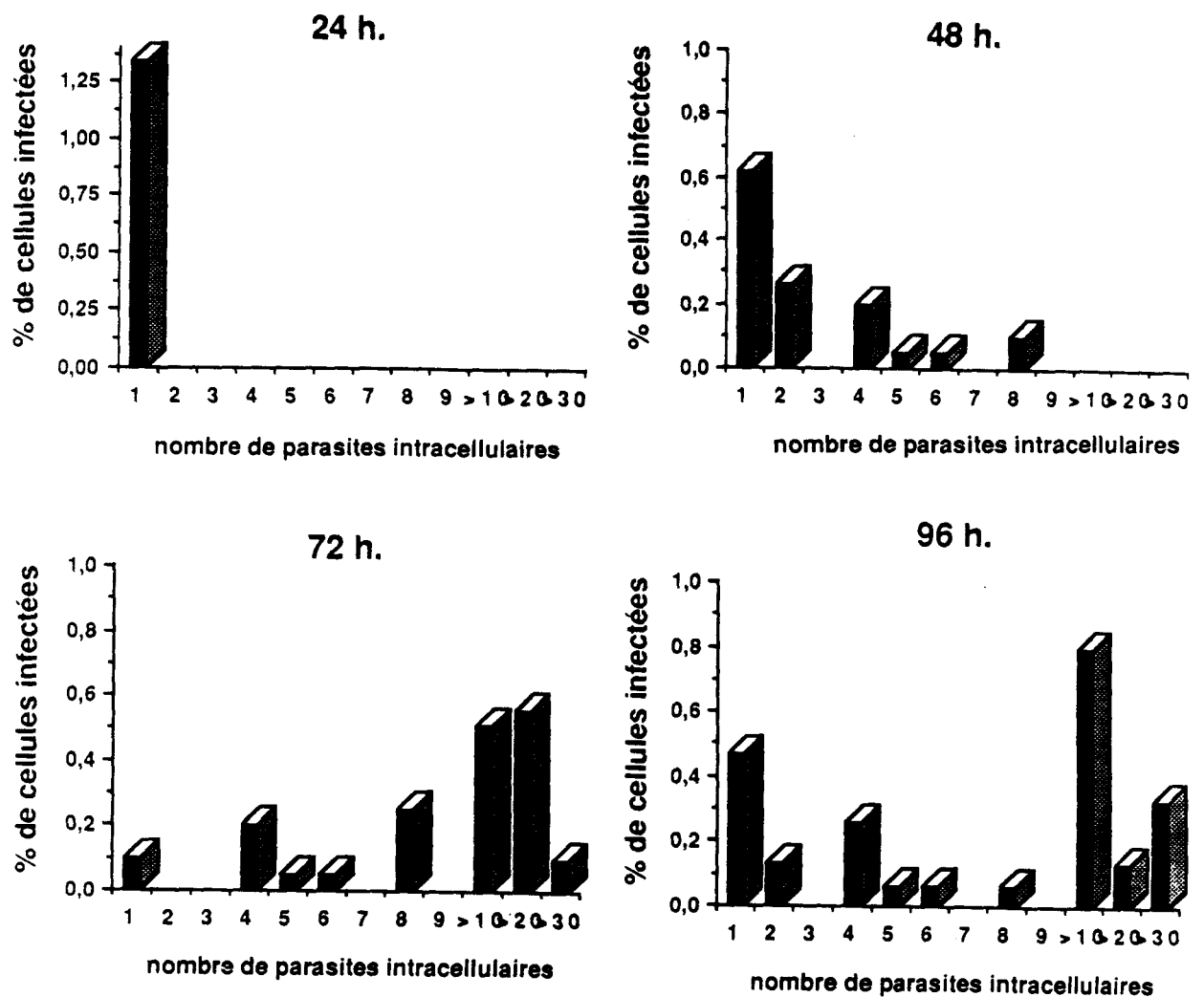
Le nombre de cellules infectées et le nombre de parasites par cellule sont comptés sur au moins 500 cellules par temps de contact.

Cette expérience montre clairement la multiplication intracellulaire du parasite (Fig. 15). En effet, 24 h après l'infection, 1,3% des cellules sont infectées avec un seul parasite par cellule. Ce pourcentage de cellules infectées reste le même après 48 h ce qui montre qu'il n'y a pas eu de nouvelles cellules infectées, par contre le nombre de parasites par cellule augmente suivant approximativement une suite géométrique d'ordre 2, ce qui suggère une division binaire des amastigotes. La charge parasitaire des lymphocytes augmente fortement à 72 h et à 96 h pour atteindre plus de 30 amastigotes par cellules. Il est intéressant de noter que 96 h après l'infection, le nombre de cellules ayant un seul parasite réaugmente, ce qui suggère de nouvelles infections cellulaires par les parasites libres.

### 3. 2. 2. Libération de trypomastigotes par les lymphocytes T infectés.

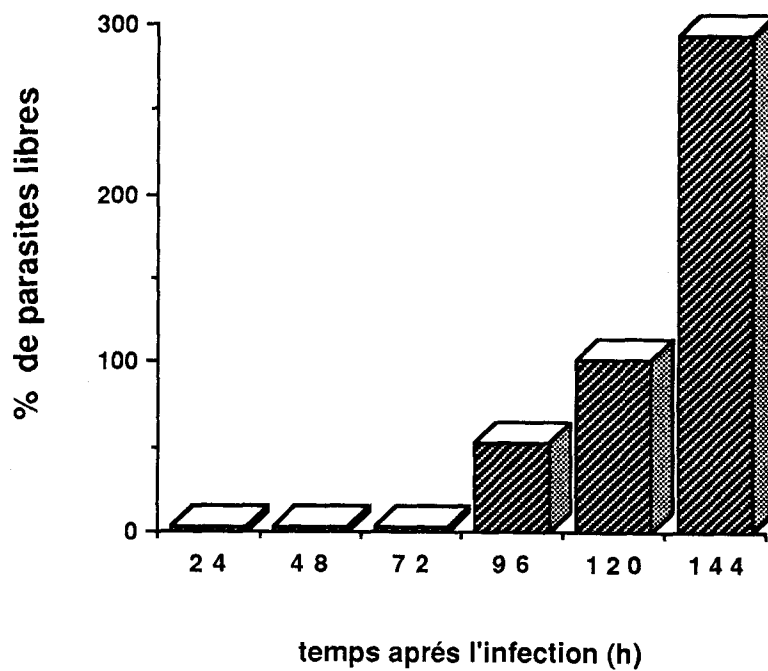
Lors de la même expérience, nous avons compté le nombre de parasites (sphaeromastigotes ou trypomastigotes) libres, rapporté au nombre de cellules (Fig. 16). Sachant que nous avons incubé lors de l'infection 10 parasites par cellules, on peut calculer facilement que 144 h après l'infection, on obtient plus de 50 fois le nombre de parasites initialement utilisés. Ces résultats confirment la multiplication intracellulaire du parasite et montrent que celui-ci a un cycle de développement intracellulaire de 96 à 144 h, ce qui est le temps classique de développement du parasite dans une cellule de mammifère. De plus, si l'on incube les parasites libérés par les lymphocytes T avec des fibroblastes, on observe que ces parasites sont infectieux *in vitro*.

Ces différents résultats montrent que le trypomastigote pénètre dans la cellule, s'y transforme en amastigote qui se multiplie par division binaire puis se différencie en trypomastigote libéré par destruction de la cellule. Enfin les parasites libérés sont infectieux pour d'autres types cellulaires. Le lymphocyte T peut donc être considéré comme une cellule hôte pour *T. cruzi in vitro*.



**Figure 15 : Développement intracellulaire de *Trypanosoma cruzi* dans un lymphome.**

Le lymphome T Jurkat est infecté *in vitro* par les trypomastigotes pendant 16 h à 37°C, les parasites extracellulaires sont éliminés par lavages et la maturation est poursuivie pendant 24, 48, 72, 96 h. Elle est arrêtée par cyto centrifugation des cellules qui sont ensuite colorées au RAL 555. Le pourcentage de cellules infectées ainsi que le nombre de parasites par cellule est évalué sur au moins 500 cellules.



**Figure 16 : Libération des trypomastigotes des lymphomes T infectés.**

Le lymphome T Jurkat est infecté *in vitro* pendant 16 h à 37°C par les trypomastigotes dans un rapport parasite/cellule de 10/1. Les parasites non adhérents sont éliminés par lavages puis des cyto-centrifugations sont réalisées à différents temps de maturation intracellulaire des amastigotes. Le pourcentage de parasites extracellulaires est apprécié par rapport aux cellules.



A ce stade de notre démonstration, Il nous semblait essentiel de montrer la réalité de ces observations *in vivo*.

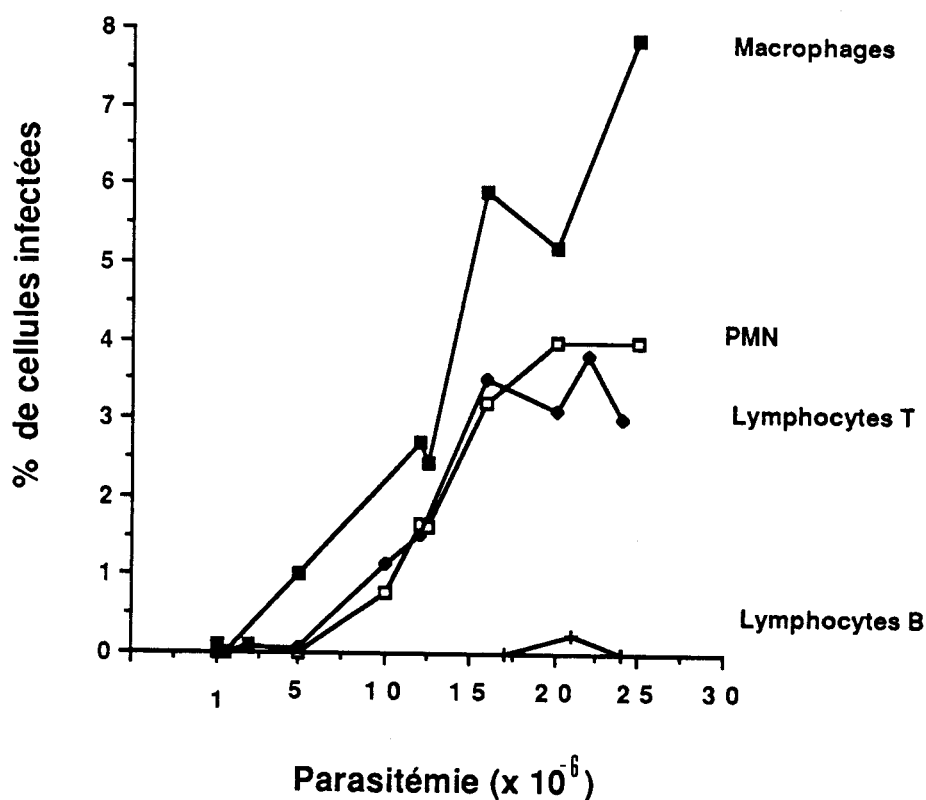
### 3. 3. Infection des lymphocytes T *in vivo*.

#### 3. 3. 1. Analyse en microscopie optique.

L'infection des lymphocytes T *in vivo* a été étudiée sur des souris BALB/c en phase aiguë de la maladie. L'examen en microscopie optique après coloration des lymphocytes T purifiés à partir de la rate (95% de cellules Thy 1.2 positives) révèle la présence *in vivo* de lymphocytes infectés. Néanmoins seule la caractérisation des sous-populations leucocytaires par la technique d'immunopéroxydase avec l'anticorps monoclonal correspondant, nous a permis d'analyser précisément l'évolution de l'infection des lymphocytes T et des autres cellules spléniques. Les résultats présentés Fig. 17 montrent que cette infection est fonction de la parasitémie mesurée dans le sang périphérique et que les taux d'infection des lymphocytes T sont comparables à ceux des polynucléaires neutrophiles voire des cellules hôtes préférentielles du parasite que sont les macrophages. De plus, il semble que les lymphocytes B ne soient pas infectés *in vivo*; en fait nous avons observé une cellule marquée par un anticorps anti-Ig de souris, marquée à la peroxydase, sur plus de 4000 cellules B comptées au total.

L'analyse des lymphocytes ganglionnaires et des leucocytes circulants, lors de la phase aiguë a permis de détecter également des lymphocytes T infectés. Néanmoins le taux d'infection y est pourtant 10 fois plus faible que dans la rate comme l'illustre la tableau 3 pour une parasitémie de  $12 \times 10^6$  parasites/ml de sang.

Néanmoins la numération en microscopie optique est fastidieuse et pouvait être une source d'erreurs. Le test d'incorporation d'hypoxanthine tritiée ne pouvant être appliqué aux analyses *in vivo*, Nous avons développé un test de mesure de l'infection cellulaire par hybridation de l'ADN parasitaire.



**Figure 17 : Infection leucocytaire dans la rate de souris en phase aiguë.**

Les rates de souris BALB/c sont prélevées, homogénéisées et les érythrocytes sont lysés par un choc osmotique. Les préparations cellulaires sont préparées par cytocentrifugation, les lymphocytes sont caractérisés par immunopéroxydase indirecte et contre-colorés par le RAL 555. 1000 à 5000 cellules sont comptées (grossissement  $\times 1000$ ) : PMN (Polynucléaires neutrophiles), Lymphocytes T (Thy 1.2 +), lymphocytes B (immunoglobulines +), Macrophages (MAC-1 +). La parasitémie est déterminée dans le sang périphérique selon la méthode de Riveras-Vanderpas et coll. (1983). Le pourcentage de cellules infectées est calculé suivant la formule : nombre de cellules infectées  $\times 100$  / nombre total de cellules du même type comptées.

**Tableau 3 : Mesure de l'infection des leucocytes chez la souris en phase aiguë.**

La rate, les ganglions lymphatiques et le sang périphérique sont prélevés chez des souris ayant une parasitémie voisine de  $12 \times 10^6$  parasites/ml de sang. Après dilacération des organes et destruction des érythrocytes par un choc hypotonique, les leucocytes sont cyto-centrifugés sur lame, caractérisés par immunopéroxydase indirecte puis contre colorés par le RAL 555. Le pourcentage de cellules infectées est calculé suivant la formule :

$$\frac{\text{nombre de cellules infectées}}{\text{nombre total de cellules du même type comptées}} \times 100$$

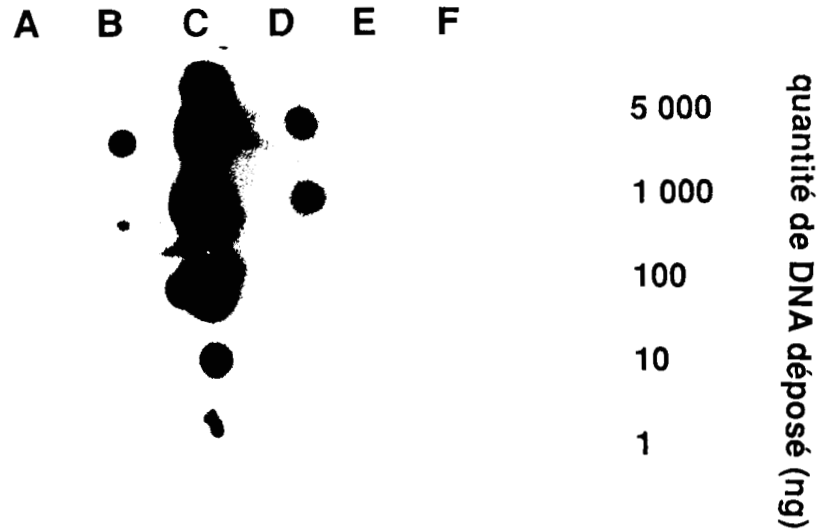
nombre total de cellules du même type comptées

	dans la rate	dans les ganglions lymphatiques	dans le sang périphérique
lymphocytes T	1,5%	0,1%	0,08%
lymphocytes B	0,0%	0,0%	0,0%
macrophages	2,8%	----	0,12%
polynucléaires neutrophiles	1,6%	----	0,07%

### 3. 3. 2. Détection de cellules infectées *in vivo* par hybridation de l'ADN parasite.

Dans ce test, l'ADN des leucocytes infectés ou sains est extrait par le phénol-chloroforme, digéré par Eco-R1 et fixé sur nitrocellulose. Le "dot blot" ainsi réalisé est hybridé avec un oligonucléotide de 37 mères marqué au  $^{32}\text{P}$ , et exposé en présence d'un film photographique. L'oligonucléotide a été choisi en fonction de son fort pourcentage en bases G-C et de sa présence dans les différentes souches de *T. cruzi* à partir d'un insert de 195 pb (Gonzalez et coll. 1984) fortement répété dans le génome de *T. cruzi*.

Ce test est extrêmement sensible puisqu'il peut détecter de 15 à 30 parasites et spécifique car aucun signal n'est détecté avec des leucocytes non infectés. Nous avons ainsi confirmé l'existence de cellules mononucléées infectées *in vivo* et, de façon plus intéressante, nous avons détecté des cellules infectées dans la population de cellules T purifiées à 95% (Fig. 18). Le signal obtenu ne peut être du à des parasites extracellulaires car ces derniers sont éliminés lors de la purification des lymphocytes T et leur absence a été vérifiée en microscopie optique. De plus l'enrichissement très important de la suspension en lymphocytes T augmente l'intensité du signal d'un facteur 5 or si les lymphocytes T n'étaient pas infectés ce signal aurait du diminuer d'intensité. En association avec une mesure en microscopie optique et compte tenu des travaux de Lanar et coll. (1981) montrant qu'il existe 0,33 pg d'ADN par parasite, nous avons apprécié entre 2 et 3 le nombre de parasites par lymphocyte *in vivo*.



**Figure 18 : Hybridation de l'ADN parasite.**

Sur les mêmes prélèvements de rates de souris, les cellules mononucléées (CMN) ou les lymphocytes T sont purifiés. L'ADN est extrait et déposé sur nitrocellulose à différentes concentrations 5000, 1000, 100, 10, 1 ng puis hybridés à 42°C en présence d'une sonde de 37 pb marquée au  $^{32}\text{P}$ . Après lavages, la nitrocellulose est exposée 2 jours en présence d'un film autoradiographique. A : CMN de souris saine, B : CMN de souris en phase aiguë, C : ADN d'épimastigotes de culture, D : Lymphocyte T de souris en phase aiguë (parasitémie  $15 \times 10^6$ ), E : Lymphocyte T de souris en phase aiguë (parasitémie  $2 \times 10^6$ ), F: Lymphocyte T de souris saine.

### 3. 4. Conclusions.

La compréhension des mécanismes par lesquels *T. cruzi* échappe à la réponse immune est très importante dans la lutte contre ce parasite. Ainsi les différentes techniques utilisées montrent, et ce pour la première fois, que le trypanostigote est capable d'infecter *in vitro* et *in vivo* les lymphocytes T et non les cellules B. Par conséquent, si jusqu'à présent, le rôle des lymphocytes T était restreint dans la maladie de Chagas, à la réponse immune ou aux mécanismes d'immunosuppression, nos résultats montrent que le lymphocyte peut héberger le parasite et donc être en partie responsable de sa dissémination dans l'organisme.

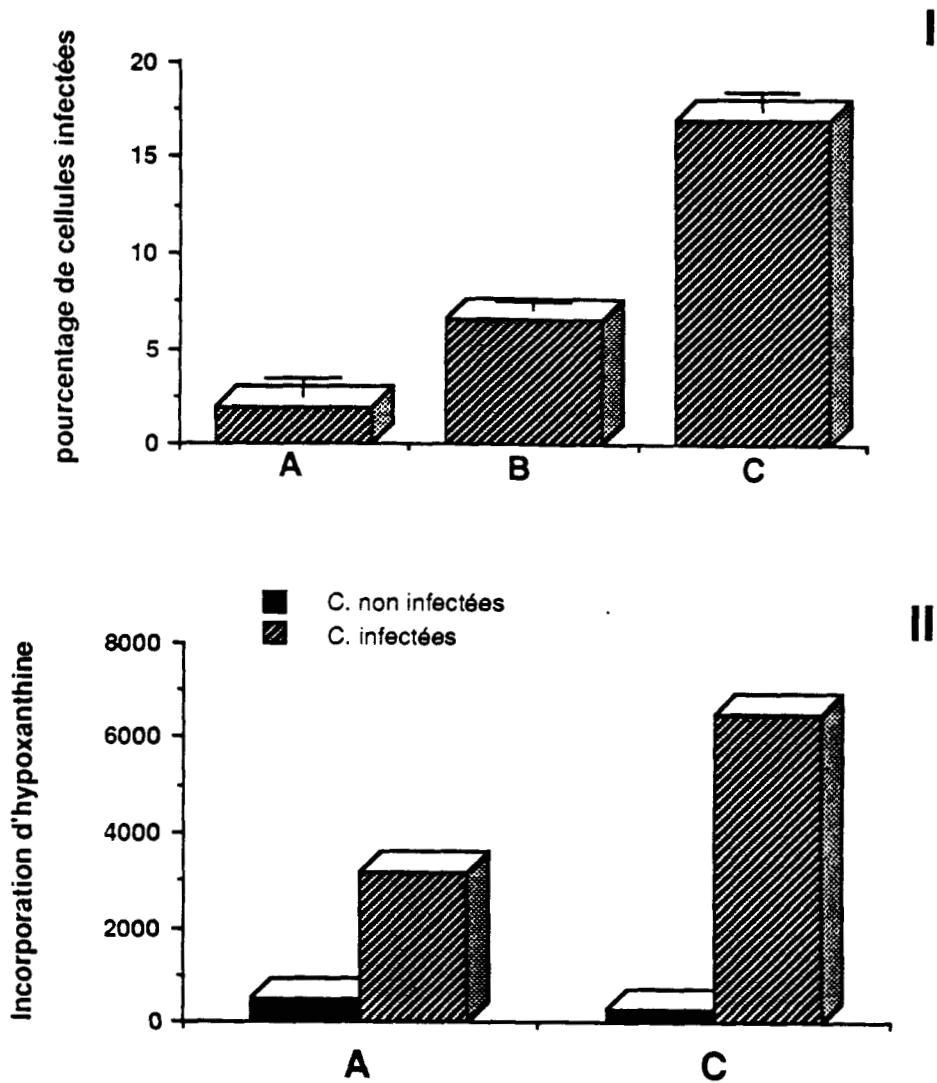
### 4. Nature des lymphocytes T infectés.

Le faible pourcentage de cellules infectées d'une part et l'infection plus importante des lymphocytes T *in vivo* (4%) par rapport à l'infection obtenue *in vitro* (2%) d'autre part, nous a amené à nous poser la question s'il n'existait pas une sous-population lymphocytaire T infectée par les trypanostigotes.

L'infection sélective *in vitro* de différentes sous-populations lymphocytaires T montrant que le parasite infecte aussi bien les lymphocytes CD4+ (helper) que les cellules CD8+ (cytotoxiques ou suppressives), nous avons étudié la susceptibilité à l'infection *in vitro* des cellules d'animaux infectés.

#### 4. 1. Infection in vitro de lymphocytes d'animaux infectés.

L'infection *in vitro* de lymphocytes T purifiés d'animaux sains, et d'animaux en phase aiguë ou en phase chronique de la maladie montre une susceptibilité à l'infection plus importante des cellules T d'animaux en phase aiguë. Pour un rapport de 10 parasites par cellule on obtient 17% de cellules infectées après 16 h de contact à 37°C avec des



**Figure 19 : Mesure de l'infection *in vitro* des lymphocytes T de souris infectées.**

Les lymphocytes T de souris saine (A) ou de souris en phase chronique (B) ou en phase aiguë (parasitémie  $1 \times 10^6$ ) (C) sont purifiés puis infectés par les trypomastigotes pendant 16 h à 37°C. Après élimination des parasites extracellulaires et maturation des amastigotes intracellulaires pendant 48 h, en présence d'hypoxanthine tritiée (II) ou non (I). Le pourcentage de cellules infectées est apprécié en microscopie optique après cytocentrifugation (I) ou par la mesure de la radio-activité incorporée (II).

lymphocytes T purifiés d'animaux en phase aiguë, alors que dans les mêmes conditions on obtient 7% de cellules infectées *in vitro* par les trypomastigotes quand les cellules proviennent d'animaux en phase chronique et 2% avec des cellules de souris saines (Fig. 19 I).

Cette susceptibilité plus importante à l'infection des cellules T d'animaux infectés a été confirmée en partie par le test à l'hypoxanthine (Fig. 19 II) avec des cellules de souris saines ou d'animaux en phase aiguë, préalablement irradiées puis infectées *in vitro* par les trypomastigotes.

L'infection très élevée obtenue *in vitro* avec les lymphocytes d'animaux en phase aiguë n'est pas liée à la préexistence de cellules infectées. En effet les cellules sont prélevées chez des animaux ayant une parasitémie inférieure à  $2 \times 10^6$  parasites/ml et le témoin de ces cellules non infectées *in vitro*, montre un taux d'infection inférieure à 0,5%.

La susceptibilité plus grande à l'infection des lymphocytes de la phase aiguë pouvait être expliquée soit par la présence d'antigènes parasitaires facilitant la pénétration du trypomastigote, soit par le degré d'activation de ces cellules. L'addition d'antigènes parasitaires ou des produits d'excrétion-sécrétion du parasite au milieu de culture ne facilitant pas la pénétration du parasite, nous avons étudié si l'activation des lymphocytes modifiait leur susceptibilité à l'infection.

#### 4. 2. Infection *in vitro* de lymphocytes activés.

Dans ce test nous avons activé des lymphocytes d'animaux sains ou en phase chronique par différents mitogènes et ceci pendant 24 h afin d'obtenir une activation cellulaire sans prolifération. Les cellules sont ensuite infectées par les trypomastigotes pendant 16 h et la maturation est poursuivie 48 h après l'élimination des parasites extracellulaires.



Nous confirmons par ce test que les lymphocytes T purifiés d'animaux en phase chronique s'infectent plus *in vitro* que les lymphocytes T d'animaux sains (Tableau 4). Le taux plus faible de cellules de phase chronique infectées dans ce test par rapport au taux obtenu dans la Fig. 19 est peut être lié au fait que les cellules ont été mises au repos pendant 24 h avant d'être infectées *in vitro*. Dans ces conditions, nous montrons que l'activation des lymphocytes d'animaux sains ou en phase chronique par différentes lectines mitogènes (PHA, Con A) ne modifient pas significativement leur susceptibilité à l'infection *in vitro*. Par contre, l'activation de ces cellules par le PMA augmente fortement le pourcentage de cellules infectées, qu'elles proviennent d'animaux sains ou en phase chronique.

Si dans ce test nous utilisons un peptide d'origine parasitaire (PP) provenant d'une molécule de 85 kDa (Peterson et coll. 1987) et présentant une activité de deuxième signal d'activation (Defoort et coll. en préparation), nous observons que ce peptide induit une augmentation de l'infection *in vitro* des lymphocytes d'animaux en phase chronique uniquement. Ceci est expliqué par l'état d'activation de la majorité des lymphocytes lors de la phase chronique (D'Imperio Lima et coll. 1986) alors que les lymphocytes d'animaux sains sont quiescents. Nous avons vérifié que l'infection était potentialisée par un état de préactivation, en activant des lymphocytes T quiescents par une dose suboptimale de PHA. Dans ces conditions, le peptide PP augmente la susceptibilité à l'infection des cellules (tableau 4).

#### 4. 3. Conclusions.

Il semble donc qu'il n'existe pas une sous-population lymphocytaire T infectée préférentiellement, mais que le degré d'activation de la cellule favorise son infection par le parasite. Le fait que les lymphocytes de la phase aiguë soient au stade blastique (c'est-à-dire très activés), pourrait expliquer leur susceptibilité accrue à l'infection par *T. cruzi*.

**Tableau 4 : Susceptibilité à l'infection *in vitro* des lymphocytes T activés.**

Les lymphocytes T de souris saine ou en phase chronique de la maladie de Chagas sont purifiés puis activés ou non pendant 24 h à 37°C par l'acide phorbol miristique (10 ng/ml), la phytohémagglutinine (4 µg/ml), le peptide parasitaire PP couplé à l'ovalalbumine (20 µg/ml) ou le peptide PP additionné de PHA à une concentration suboptimale (0,01 µg/ml). Après lavages, les lymphocytes T sont infectés par les trypanostigotes pendant 16 h puis les parasites extracellulaires sont éliminés. Le pourcentage de cellules infectées est calculé après cytocentrifugation et coloration par le RAL 555. Cette expérience représente la moyenne de deux expériences faites en double.

	lymphocytes de souris saines	lymphocytes de souris en phase chroniques
témoin	1.55 ± 0.1*	2.64 ± 0.2
PHA (4 µg/ml)	1.20 ± 0.06	2.96 ± 0.56
PP** (20 µg/ml)	0.90 ± 0.03	5.56 ± 0.52
PHA (0,01 µg/ml) + PP (20 µg/ml)	3.76 ± 0.24	3.41 ± 0.37
PMA (10 µg/ml)	6.01 ± 0.9	5.90 ± 0.61

\* pourcentage de cellules infectées *in vitro*

\*\* séquence peptidique : (Asp-Lys-Lys-Glu-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu)x5  
(Peterson et coll. 1986)

## 5. Mécanisme de pénétration du parasite dans les lymphocytes T.

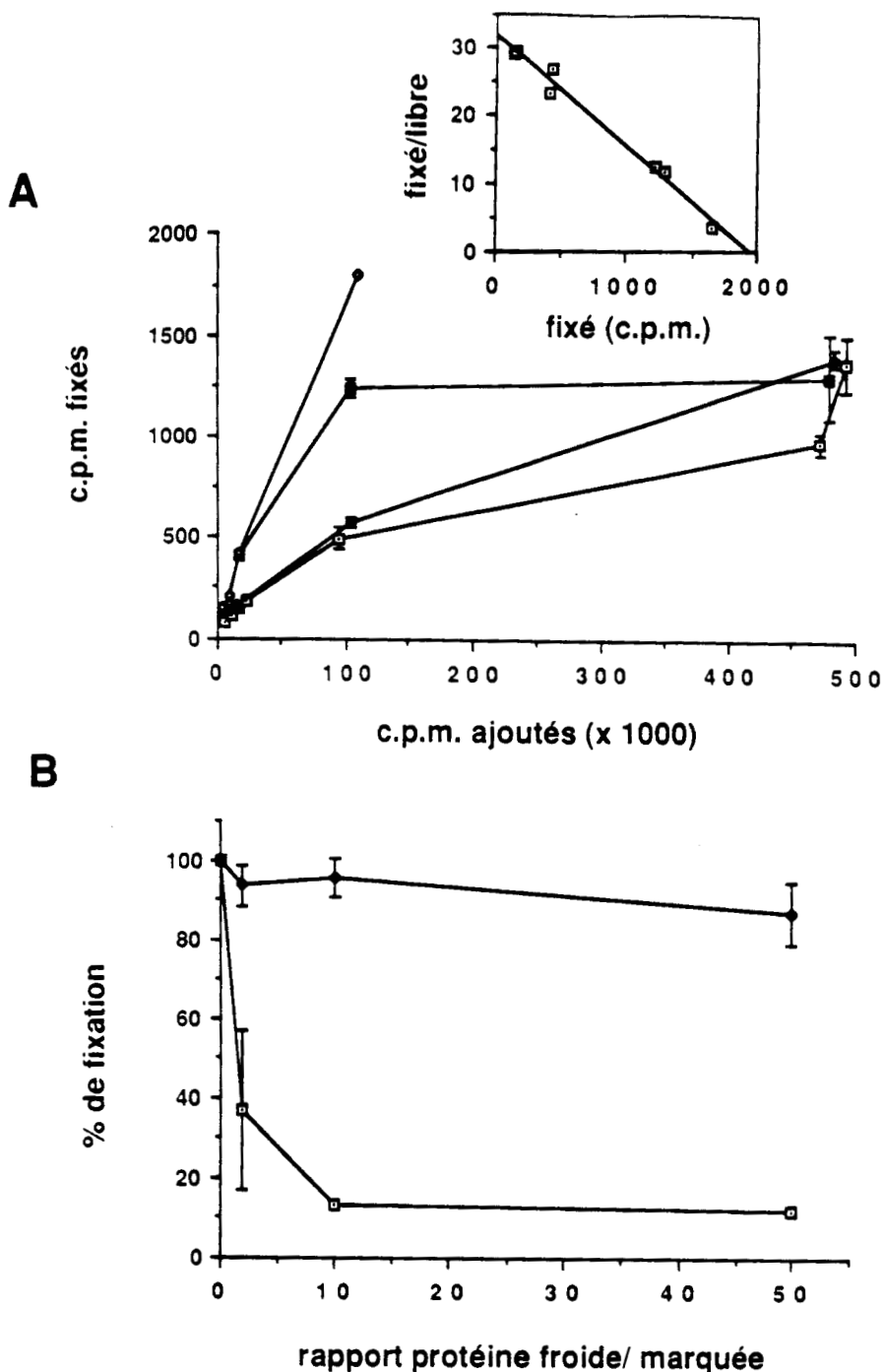
Ces résultats suggéraient que la pénétration du parasite soit facilitée par l'état d'activation de la cellule. Or de nombreux marqueurs lymphocytaires apparaissent ou sont en nombre plus important à la surface des lymphocytes activés. C'est le cas des récepteurs pour le collagène et la fibronectine qui font partie des marqueurs VLA. Nous avons donc vérifié si les mécanismes observés avec le fibroblaste et le macrophage s'appliquaient dans le cas du lymphocyte.

### 5. 1. Analyse de la fixation des antigènes parasitaires à la surface de lymphomes.

Les résultats présentés Fig. 20 indiquent que la fixation de quantités croissantes d'antigènes de trypanostigotes marqués en surface sur les lymphomes Jurkat est un processus saturable (Fig. 20A) et réversible (Fig. 20B). En effet un excès d'antigènes parasitaires non marqués entre en compétition avec la fixation des antigènes marqués. Ainsi un excès de 10 fois de protéines froides inhibe à 85% la fixation des antigènes radio-marqués. Cette inhibition n'est pas observée avec des protéines non parasitaires comme l'albumine bovine ou les protéines du SVF. L'analyse en scatchard (Fig. 20A) suggère la présence sur les lymphomes Jurkat de sites de fixation spécifiques pour certains antigènes parasitaires qu'il reste à identifier. Ces différents résultats ont été confirmés avec le lymphome MOLT4.

### 5. 2. Fixation des antigènes du trypanostigote sur les cellules Jurkat en présence de fibronectine.

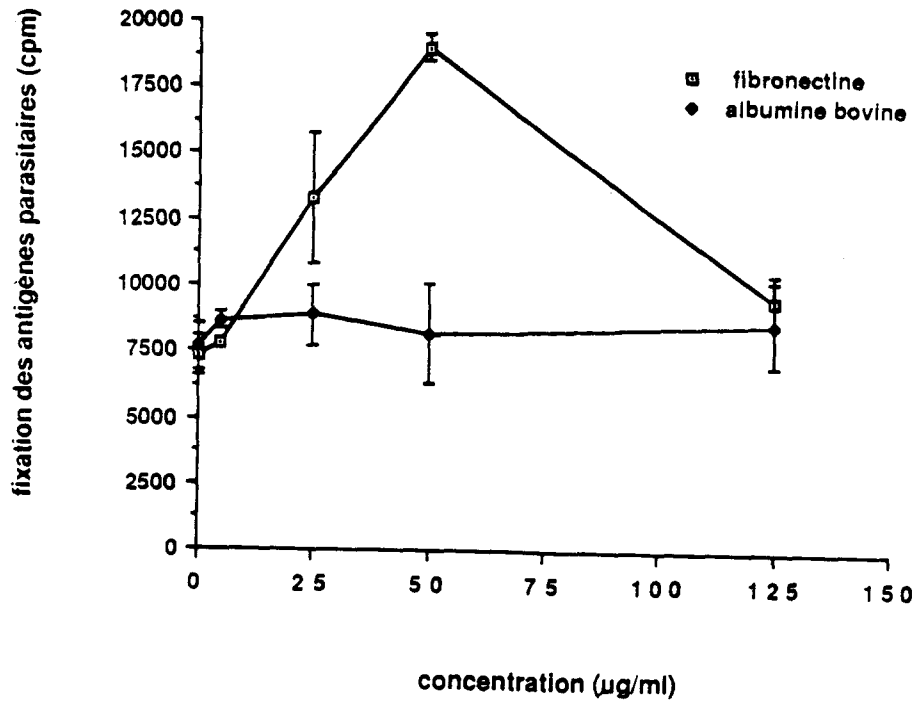
Afin de vérifier la présence de site de fixation pour les antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes, des antigènes de surface des trypanostigotes marqués en surface à l'iode 125 sont mis en contact avec des cellules Jurkat en présence de doses croissantes de fibronectine.



**Figure 20 : Fixation des antigènes de trypanostigotes marqués en surface, sur un lymphome T.**

A) Les trypanostigotes sont marqués en surface à l'<sup>125</sup>I par la méthode à l'iodogène, lysés par le dodécyl B D maltoside (DBM), passés au travers d'une colonne PD10, puis au travers d'une colonne d'extracti-Gel D. Différentes concentrations de cellules Jurkat (□ 5x10<sup>4</sup>, ◆ 1x10<sup>5</sup>, ■ 5x10<sup>5</sup>, ◀ 1x10<sup>6</sup>) sont lavées en milieu sans SVF puis incubées 1 h à 4°C en présence de doses croissantes d'antigènes parasitaires marqués dans un volume final de 300 µl. Les cellules sont lavées trois fois en RPMI, transférées dans de nouveaux tubes et la radio-activité est appréciée dans un compteur gamma. L'analyse en scatchard est réalisée pour 5x10<sup>5</sup> cellules avec le programme "Cricket Graph" d'Apple (en encadré).

B) Pour le test d'inhibition de la fixation des antigènes parasitaires marqués à l'<sup>125</sup>I sur le lymphome, des antigènes parasitaires non marqués (□) ou des protéines du SVF (◆) sont ajoutés. Les cellules (1x10<sup>6</sup>) sont incubées préalablement avec des quantités croissantes de protéines parasitaires froides ou des protéines du SVF pendant 15 min. à 4°C dans un volume final de 200 µl. 1x10<sup>5</sup> cpm d'antigènes parasitaires sont alors incubés 1 h à 4°C et la radio-activité fixée aux cellules est appréciée après lavages. Chaque point représente la moyenne ± SD d'expériences faites en triple.



**Figure 21 : Fixation des antigènes parasitaires en présence de fibronectine.**

Les cellules du lymphome T Jurkat sont cultivées en absence de fibronectine en milieu Ultrosor.  $2 \times 10^6$  cellules sont incubées avec des doses croissantes de fibronectine ou d'albumine bovine. Un extrait antigénique de trypomastigotes marqué en surface à l' $^{125}\text{I}$  est alors ajouté pendant 1 h à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois en HBSS-BSA 0,1% transférées dans de nouveaux tubes, la radioactivité fixée est appréciée au compteur gamma.

Dans ces conditions, l'addition de fibronectine augmente la fixation des antigènes parasitaires sur les lymphomes (Fig. 21). L'inhibition de cette fixation aux fortes concentrations de fibronectine est sans doute liée à un effet dose réponse. En effet la fibronectine forme un lien entre le récepteur pour la fibronectine du lymphocyte et celui du trypanostigote, l'excès de la glycoprotéine sature les différents récepteurs sans les relier.

Ces résultats suggèrent que l'adhésion des trypanostigotes sur les lymphocytes est médiée en partie du moins par le récepteur de la fibronectine. Il nous restait à étudier l'influence de cette adhésion sur la pénétration.

### *5. 3. Mesure de l'adhésion et de la pénétration parasitaire.*

Pour étudier l'influence de l'adhésion du trypanostigote sur la pénétration de ce dernier, nous avons maintenu des lignées lymphocytaires en milieu dépourvu de fibronectine et de collagène. Le collagène n'est pas présent dans le milieu Ultrosor et la fibronectine a été éliminée par une colonne d'Ultrogel gélatine. Dans ces conditions, nous avons observé que les différents lymphomes T sont infectés en l'absence de ces deux glycoprotéines. L'addition de fibronectine ou de collagène au milieu de culture favorise l'adhésion des trypanostigotes sur les cellules (Tableau 5). La faible adhésion des parasites dans le milieu contenant les deux glycoprotéines peut être expliquée par la formation de complexes fibronectine-collagène de très haut poids moléculaire non solubles ou non fixés aux cellules. Par contre, dans tous les cas il n'y a pas d'augmentation du nombre de cellules infectées après 21 h de contact. On peut remarquer seulement une augmentation de la rapidité de l'infection des cellules en présence de fibronectine ou de collagène (tableau 5).

D'autre part, nous avons remarqué que le trypanostigote adhère aux lymphocytes B, adhésion qui est augmentée par l'addition de fibronectine, sans qu'il y ait pénétration.

**Tableau 5 : Mesure de l'adhésion et de la pénétration des trypomastigotes en présence de fibronectine et de collagène.**

Des cellules T Jurkat sont cultivées en milieu Ultrosor déplété ou non en fibronectine. L'infection des cellules par les trypomastigotes est réalisée en présence ou non de fibronectine (FN) et (ou) de collagène (col) à 50 µg/ml. La réaction est arrêtée, à différents temps, par cyto-centrifugation et coloration des cellules. Le pourcentage de cellules infectées est mesuré (B), ainsi que le pourcentage de parasites extracellulaires adhérents par cellules (A).

	Ultrosor		Ultrosor - FN		Ultrosor - FN + FN		Ultrosor - FN + col.		Ultrosor - FN + FN + col.	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
15 min.	27.5	0.0	15	0.0	79.3	0.0	35	0.0	43	0.0
1 h.	32.5	1.0	16.3	0.0	94.2	0.75	75	0.25	10.5	0.0
4 h.	49	1.5	6	0.25	26	1.0	47.5	1.25	14	2.5
21 h	36.5	<b>3.75</b>	15	<b>3.0</b>	8	<b>2.5</b>	7	<b>3.0</b>	10	<b>2.0</b>

..

#### *5. 4. Modulation de l'infection cellulaire par la fibronectine et le collagène.*

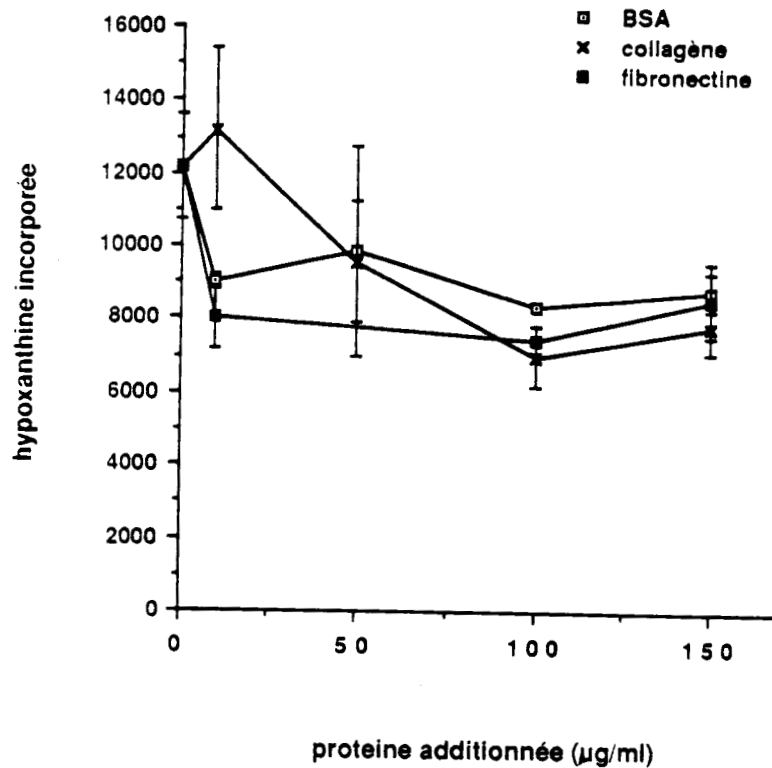
En utilisant le même milieu Ultrosor, dépourvu de fibronectine et de collagène, nous avons évalué l'influence de l'addition de fibronectine et de collagène sur l'infection de lymphomes par le test d'incorporation d'hypoxanthine. Dans ce test les trypomastigotes et les cellules sont incubés 16 h dans différents milieux contenant des doses croissantes de glycoprotéines. Les parasites sont ensuite éliminés et les cellules remises en milieu Ultrosor épuisé en fibronectine.

La Fig. 22 indique que l'addition des différentes protéines : la fibronectine, le collagène, ou l'albumine bovine, n'augmente pas l'infection parasitaire. On observe même une légère diminution de l'incorporation d'hypoxanthine par rapport au milieu seul.

#### *5. 5. Etude en microscopie électronique de la pénétration parasitaire.*

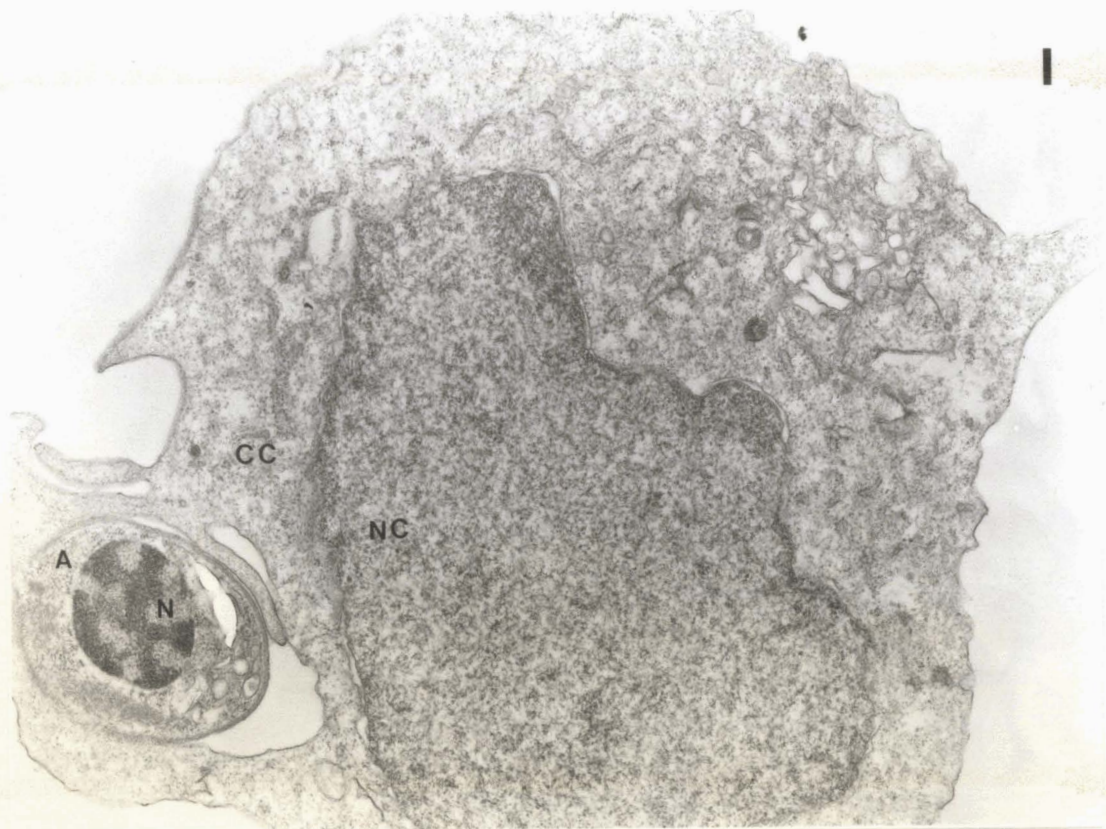
Il est difficilement concevable d'admettre la pénétration du trypomastigote dans un lymphocyte, en effet le parasite correspond sensiblement au  $1/10^6$  du volume de la cellule hôte qui n'est pas capable de phagocytose. De plus les connaissances sur la pénétration du trypomastigote dans les cellules non phagocytaires sont très fragmentaires et seul les observations en microscopie électronique peuvent nous renseigner sur ce phénomène. Il apparait que dans la majorité des cas, c'est la forme sphaeromastigote qui pénètre dans la cellule et au vue des prolongements membranaire de la cellule observés (Fig. 23), il semble que le lymphocyte joue un rôle actif dans la pénétration du parasite en englobant ce dernier. Ce recouvrement du parasite par la membrane lymphocytaire se ferait après fixation intime des membranes et serait le début de la vacuole parasitophore.





**Figure 22 : Infection *in vitro* de cellules Jurkat en présence de glycoprotéines.**

L'infection par les trypanostigotes des cellules Jurkat, préalablement irradiées, est réalisée en milieu Ultrosor épuisé en fibronectine et en collagène puis additionné de ces mêmes glycoprotéines ou d'albumine bovine à une concentration de 50 µg/ml. Après élimination des parasites extracellulaires, l'hypoxanthine tritiée est ajoutée et laissée en contact avec les parasites pendant 48 h. La radioactivité fixée dans l'ADN est mesurée dans un compteur bêta après filtration sur filtre de verre.



**Figure 23 : Observation en microscopie électronique de la pénétration du trypomastigote dans un clone T humain.**  
**A** : amastigote; **N** : noyau du parasite; **K** : kinétoplaste; **F** : flagelle rudimentaire; **CC** : cytoplasme cellulaire; **NC** : noyau cellulaire.



5. 6. *Inhibition par les anticorps monoclonaux de l'infection in vitro des lymphocytes T.*

5. 6. 1. *Etude en microscopie optique.*

Les résultats précédents montrent que la fibronectine et le collagène augmentent l'adhésion mais ne modifient pas la pénétration du parasite dans le lymphocyte. Des études complémentaires d'inhibition *in vitro* de l'infection parasitaire ont été réalisées en utilisant des Ac Mc dirigés contre les récepteurs parasitaires ou contre la fibronectine d'une part et des Ac Mc dirigés vis-à-vis des marqueurs de surface des lymphocytes d'autre part.

L'Ac Mc est incubé pendant 30 min. à 4°C avec le parasite ou la cellule hôte selon sa spécificité puis les parasites et les cellules sont mis en contact (en présence de l'Ac Mc) pendant 16 h à 37°C. Après lavages, maturation des parasites et cyto centrifugation, le nombre de cellules infectées est apprécié par observation en microscopie optique. Dans ces conditions, l'Ac Mc anti-fibronectine et l'Ac Mc anti-gp 58/68, qui inhibent la pénétration du trypanostigote dans le fibroblaste, n'ont aucune action sur l'infection des lymphocytes T humains (Tableau 6). Par contre, l'utilisation de différents Ac Mc dirigés contre les marqueurs de surface du lymphocyte nous a permis d'observer que l'Ac Mc anti-CD3 (marqueur spécifique des cellules T), ainsi que l'Ac Mc anti-HLA-DR (marqueur d'activation des cellules sanguines), inhibent partiellement la pénétration du parasite dans les lymphocytes. L'Ac Mc anti-CD4 inhibe également la pénétration du parasite mais son action est très variable. L'action de l'Ac Mc anti-HLA DR est très intéressante puisque cet Ac Mc inhibe l'infection de 40% or seul 5 à 10% des lymphocytes T chez un sujet sain sont HLA DR positifs. Ce résultat confirme donc que le trypanostigote pénètre de préférence dans les lymphocytes T activés.

**Tableau 6 : Effet des Ac Mc sur l'infection *in vitro* des lymphocytes T par *T. cruzi*.**

Les Ac Mc sont incubés préalablement 1 h à 37°C avec les trypomastigotes ou avec les cellules T de souris selon leurs spécificités. L'infection est réalisée en incubant cellules et parasites pendant 16 h à 37°C. Après élimination des parasites extracellulaires, suivie d'une maturation de 48 h, la réaction est arrêtée par cytocentrifugation et coloration. Le pourcentage de cellules infectées est apprécié par comptage en microscopie optique de 500 à 1 000 cellules. Cette expérience représente la moyenne de trois expériences indépendantes.

anticorps monoclonal ajouté au milieu	dilution	nombre de cellules infectées pour 10 <sup>3</sup> cellules	pourcentage d'inhibition d'infection
contrôle		17,6 ± 2,9	---
ascite SP <sub>2</sub> O	1/40	18,5 ± 2,7	---
	1/400	14,5 ± 1,5	12
anti-fibronectine (M 1205)	1/40	16,4 ± 0,1	6,5
	1/400	16,4 ± 1,9	6,5
anti-gp 58/68 (155D3)	1/50	20,0 ± 1,7	---
	1/500	15,9 ± 1,5	9,6
anti-HLA DR	1/50	9,8 ± 2,1	39,9
	1/500	9,7 ± 0,1	40,5
anti-CD3	1/50	4,0 ± 0,8	77,0
	1/100	4,2 ± 0,6	76,2
	1/500	5,5 ± 0,3	66,6
anti-CD8	1/50	14,0 ± 0,9	20,1
	1/100	18,1 ± 1,9	---
	1/500	15,7 ± 3,4	10,6

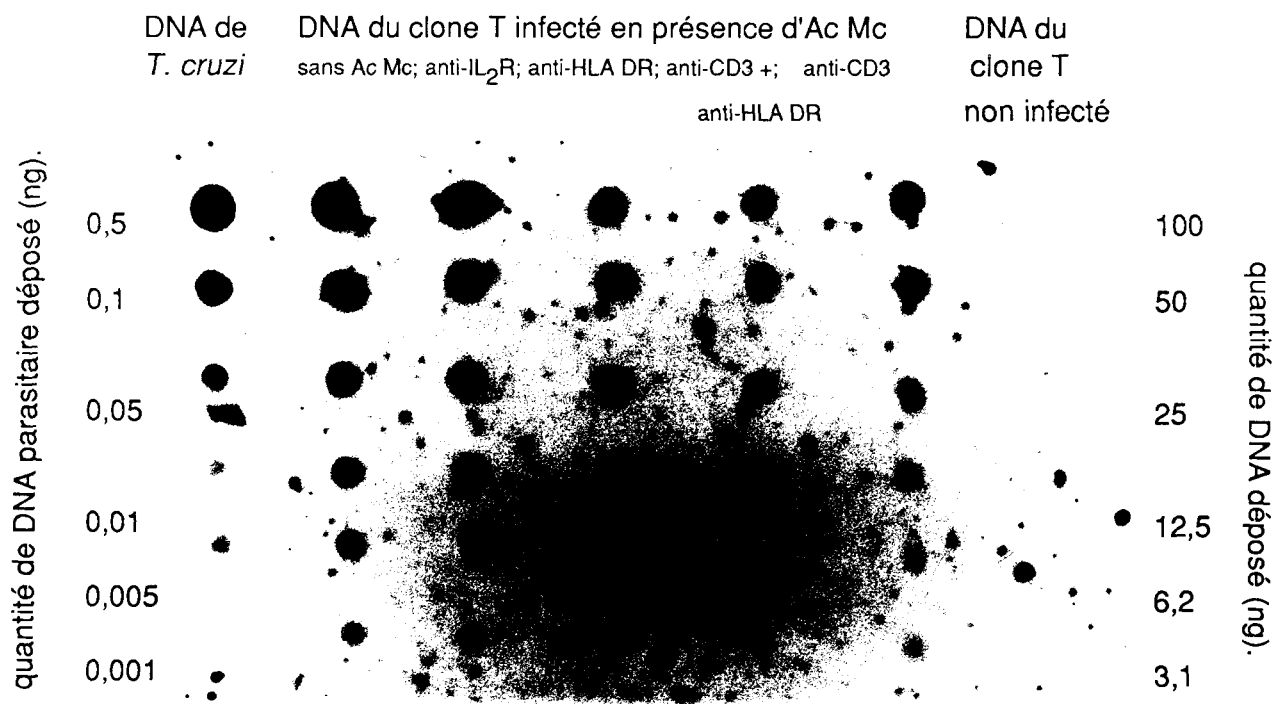
### 5. 6. 2. Etude par hybridation de l'ADN parasite.

Dans ce test nous utilisons les mêmes conditions décrites précédemment mais nous utilisons le clone T humain comme cellule hôte. L'ADN des cellules infectées et non infectées est hybridé avec la sonde oligonucléotidique, spécifique de *T. cruzi*. Après trois jours d'exposition, nous obtenons le profil présenté Fig. 24. L'autoradiographie est ensuite analysée par le Chromoscan 3 qui mesure l'intensité des spots (Fig. 25). Par ce test, utilisant le clone T humain dont nous disposions, nous confirmons les résultats obtenus par mesure en microscopie optique sur les lymphocytes T de patients sains. C'est à dire que l'Ac Mc 155D3 n'a aucune action sur la pénétration du trypomastigote dans le lymphocyte T (Fig. 25). On retrouve également l'action inhibitrice des Ac Mc anti-CD3 et anti-HLA DR, cet effet est augmenté par l'association des deux anticorps, puisque l'on obtient alors plus de 70% d'inhibition de la pénétration des parasites et ceci à des concentrations très faibles (0,5 µg/ml).

L'action de l'Ac Mc anti-CD3 pouvait être due à une activation du lymphocyte; en effet cet anticorps possède une activité mitogène qui pouvait agir pendant les 16 h de contact avec les lymphocytes. Néanmoins cela semble peu probable car nous avons montré que l'activation du lymphocyte augmentait la pénétration. De plus l'Ac Mc anti-CD2, capable également d'activer les lymphocytes (en l'absence de macrophage), n'a aucune action sur l'infection. L'Ac Mc anti-CD3 inhibe donc la pénétration du parasite en bloquant son entrée dans la cellule.

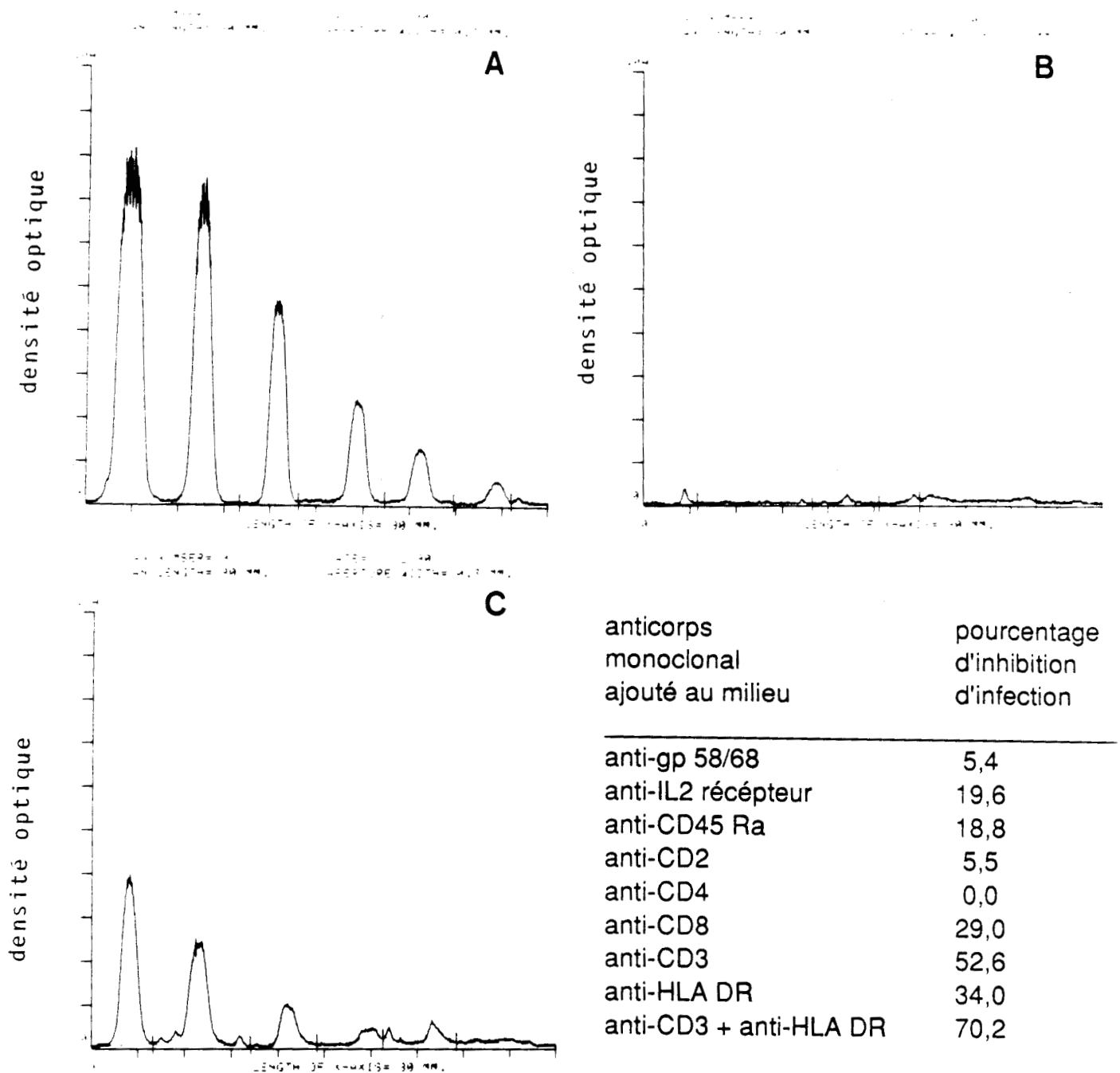
### 5. 7. Conclusions.

Le modèle d'infection du lymphocyte semble donc tout à fait original. Il montre clairement que la fibronectine et le collagène interviennent dans la phase d'adhésion du parasite mais que ces deux glycoprotéines n'interviennent pas dans le processus de pénétration dans le lymphocyte.



**Figure 24 : Inhibition par les anticorps monoclonaux de l'infection des lymphocytes T.**

Les Ac Mc sont incubés préalablement 1 h à 4°C, selon leurs spécificités, avec le clone T humain ou avec les trypomastigotes. L'infection *in vitro* est réalisée en incubant pendant 16 h à 37°C les cellules avec les parasites. Après élimination des parasites extracellulaires, le DNA est extrait, digéré par Eco R1 puis fixé sur nitrocellulose à différentes concentrations (100 à 3,1 ng). L'hybridation par la sonde oligonucléotidique est réalisée pendant une nuit à 42°C. Après lavages et deux jours d'autoradiographie, nous obtenons le profil ci-dessus. Deux contrôles sont réalisés, d'une part avec le DNA d'épimastigote comme témoin positif de réaction (500 à 1 pg) et d'autre part avec le DNA des lymphocytes T non infectés.



**Figure 25 : Analyse de l'autoradiographie par le Chromoscan 3.**

L'autoradiographie obtenu figure 24 est analysée par le Chromoscan 3. Les calculs du pourcentage d'inhibition d'infection du clone T par les trypanostigotes en présence des Ac Mc sont calculés sur l'intégrale réalisée par le Chromoscan 3 par rapport à un témoin sans anticorps.

De plus, comme nous le montre l'étude du lymphocyte B, l'adhésion du trypomastigote sur une cellule n'implique pas sa pénétration dans la cellule cible. Ceci confirme les travaux de Piras et coll. 1983 qui suggèrent que la phase d'adhésion et de pénétration sont deux phases distinctes de l'infection.

Il semble par contre que le trypomastigote reconnaisse sur le lymphocyte T un épitope proche du récepteur T (ce récepteur n'est pas présent sur le lymphocyte B) puisque tous les Ac Mc qui inhibent la pénétration du parasite sont dirigés vis-à-vis de structures proches du récepteur T.

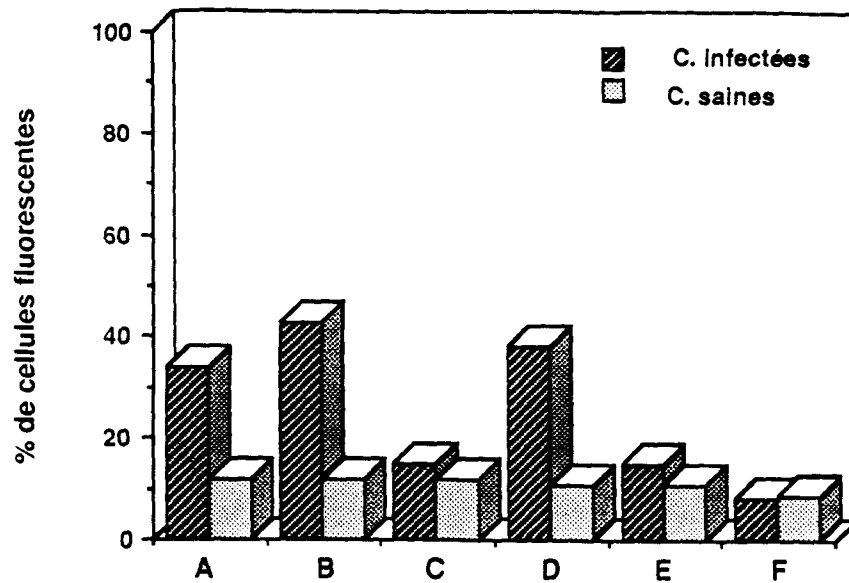
#### **6. Devenir *in vivo* des lymphocytes infectés.**

Le très faible nombre de parasites par cellule nous avait frappé lors des numérations de lymphocytes infectés *in vivo*. Ce résultat a été confirmé par les expériences d'hybridation de l'ADN parasitaire. Nous avons donc émis l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme de destruction des lymphocytes infectés. Notre première démarche a été de rechercher des antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes d'animaux infectés et susceptibles d'être la cible d'un mécanisme effecteur de l'hôte.

##### *6. 1. Détection d'antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes de souris en phase aiguë de la maladie.*

Nous avons examiné par cytofluorimétrie en flux la présence potentielle d'antigènes de *T. cruzi* à la surface de lymphocytes T purifiés (90% de cellules Thy 1.2 positives) d'animaux en phase aiguë dont la parasitémie est de l'ordre de  $10^6$  à  $10^7$  trypomastigotes/ml. Il s'est avéré que la majorité des sérums de phase aiguë testés (Fig. 26 barre A et B) et qu'une partie des sérums de phase chronique (4/9) (Fig. 26 barre C et D) réagissent vis-à-vis des lymphocytes T d'animaux infectés alors qu'aucune reconnaissance spécifique n'est obtenue avec des sérums d'animaux sains (Fig. 26 barre E).





**Figure 26 : Réactivité des sérums de souris immunes vis-à-vis des lymphocytes T de souris en phase aiguë.**

Un million de lymphocytes T purifiés durant la phase aiguë de la maladie de Chagas (▨) ou de souris saine (▩) sont incubés 1 h à 4°C avec les sérums de souris en phase aiguë (A, B), en phase chronique (C, D), de souris saine (E). Après lavages en HBSS, les cellules sont réincubées 30 min. à 4°C avec des fragments  $F(ab)'_2$  marqués à la fluorescéine, d'IgG anti-immunoglobulines de souris. Un contrôle est réalisé avec ce composant uniquement (F). Finalement les cellules sont lavées deux fois, fixées par le paraformaldéhyde 1% et analysées en cytofluorimétrie en flux.

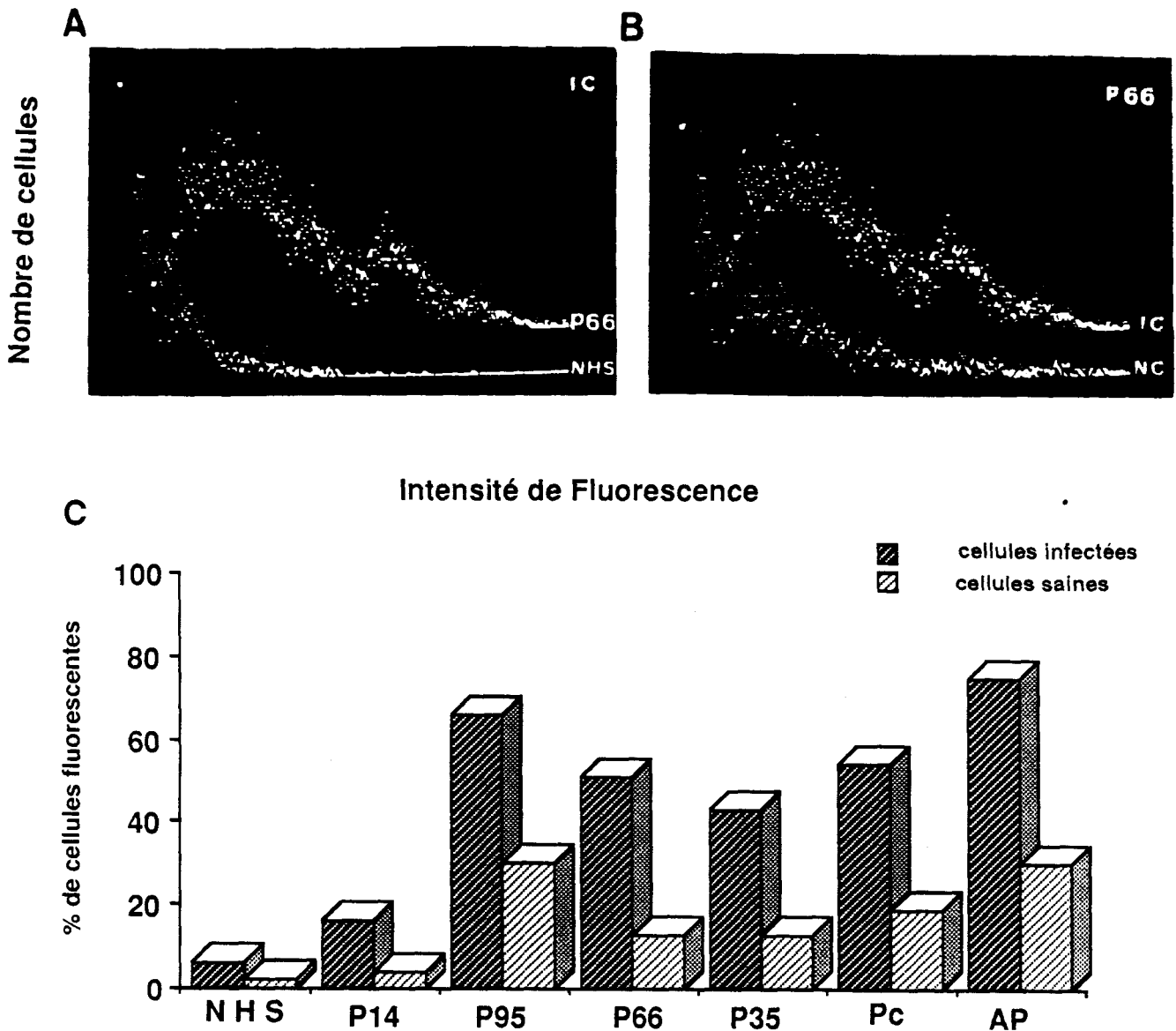
Cette figure est représentative de deux expériences. Les cellules sont Thy 1.2 + à 90% et portent à 10% des immunoglobulines à leurs surface.

De même aucune fluorescence spécifique n'est obtenue avec ces différents sérums sur des lymphocytes T d'animaux sains. La faible fluorescence obtenue avec tous les sérums y compris le  $F(ab)'_2$  fluorescent de chèvre anti-Ig de souris correspond aux lymphocytes B contaminants qui représentent autour de 10% des cellules.

#### 6. 2. Réactivité des sérums humains vis-à-vis des lymphocytes T de souris.

Pour bloquer les récepteurs Fc des lymphocytes B contaminants, les cellules de souris sont préincubées avec un sérum de souris saine puis sont mises en présence des différents sérums humains. La révélation est assurée par un anticorps fluorescent anti-Ig humaines. Comme nous l'observons Fig. 27, la majorité des sérums de patients en phase aiguë reconnaît la surface des lymphocytes T d'animaux en phase aiguë (Fig. 27 B, C). De même sur 13 sérums de patients en phase chronique, 11 reconnaissent la surface des lymphocytes d'animaux infectés. Cette fluorescence ne peut être reliée à une fixation des anticorps sur les récepteurs Fc des lymphocytes puisque aucune fluorescence n'est obtenue avec les sérums humains sains ou avec certains sérums de phase chronique (P14) riches en immun-complexes (Fig. 27C).

Il est intéressant de noter que l'intensité de la fluorescence avec les sérums de patients infectés est bimodale (Fig. 27A) ce qui suggère l'existence de deux populations lymphocytaires ayant des antigènes parasitaires à leur surface. De plus le nombre de cellules infectées correspond sensiblement au nombre de cellules présentant cette forte intensité de fluorescence avec les sérums de patients infectés. Néanmoins, jusqu'à présent, nous n'avons pas assez d'éléments pour relier cette forte intensité de fluorescence à l'infection de ces cellules. D'un autre côté, il semble évident qu'il existe des antigènes parasitaires à la surface des cellules non infectées puisque l'on observe au maximum 4% de lymphocytes T infectés alors que plus de 50% des lymphocytes portent des antigènes à leur surface.



**Figure 27 : Réactivité des sérums humains chagasiques vis-à-vis des lymphocytes T de souris en phase aiguë.**

Les trois images montrent :

**A :** L'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules obtenu avec un sérum P66 de patients en phase chronique ou avec un sérum humain sain (NHS), ceci sur des lymphocytes T de souris en phase aiguë (parasitémie de  $20 \times 10^6$ ).

**B :** L'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules obtenu avec un sérum P66 de patients en phase chronique sur des lymphocytes T de souris saines (NC) ou en phase aiguë (IC).

**C :** Le pourcentage de cellules fluorescentes (■ de souris en phase aiguë, ▨ de souris saines) en présence de sérum de patients sains (NHS), de patients en phase chronique (P14, P95, P66, P35, Pc), de patients en phase aiguë (AP).

Cette figure est représentative de deux expériences faites séparément. Dans ce test les cellules sont en moyenne Thy 1.2 + à 95% et 7% des cellules portent des immunoglobulines à leurs surfaces.

6. 3. *Analyse par double marquage de la réactivité des sérums immuns vis-à-vis des lymphocytes d'animaux infectés.*

Le double marquage a été réalisé en utilisant l'Ac Mc fluorescent anti-Thy 1.2 (Fig. 28A) et un anticorps marqué à la phycoérythrine, anti-Ig humaines (Fig. 28B). Il permet de démontrer que les sérums de patients infectés reconnaissent bien les lymphocytes T purifiés lors de la phase aiguë mais pas les cellules d'animaux sains ou en phase chronique (Fig. 28). De plus aucun double marquage n'est obtenue avec un sérum humain normal ou un sérum de patient en phase chronique (P14).

Nous observons également dans ce test la fluorescence de type bimodale avec les sérums humains (Fig. 28B).

6. 4. *Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante.*

Après avoir montré la présence d'antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes d'animaux en phase aiguë de la maladie de Chagas, nous avons recherché l'existence *in vivo* d'un mécanisme de cytotoxicité cellulaire pouvant détruire ces cellules.

Aucune cytotoxicité liée aux lymphocytes T cytotoxiques (cytotoxicité de cellules mononucléées d'animaux infectés vis-à-vis de lymphocytes T syngéniques d'animaux en phase aiguë mesurée en l'absence d'anticorps) ou aux cellules Natural Killer (cytotoxicité de cellules mononucléées d'animaux sains vis-à-vis de lymphocytes T syngéniques d'animaux en phase aiguë mesurée en l'absence d'anticorps), n'a été mise en évidence. Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes de cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant (ADCC) : soit en système homologue c'est-à-dire avec des cellules cibles, des cellules effectrices et des sérums de souris; soit en système hétérologue c'est-à-dire avec des cellules cibles de souris, des cellules effectrices et des sérums ou des immunoglobulines purifiées humaines

**Figure 28 : Analyse par double marquage de la réactivité des sérums humains chagasiques vis-à-vis des lymphocytes T de souris infectées.**

Des lymphocytes T sont purifiés à partir de souris saine, en phase chronique de la maladie, ou en phase aiguë (parasitémie de  $1 \times 10^7$ ). Ces différentes cellules sont incubées avec des sérums humains normaux (SeHN); des sérums de phase chronique (SePC); ou des sérums de phase aiguë (SePA). Les anticorps fixés sur les lymphocytes sont révélés par des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines humaines et marqués par la phycoerthrine (Fig. 28 B). La nature T des cellules de souris est révélée par un Ac Mc anti-Thy 1.2 fluorescent (Fig. 28 A). La double fluorescence est analysée en cytofluorimétrie en flux (Fig. 28 C). Le tableau montre le pourcentage de cellules fluorescentes (1: cellules Thy 1.2 +; 2: cellules doublement marquées) en présence des différents sérums humains.

	cellules purifiées de la phase aiguë	lors	cellules purifiées lors de la phase chronique	cellules purifiées de souris saines
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
Se P. A.	87*	42.5	92	95
Se P. C.	90	9.7	94	98
Se H. N.	82	21.3	90	92

\*pourcentage de fluorescence

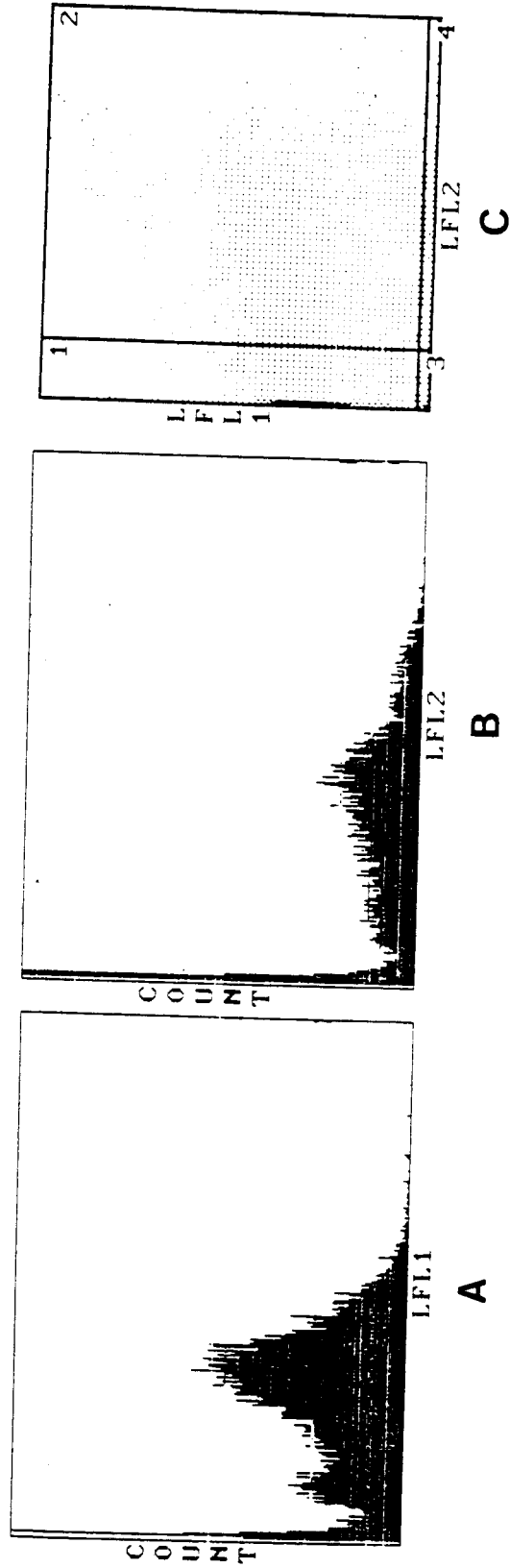


Fig. 28

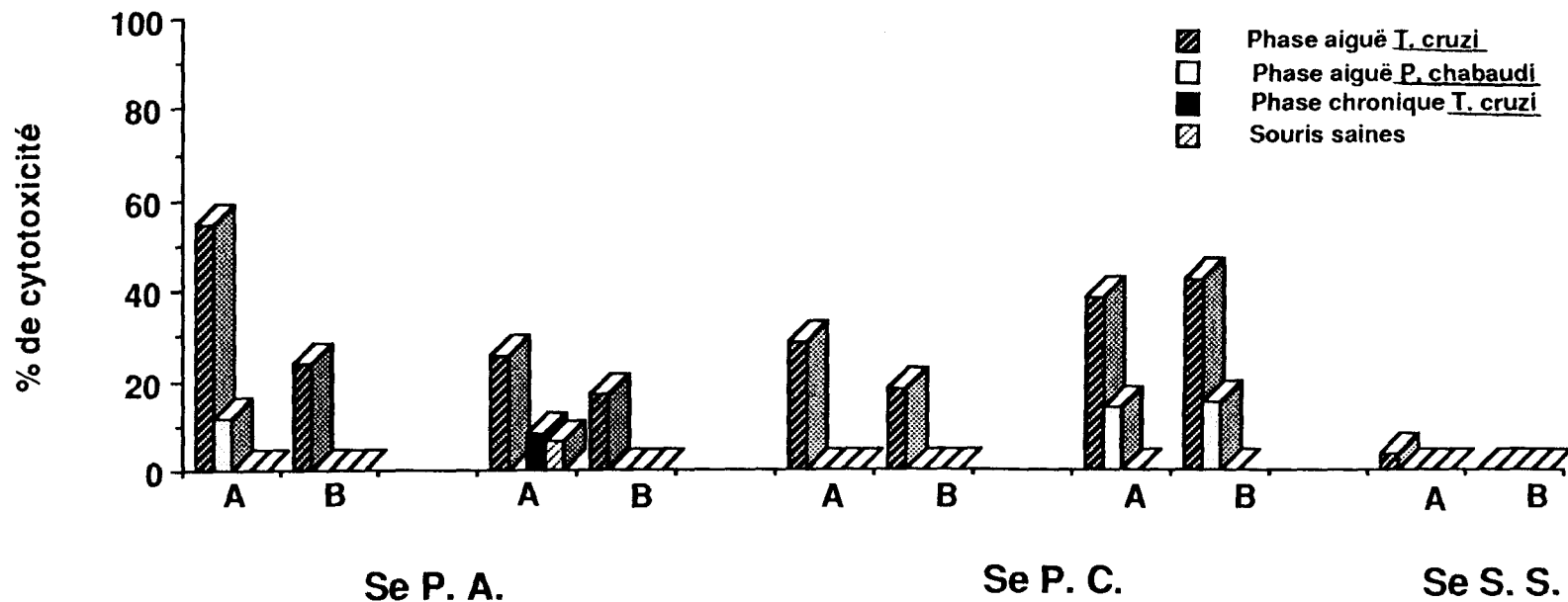
#### 6. 4. 1. En système homologue.

Différentes expériences préliminaires nous ont permis de déterminer les conditions optimales pour marquer au  $^{51}\text{Cr}$  les lymphocytes T purifiés et pour mettre en évidence le mécanisme d'ADCC.

Si on utilise comme cellules cibles des lymphocytes de souris en phase aiguë (95% de cellules Thy 1.2), on peut observer que les sérums de souris en phase aiguë ou en phase chronique induisent en présence de cellules mononucléées d'animaux sains, une cytotoxicité très significative par rapport à un sérum de souris saine (Fig. 29). Cette ADCC semble spécifique puisqu'elle n'est retrouvée avec aucune des autres cellules cibles testées que ce soit des lymphocytes T prélevés lors de la phase chronique de la maladie de Chagas, ou lors de la phase aiguë de souris infectées par *Plasmodium chabaudi* ou chez des souris saines. Cette cytotoxicité est significative ( $p < 0,01$ ) dans 70% des sérums de phase aiguë et dans 30% des sérums de phase chronique testés et ceci à des dilutions allant jusqu'au  $1/200^e$ . Si l'on fait une comparaison entre la reconnaissance en cytofluorimétrie en flux et l'ADCC obtenue, on remarque que les sérums qui reconnaissent la surface des lymphocytes T induisent une cytotoxicité importante et inversement.

#### 6. 4. 2. En système hétérologue.

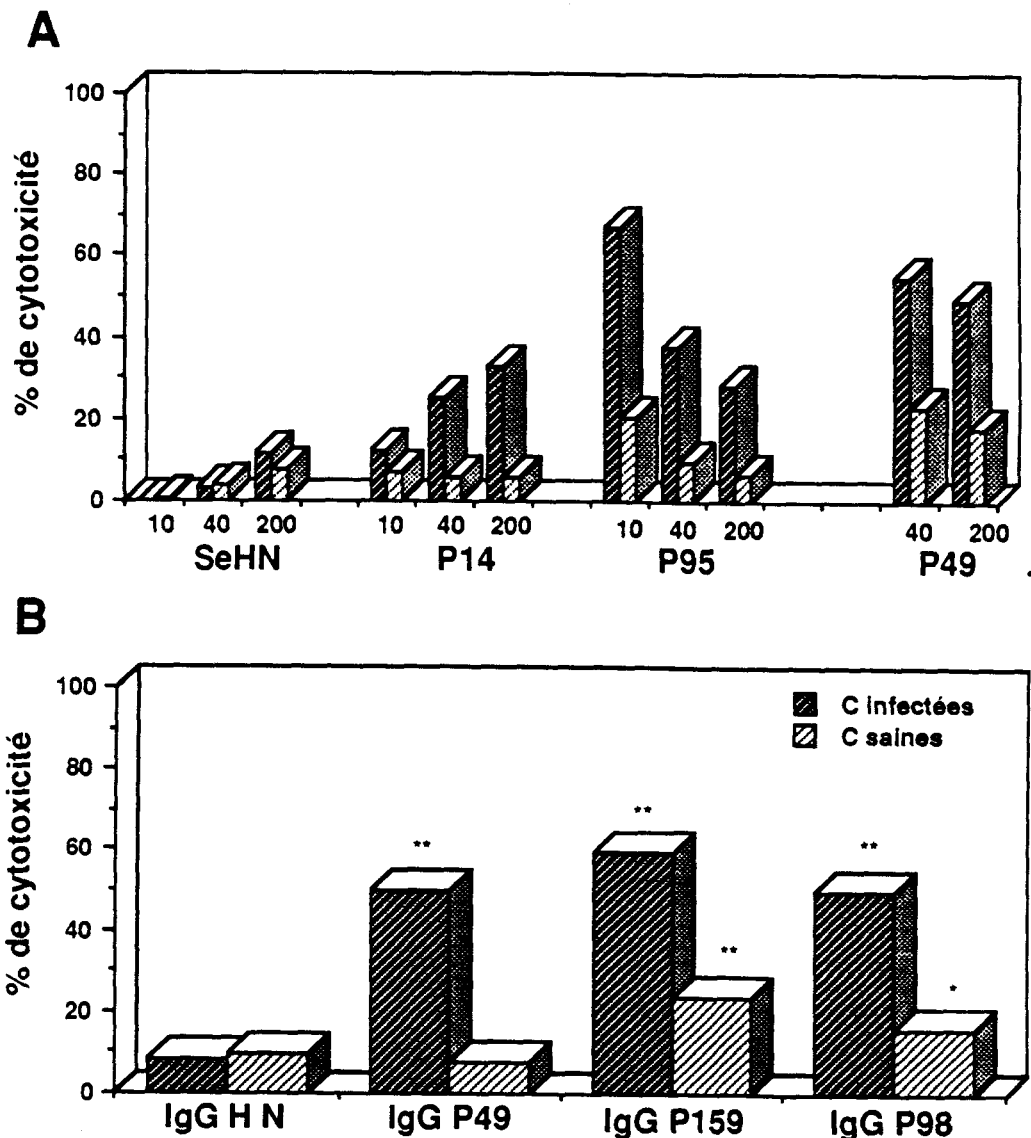
Afin de vérifier que nous n'avions pas mis en évidence un phénomène de cytotoxicité de type auto-immune, c'est à dire avec des anticorps dirigés vis-à-vis d'antigènes lymphocytaires, nous avons réalisé le test d'ADCC en système hétérologue ce qui diminue les possibles réactions croisées. Ainsi, nous avons utilisé des cellules cibles de souris en présence de sérums et de cellules mononucléées humaines purifiées sur gradient de Ficoll. Dans ces conditions nous observons que les sérums de patients infectés sont capables d'induire une cytotoxicité cellulaire des cellules mononucléées vis-à-vis des lymphocytes de souris en phase aiguë à des dilutions entre  $1/10^e$  et  $1/200^e$  (Fig. 30A). Par contre les sérums d'animaux sains n'induisent aucune cytotoxicité.



**Figure 29 : Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante vis-à-vis de cellules de souris en phase aiguë.**

Les lymphocytes T purifiés : ▨ de souris saines; ■ de souris en phase chronique de la maladie de Chagas; ▩ de souris en phase aiguë de la maladie de Chagas; □ de souris en phase aiguë de la malaria (*Plasmodium chabaudi*) sont marqués au  $^{51}\text{Cr}$  pendant 3 h à 37°C.  $1 \times 10^5$  cellules T marquées sont incubées pendant 12 h à 37°C en présence de  $1 \times 10^6$  cellules murines mononucléées et de sérum de souris dilué au  $1/50^e$  (A) ou au  $1/200^e$  (B). Se P. A. : sérum de phase aiguë; Se P. C. : sérum de phase chronique; Se S. S. : sérum de souris saine. Cette figure représente la moyenne de deux expériences faites en double.





**Figure 30 : Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante vis-à-vis des lymphocytes de souris en phase aiguë.**

Des cellules de souris saines (▨) ; ou de souris en phase aiguë (▩) sont marquées 3 h par du  $^{51}\text{Cr}$ .  $1 \times 10^5$  cellules cibles marquées sont incubées 12 h à  $37^\circ\text{C}$  avec  $2 \times 10^6$  cellules mononucléées humaines et des sérums humains normaux (SeHN), ou des sérums de patients chagasiques (P14, P95, P49) à différentes dilutions ( $1/10^e$ ,  $1/40^e$ ,  $1/200^e$ ).

La même expérience est réalisée avec 50 g/ml d'IgG purifiées à partir de sérums d'humains normaux (IgGHN) ou de patients chagasiques présentant une cardiopathie (IgG P49) ou asymptomatiques (IgG P159, IgG P98).

Cette figure est représentative de 3 expériences indépendantes faites en triple. En test de Student (\* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

Nous retrouvons dans ces tests également une certaine analogie entre la reconnaissance par les sérums de la surface des lymphocytes d'animaux en phase aiguë et le pourcentage de cytotoxicité induite par ces mêmes sérums. Néanmoins le nombre de sérums testés est insuffisant pour parler de corrélation.

Afin de vérifier que cette cytotoxicité était bien induite par les immunoglobulines, nous avons purifié la fraction IgG sur une colonne de gel filtration et nous avons refait l'expérience en utilisant 10 $\mu$ g d'IgG par essais. Dans ces conditions nous avons obtenu une cytotoxicité très significative ( $P < 0,01$ ) (Fig. 30B) avec les IgG de patients cardiopathiques (IgG P49) ou les IgG de patients asymptomatiques (IgG P159, 98).

#### 6. 5. Identification des antigènes parasitaires présents à la surface des lymphocytes T.

Afin d'identifier les molécules reconnues par les sérums d'infection, une immunoprécipitation des antigènes de lymphocytes T, marqués en surface a été réalisée. Il apparaît que les sérums de patients en phase aiguë ou en phase chronique reconnaissent deux protéines majeures de 170 et de 115 kDa de poids moléculaire apparent et deux protéines mineures de 34 et de 29 kDa à la surface des lymphocytes de souris en phase aiguë (Fig. 31) alors que ces mêmes sérums ne reconnaissent pas la surface de lymphocytes de souris saine. Cette reconnaissance semble être spécifique puisque les antigènes présents à la surface des lymphocytes T de souris en phase aiguë ne sont pas reconnus par différents sérums humains normaux, européen ou bolivien, ou par des sérums de patients infectés par d'autres parasites : *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondi*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni* (Fig. 31).

Néanmoins, jusqu'à présent, nous ne savons pas si ces antigènes sont présents à la surface des autres populations leucocytaires de la phase aiguë.

**Figure 31 : Identification des antigènes de surface des lymphocytes T de souris en phase aiguë reconnus par les sérums de patients chagasiques.**

L'immunoprécipitation est réalisée sur des antigènes de lymphocytes T purifiés lors de la phase aiguë, par différents sérums humains : **A** : profil total des antigènes des lymphocytes T marqués en surface à l'iode 125; **B** : sérums de patients en phase aiguë; **C** : sérums de patients en phase chronique; **D** : sérums de patients européen et bolivien sains; **E-H** : sérums de patients infectés par d'autres parasites **E** : *Plasmodium falciparum*, **F** : *Toxoplasma gondii*, **G** : *Leishmania donovani*, **H** : *Schistosoma mansoni*.

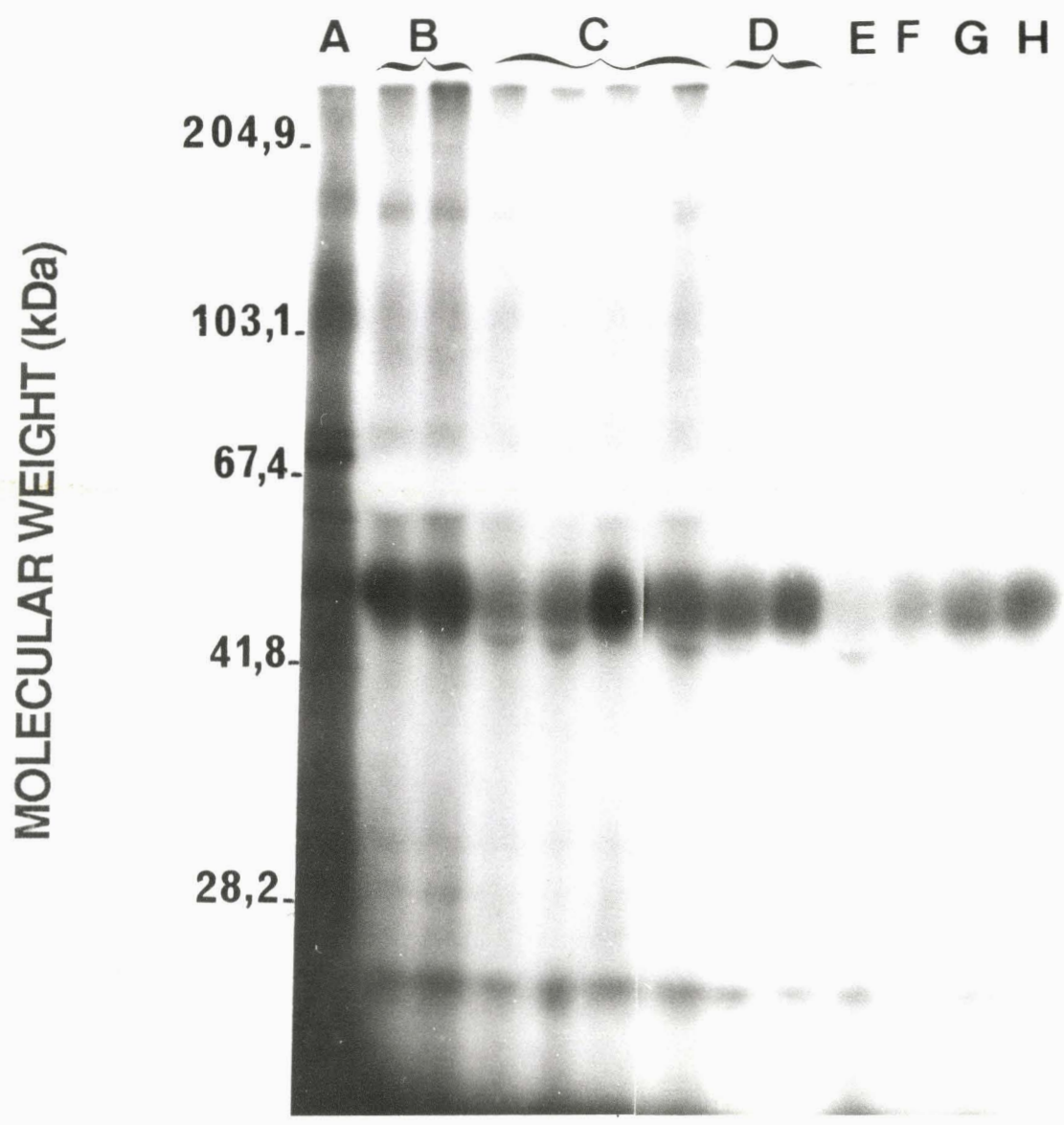


Fig.31

#### 6. 6. *Variations des populations leucocytaires pendant la phase aiguë.*

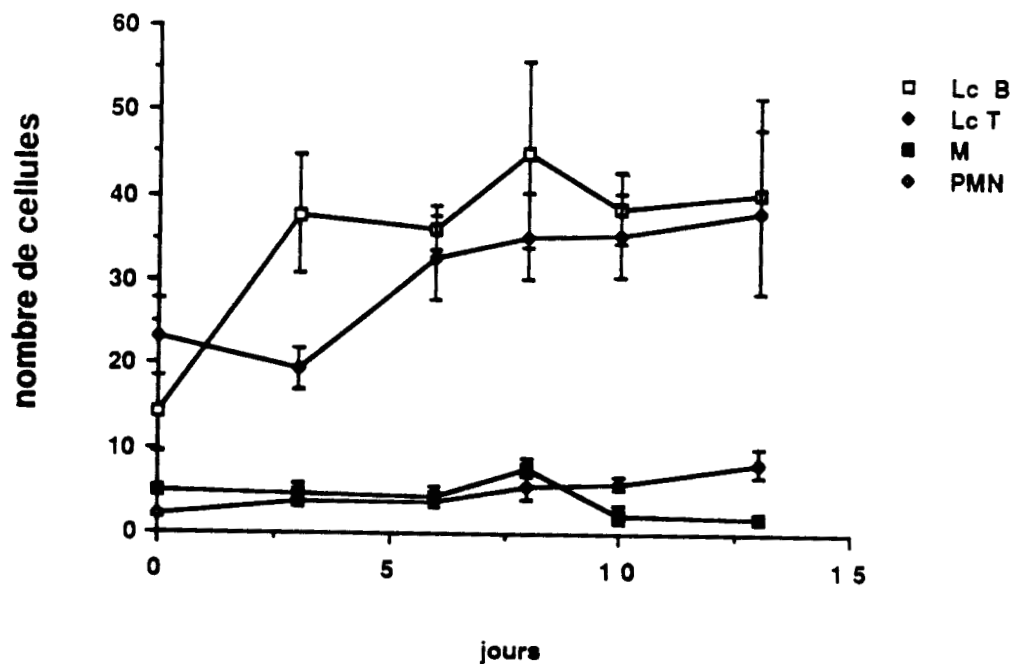
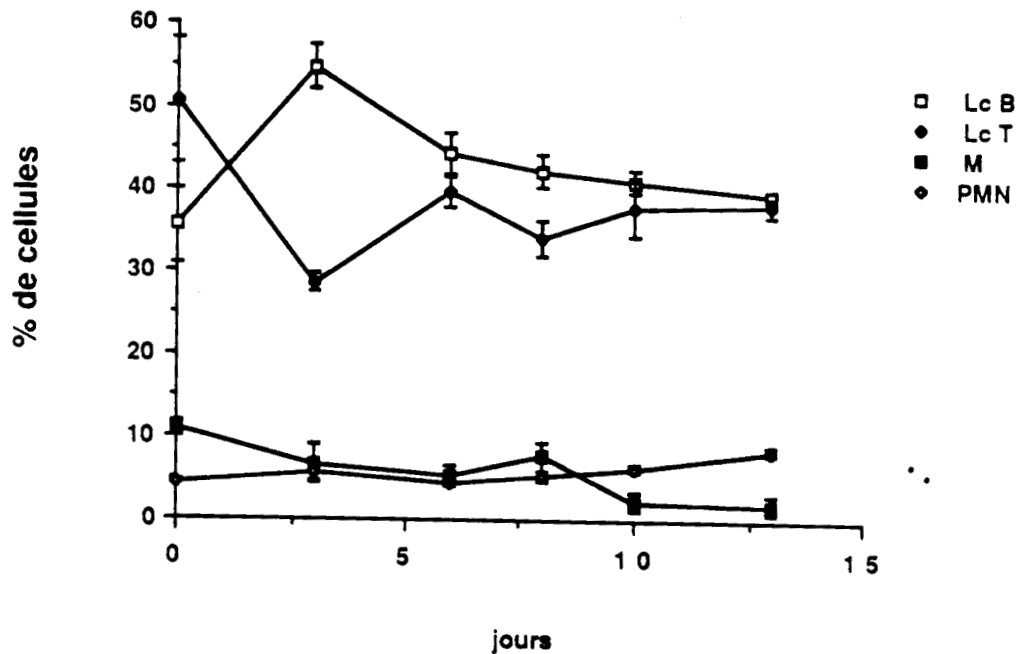
La mise en évidence de mécanismes d'ADCC vis-à-vis des lymphocytes T d'animaux en phase aiguë pouvait conduire à une diminution, lors de l'infection, de la population lymphocytaire T. Nous avons donc conduit une étude sur la dynamique des populations leucocytaires dans la rate de souris en phase aiguë. La cinétique a été étudiée en cytofluorimétrie en flux, les résultats présentés Fig. 32 constituent la moyenne de lots de 3 souris.

Dès le début de l'infection, on observe une très forte augmentation du nombre de lymphocytes B ainsi qu'une baisse du nombre de cellules T ce qui provoque une inversion du rapport lymphocytes T/B qui passe de 1,46 chez des souris saines à 0,51 après 3 jours d'infection. Cette lymphocytose B est suivie d'une augmentation du nombre de cellules T avec néanmoins persistance de l'inversion du rapport T/B (voisin de 0,95). Ces résultats confirment d'autres travaux montrant une lymphocytose avec inversion du rapport T/B (Minoprio et coll. 1986; Rottenberg et coll. 1989).

La population polynucléaire est modifiée plus faiblement dans la rate au cours de la phase aiguë; en effet, le pourcentage et le nombre absolu n'est que légèrement augmenté au cours de l'infection.

Le nombre de macrophages spléniques n'est pas modifié pendant la première semaine d'infection dans ces conditions, mais par contre, il est diminué sensiblement lors de la deuxième semaine.

Il n'y a pas de fortes variations individuelles dans le pourcentage des leucocytes dans la rate au cours de l'infection, pour une dose donnée de parasites injectés. Des résultats encore incomplets suggèrent qu'il puisse exister une forte variation des populations leucocytaires en fonction de la quantité de parasites injectés. Ainsi dans une autre expérience nous avons observé, chez des souris infectées par  $10^6$  trypomastigotes, une forte augmentation du pourcentage de macrophages au détriment des lymphocytes.



**Figure 32 : Evaluation des sous-populations leucocytaires pendant la phase aiguë.**

La cinétique d'évolution des leucocytes de souris en phase aiguë est réalisée entre 0 et 13 jours après l'infection par *T. cruzi*. Des lots de 3 souris BALB/c sont infectées par injection intrapéritonéale de trypanostigotes sanguicoles à différents jours afin que tous les animaux soient sacrifiés en même temps. Le pourcentage des différentes populations leucocytaires est évalué en cytofluorimétrie en flux : lymphocyte T (Lc T); lymphocyte B (Lc B); macrophages (M); polynucléaires neutrophiles (PMN).

Le pourcentage de cellules est obtenu directement par le cytofluorimètre. Le nombre absolu de cellules par souris est calculé par rapport au nombre total de leucocytes dans la rate obtenu par comptage.

Cette forte variation pourrait expliquer les travaux montrant une lymphopénie T très importante chez la souris (Hayes et Kierszenbaum 1981) ou chez l'homme (Hofflin et coll. 1987).

## **DISCUSSION**



## DISCUSSION

*Trypanosoma cruzi*, l'agent responsable de la maladie de Chagas, est un parasite dont le cycle passe par un stade intracellulaire obligatoire et dont la pénétration dans la cellule hôte nécessite une phase d'adhésion entre les membranes plasmiques du trypomastigote et de la cellule (Zenian et Kierszenbaum 1982). L'étude des phénomènes de reconnaissance entre le trypomastigote, forme infectante et la cellule hôte a conduit à la notion de récepteurs glycoprotéiques d'adhésion sur le parasite qui interagiraient lors de la phase d'attachement avec des ligands de la cellule de mammifère (Henriquez et coll. 1981).

Les travaux récents ont mis en évidence le rôle d'une glycoprotéine parasitaire de 83-85 kDa (Katzin et coll. 1983; Ouaisi et coll. 1984) et d'une glycoprotéine de la matrice extracellulaire : la fibronectine (Ouaisi et coll. 1984).

L'étude que nous avons réalisée montre que le trypomastigote peut interagir avec plusieurs autres ligands de la cellule de mammifère notamment le collagène mais aussi probablement le récepteur pour l'antigène des lymphocytes T, cellule décrite pour la première fois comme cellule hôte pour *T. cruzi*. Le mécanisme d'interaction parasite-cellule est donc un phénomène plus complexe que la simple notion : d'UN récepteur parasitaire, pour UN ligand cellulaire et ceci est d'une importance capitale pour l'établissement d'une stratégie vaccinale.

L'utilisation de collagène de type I qui se trouve dans la plupart des tissus conjonctifs nous a permis de montrer l'existence de sites de fixation spécifiques du collagène à la surface des trypomastigotes. Par chromatographie d'affinité sur une colonne de gélatine (forme dénaturée du collagène), nous avons purifié une glycoprotéine de 58/68 kDa qui possède une affinité importante pour le collagène purifié. Cette gp 58/68 n'est pas un fragment de clivage de la fibronectine puisqu'elle n'est pas reconnue par un sérum de lapin anti-fibronectine. En revanche elle est immunoprécipitée dans les produits

métaboliques du parasite par un sérum polyclonal de souris anti-gp 58/68. Ces différentes expériences démontrent que la gp 58/68 n'est pas une protéine d'hôte adsorbée mais qu'elle est bien d'origine parasitaire.

L'addition de sérums polyclonaux ou de l'Ac Mc 155D3, dirigés vis-à-vis de la gp 58/68 d'une part et de sérums polyclonaux ainsi que des anticorps monoclonaux dirigés contre le collagène de type I ou III d'autre part, permet d'inhiber *in vitro* l'infection des fibroblastes par les trypomastigotes. Ces travaux suggèrent que ces deux glycoprotéines, d'origine parasitaire pour la gp 58/68, et cellulaire pour le collagène, interviennent dans l'adhésion du trypomastigote aux fibroblastes.

Il faut noter que lors de la purification de la gp 85 kDa sur une colonne de fibronectine couplée à la Sépharose une protéine de 68 kDa en SDS PAGE en conditions réductrices a été obtenue (Ouaisi et coll. 1986b); De plus la gp 58/68 fixe aussi bien le collagène que la fibronectine; et enfin l'Ac Mc dirigé contre la gp 58/68 immunoprécipite à partir des antigènes de trypomastigotes marqués en surface à  $^{125}\text{I}$  et des produits métaboliques du parasite marqués à la méthionine  $^{35}\text{S}$ , à la fois la gp 58/68 mais aussi la gp 85. Tous ces résultats indiquent qu'il existe de grandes homologues structurales et fonctionnelles entre la molécule de 85 kDa et celle de 58/68 kDa.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations :

- Ces deux glycoprotéines proviennent d'une transcription différente d'un même gène.
- La gp 58/68 est une sous unité ou un produit de dégradation de la gp 85.
- Les deux glycoprotéines sont indépendantes mais possèdent au moins un épitope commun qui réagit avec la cellule hôte.

Jusqu'à présent nous n'avons pu confirmer aucune de ces hypothèses. En effet tous les anticorps dirigés vis-à-vis de ces récepteurs, réagissent avec la cupule glucidique de ces glycoprotéines. Il est donc impossible pour le moment d'immunoprécipiter les produits de traductions d'ARN de *T. cruzi* ou de cloner ces deux glycoprotéines.

Il apparait donc, jusqu'à présent que le trypomastigote possède deux récepteurs de surface pour deux glycoprotéines de la matrice extracellulaire qui peuvent être exprimés également à la surface des cellules sanguines.

Après avoir montré la capacité protectrice *in vitro* des anticorps dirigés vis-à-vis des récepteurs parasitaires, il était important de vérifier la validité de ces résultats *in vivo*.

Les différentes tentatives d'immunisation de souris et de rats par la gp 85 ou la gp 58/68, ainsi que le transfert passif de sérum anti-gp 85 ou de l'Ac Mc 155D3, n'ont pas permis d'obtenir des taux de protection très importants (Ouaissi et coll. 1989). Seul l'utilisation d'un peptide synthétique contenant la séquence RGDS conjugué à l'anatoxine tétanique, induit une diminution significative de la parasitémie et de la mortalité de l'ordre de 40%, chez des souris immunisées par ce peptide puis infectées par *T. cruzi* (Ouaissi et coll. 1986a).

Nous avons tenté de comprendre ces résultats assez négatifs en nous appuyant sur les études concernant la pathologie de la maladie de Chagas. en effet, le parasite peut développer des mécanismes d'échappement à la réponse immune de l'hôte.

Ainsi les trypomastigotes de *T. cruzi* sont capables de résister à la lyse par les anticorps spécifiques en présence du complément (Nogueira et coll. 1975). De plus les travaux de Joiner et coll. (1986), montrent que les trypomastigotes libèrent des substances qui inhibent la formation de la C<sub>3</sub> convertase de la voie classique et de la voie alterne du complément.

Sur cette base, en liaison avec le groupe du Pr. M.D. Kazatchkine de l'hôpital Broussais à Paris, nous avons montré que la gp 58/68 purifiée était capable d'inhiber la formation de la C<sub>3</sub> convertase de la voie alterne du complément d'une façon dose dépendante (Fischer et coll. 1988). Elle diffère pourtant des autres protéines de régulation humaines de type DAF (*Decay Accelerating Factor*) ou CR1, par le fait qu'elle n'a aucune action sur la voie classique du complément (Nicholson-Weller et coll. 1982). Cette activité de la gp 58/68 confirme que le trypomastigote est capable d'inhiber la voie alterne du

complément en diminuant la formation du complexe C<sub>3</sub>b-Bb (Joiner et coll. 1986). Elle reste néanmoins différente de l'activité de la gp 90 qui agit sur la voie alterne et classique du complément (Sher et coll. 1986).

Il semble donc que le récepteur pour le collagène, tout comme d'autres protéines parasitaires, participe aux mécanismes d'échappement du trypanostigote en inhibant la lyse dépendante du complément.

Par ailleurs, la maladie de Chagas est caractérisée par une pathologie de type auto-immune très marquée, avec atteinte des muscles lisses et striés et en particulier du muscle cardiaque. On observe également une destruction du système nerveux périphérique. De nombreux auteurs ont montré qu'il existe des antigènes parasitaires ayant des épitopes communs avec les cellules musculaires ou nerveuses (Khoury et coll. 1969).

Dans ce contexte, le Dr A. OuaiSSI a observé que l'Ac Mc 155D3 reconnaissait en immunoprécipitation un épitope glycanique de l'acétylcholinestérase. De plus cet anticorps monoclonal reconnaît, en immuno-fluorescence, les jonctions neuromusculaires de sujets sains. Ceci suggère l'existence d'épitopes communs entre les récepteurs parasitaires et l'acétylcholinestérase humaine (OuaiSSI et coll. 1988). Des anticorps dirigés contre l'acétylcholinestérase sont présents dans les sérums de patients en phase aiguë mais surtout en phase chronique. Du point de vue de la pathologie, la mise en évidence d'anticorps anti-idiotypes, et donc potentiellement dirigés vis-à-vis de l'acétylcholine chez les sujets atteints de cardiopathie, a une importance considérable. Cette réactivité antigénique croisée pourrait en effet expliquer en partie les destructions des jonctions neuromusculaires lors de la phase chronique de la maladie.

L'étude de l'activité de la gp 58/68 et de la réactivité croisée de la gp 85 avec l'acétylcholinestérase, nous montre que plusieurs activités peuvent être retrouvées pour une même molécule parasitaire. Ceci présente un avantage important pour le parasite qui doit faire face à de multiples agressions de la part du système immunitaire de l'hôte, mais pose des problèmes importants pour élaborer une stratégie vaccinale. Ainsi ces deux récepteurs parasitaires de 85 et de 58/68 kDa ne peuvent être utilisés directement, en tant que protéine vaccinale, à cause de leurs effets secondaires. A la lumière de ces travaux, la voie

d'approche actuelle serait de cloner ces molécules, de les séquencer et de déterminer les domaines intervenant dans l'adhésion. Ceci permettrait de synthétiser des peptides capables d'inhiber la pénétration de *T. cruzi* dans la cellule et induisant un minimum de réactions secondaires néfastes.

L'étude des zones d'interactions entre la gp 58/68 et le collagène n'a pas été réalisée. Néanmoins, en se basant en partie sur les travaux réalisés avec la fibronectine, nous pouvons émettre l'hypothèse que cette association est réalisée également via le peptide RGD. En effet, cette séquence est retrouvée sur la chaîne  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  du collagène et nous avons montré que le récepteur de 58/68 kDa fixait le peptide RGDS en test radio-immunologique. La fixation de ce peptide sur les formes vivantes de trypomastigote est d'ailleurs augmentée avec la maturation extracellulaire des parasites (Ouaissi et coll. 1988). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec l'Ac Mc 155D3 qui montrent que la quantité de récepteurs à la surface du parasite augmente avec sa maturation extracellulaire qui le rend plus infectant (Piras et coll. 1983). De plus les récepteurs des adhésiotopes sont composés de deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dont la chaîne  $\beta$ , tout comme la gp 58/68 a une structure compacte stabilisée par des ponts disulfures intracaténaux qui lui confèrent un poids moléculaire apparent en SDS PAGE plus élevé en condition réduite (Ruoslahti et Pierschbacher 1987). Le clonage du récepteur parasitaire de 58/68 kDa devrait nous renseigner sur les homologies possibles avec la famille des intégrines.

Ces différents résultats suggèrent un nouveau processus d'adhésion de *T. cruzi* à la cellule hôte. L'interaction entre le trypomastigote et le fibroblaste se ferait par l'intermédiaire du complexe moléculaire gp 85 et gp 58/68 du parasite qui reconnaîtrait le peptide RGDS présent dans les glycoprotéines de la matrice extracellulaire, fibronectine et collagène.

Deux mécanismes peuvent être proposés pour le rôle respectif de ces glycoprotéines dans l'adhésion du parasite à la cellule cible : soit la fibronectine et le collagène agissent de façon indépendante, c'est à dire que le trypomastigote se fixe à la fibronectine ou au collagène présent sur la cellule; soit les deux glycoprotéines agissent séquentiellement dans l'attachement du parasite; dans ce cas, le trypomastigote reconnaîtrait en premier le collagène qui est la molécule la plus accessible de la matrice extracellulaire, le rôle de la fibronectine serait alors de consolider cette adhésion. Ce type d'interaction séquentielle a été également proposé dans le modèle de *Plasmodium knowlesi* (Bannister et coll. 1977). L'intervention du peptide RGDS dans la reconnaissance entre le parasite et la cellule semble être un phénomène général puisqu'il se retrouve dans tout le règne animal notamment dans le cas des *Trichomonas* et de *Staphylococcus aureus* voire dans le cas des *Leishmanies* ce qui reste néanmoins très discuté (Russell 1990).

Dans l'étude des mécanismes d'interaction parasite-cellule, il était intéressant de savoir si la fibronectine ou le collagène intervenait directement dans la pénétration du parasite dans la cellule hôte ou si ces glycoprotéines n'étaient que des points d'ancrage à la surface cellulaire.

Afin d'étudier plus en détail ces phénomènes d'adhésion liés à la fibronectine et au collagène, nous avons choisi de travailler sur le lymphocyte. En effet, cette cellule considérée dans la littérature comme non infectable par le parasite, ne synthétise pas de fibronectine ni de collagène à la différence du fibroblaste mais elle est susceptible de les fixer par ses récepteurs VLA (*Very Late Activation antigen*).

Lors des premières expériences, nous avons observé que le lymphocyte T pouvait être infecté *in vitro* par *T. cruzi*, alors que le lymphocyte B par contre n'est jamais infecté.

Cette observation, tout à fait originale, prenait toute son importance quand on sait que la phase aiguë de la maladie est caractérisée par une immunosuppression touchant principalement les cellules lymphoïdes. De plus une forte diminution du nombre de lymphocytes T, liée le plus souvent à une augmentation du nombre de cellules B a été

décrite (Hayes et Kierszenbaum 1981). Il faut souligner également le rôle central dans la réponse immune du lymphocyte T et le fait qu'une partie de ces cellules puisse être infectée et détruite par le parasite, pouvait avoir des conséquences très importantes.

De nombreuses expériences durent être entreprises pour démontrer clairement la réalité de cette infection. La principale difficulté que nous avons à surmonter était le faible taux d'infection des lymphocytes (inférieur à 5%), qui est généralement dans la marge d'erreur de nombreux appareils de mesure ou des méthodes de purification des cellules sanguines.

Cette infection a été observée en microscopie électronique et en microscopie photonique après cyto centrifugation des cellules et caractérisation de la nature lymphocytaire T par des anticorps monoclonaux révélés en immunopéroxydase indirecte. Ces différentes observations ont été confirmées par un test d'incorporation d'hypoxanthine tritiée lors de la multiplication intracellulaire des amastigotes, et par hybridation du DNA parasitaire contenu dans les cellules infectées par une sonde oligonucléotidique.

*T. cruzi* accomplit son cycle complet de développement dans le lymphocyte T en 96 à 120 h; au cours desquelles le trypomastigote pénètre dans la cellule, s'y transforme en amastigote qui se multiplie par division binaire puis se différencie à nouveau en trypomastigotes libérés par destruction de la cellule. Les parasites ainsi libérés sont infectieux pour d'autres types cellulaires. Même si le taux d'infection *in vitro* semble faible, il est du même ordre que celui obtenu par Mosca et coll. (1986) sur l'infection *in vitro* des polynucléaires neutrophiles.

Sur ces critères, le lymphocyte T peut donc être considéré comme une cellule hôte pour *T. cruzi in vitro*, à la différence du lymphocyte B qui n'est pas infecté ou très peu et dans lequel le parasite, s'il pénètre, ne se multiplie pas. Ceci confirme les travaux de Chao et coll. (1984) qui décrivent une infection d'un myelome B de l'ordre de 0,75% après 72 h de culture sans multiplication intracellulaire du parasite (dans leurs conditions, plus de 7% des lymphomes T sont infectés avec une forte charge parasitaire par cellule).

L'infection des lymphocytes T *in vivo* a été étudiée sur des souris BALB/c en phase aiguë de la maladie. L'examen en microscopie optique, après coloration des lymphocytes T purifiés à partir de la rate, révèle la présence *in vivo* de lymphocytes infectés. Le marquage des cellules en immunopéroxydase avec l'anticorps monoclonal correspondant, nous a permis de différencier les lymphocytes T et B des autres cellules spléniques. Cette observation a été confirmée par hybridation de l'ADN parasite contenu dans les cellules T purifiées de la rate. L'évaluation *in vivo* de l'infection des lymphocytes T montre que celle-ci est fonction de la parasitémie, et qu'elle n'est pas un phénomène marginal. En effet, le taux de lymphocytes infectés est comparable à celui des polynucléaires neutrophiles, voire des cellules hôtes préférentielles du parasite que sont les macrophages.

L'analyse des lymphocytes ganglionnaires et des lymphocytes circulants a permis de détecter également des cellules infectées lors de la phase aiguë. Le taux d'infection y est pourtant 10 fois plus faible que dans la rate. Cette différence démontre que la rate est le site privilégié des cellules infectées. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène : soit le contact étroit entre le parasite et les cellules y favorise l'infection, soit les cellules infectées y sont captées pour être détruites. La première hypothèse nous semble la plus vraisemblable car la recirculation lymphocytaire expliquerait la présence de lymphocytes infectés dans les ganglions où le parasite n'est pas résident. Ces résultats montrent donc que le lymphocyte peut héberger le parasite et être en partie responsable de sa dissémination dans l'organisme.

L'infection sélective *in vitro* de différentes sous-populations lymphocytaires T, montre que le parasite infecte aussi bien les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (helper) que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> (cytotoxiques ou suppresseurs). Il n'existe donc pas une sous-population lymphocytaire T infectée préférentiellement. Par contre les expériences d'infection des lymphocytes après leur activation par différents mitogènes, nous permettent de penser que le degré d'activation de la cellule favorise son infection par le parasite. Cette hypothèse est étayée par la susceptibilité très importante à l'infection *in vitro* par les trypanomastigotes,



des lymphocytes T purifiés d'animaux en phase aiguë par rapport aux lymphocytes d'animaux sains. En effet les lymphocytes de la phase aiguë sont au stade blastique (c'est-à-dire très activés) alors que la majorité des lymphocytes d'animaux sains sont quiescents.

Pour étudier la pénétration du parasite dans le lymphocyte T, nous avons d'abord vérifié si les mécanismes observés avec le fibroblaste et le macrophage s'appliquaient dans le cas du lymphocyte. Or nous avons observé que :

- Il existe des sites de fixation spécifiques pour les antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes T.
- L'addition de fibronectine ou de collagène au milieu de culture favorise l'adhésion des trypanostigotes sur les cellules mais sans augmenter leur taux d'infection après 24 h.
- Le lymphocyte T est infecté en l'absence de ces deux glycoprotéines.
- L'anticorps monoclonal dirigé contre les récepteurs parasitaires de 85 et de 58/68 kDa ainsi que l'Ac Mc anti-fibronectine ne modifient pas sensiblement le taux d'infection *in vitro* des lymphocytes par *T. cruzi*.

Ainsi le modèle d'infection du lymphocyte semble tout à fait original. Il montre clairement que la fibronectine et le collagène exogènes peuvent jouer un rôle dans l'adhésion du parasite à la cellule mais que ces deux glycoprotéines n'interviennent pas dans le processus de pénétration dans le lymphocyte. De plus, le fait que le trypanostigote puisse adhérer au lymphocyte B sans l'infecter confirme les travaux de Piras et coll. (1983) qui suggèrent que l'adhésion et la pénétration sont deux phases distinctes de l'infection.

L'utilisation de différents anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs de surface du lymphocyte nous a permis d'observer en microscopie optique et en hybridation de l'ADN parasite que l'Ac Mc anti-CD3 ainsi que l'Ac Mc anti-HLA-DR, inhibent la pénétration du parasite dans les lymphocytes. De même l'Ac Mc anti CD8 inhibe partiellement l'infection du clone T humain. Ainsi il apparaît que les Ac Mc dirigés vis-à-

vis d'épitopes proches du récepteur T du lymphocyte sont capables de diminuer la pénétration du trypomastigote dans la cellule alors que les Ac Mc dirigés vis-à-vis de marqueurs non liés au récepteur T n'ont aucun effet. L'utilisation d'Ac Mc dirigés contre les différentes sous unités du récepteur T devrait apporter de nouvelles informations.

Le très faible nombre de parasites par cellule observé lors des numérations de lymphocytes infectés *in vivo* a été corroboré par le test d'hybridation de l'ADN parasite qui a permis d'estimer entre 2 et 4 le nombre de parasites par cellule, ce qui est extrêmement faible comparativement au nombre de parasites hébergés *in vitro* qui peut atteindre plus de 30 amastigotes par cellule. Ces observations suggéraient l'existence d'un mécanisme de destruction des lymphocytes infectés.

Par cytofluorimétrie en flux nous avons détecté des antigènes parasites à la surface de lymphocytes T infectés *in vitro* (Velge et coll. 1989). Afin de nous rapprocher le plus possible de la réalité du phénomène, des études ont été poursuivies sur des cellules *ex vivo*. Ainsi par la même technique et en double marquage, nous avons observé la présence d'antigènes parasites à la surface des lymphocytes T et ceci uniquement chez les animaux en phase aiguë (on ne détecte pas de cellules infectées lors de la phase chronique). Les anticorps dirigés contre ces antigènes se retrouvent à la fois dans les sérums humains et murins, qu'ils soient de phase aiguë ou chronique. Ces antigènes semblent spécifiques de *T. cruzi* puisqu'ils ne sont pas reconnus par des sérums de patients infectés par d'autres protozoaires ou helminthes.

Les résultats obtenus en cytofluorimétrie et les tests de fixations des antigènes parasites marqués sur des lymphomes, suggèrent que ces antigènes proviennent de deux origines. Une minorité proviendrait de externalisation de protéines internes, alors que l'adsorption de protéines circulantes (produit d'excrétion-sécrétion du parasite ou provenant des cellules détruites) expliquerait la présence de ces antigènes parasites à la surface des cellules non infectées.

Ces antigènes parasitaires détectés à la surface des lymphocytes pouvaient être la cible d'une réponse cytotoxique et donc être responsable de la lyse de ces cellules. Aucune cytotoxicité liée aux lymphocytes T cytotoxiques ou aux cellules "Natural Killer", n'a été mise en évidence. Par contre nous avons observé une cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante assez importante et spécifique des lymphocytes T de la phase aiguë que cela soit en système homologue ou en système hétérologue.

La présence d'antigènes parasitaires à la surface de lymphocytes a été rapportée dans le cas de *Theileria annulata* (Pearson et coll. 1979) qui infecte également les lymphocytes T. Dans le cas *T. cruzi*, l'expression d'antigènes parasitaires à la surface de cellules infectées et non infectées a déjà été décrite avec d'autres types cellulaires infectées *in vitro* comme les fibroblastes ou les cellules cardiaques (Ribeiro dos Santos et Hudson 1980; Williams et coll. 1985). De même, le fait que les cellules qui expriment ces antigènes puissent être détruites par le système immunitaire a été décrit (Araujo 1985). L'originalité des observations rapportées dans ce travail est double. Premièrement elles reposent sur la démonstration de la présence d'antigènes parasitaires à la surface de cellules prélevées *in vivo* et deuxièmement elles concernent les lymphocytes T, cellules jouant un rôle fondamental dans la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte.

La destruction par le système immunitaire des cellules infectées est souvent un mécanisme de protection par lequel l'hôte élimine les parasites intracellulaires. Dans une optique finaliste, on peut considérer que ce mécanisme sert le parasite quand le système immunitaire détruit également ses propres cellules non infectées. Cela semble être le cas lors de la phase aiguë de la maladie de Chagas où 2% des lymphocytes sont infectés *in vivo* alors que 20 à 40% des lymphocytes expriment des antigènes parasitaires à leurs surfaces et donc sont susceptibles d'être détruits.

Actuellement nous ne savons pas le rôle ni l'importance *in vivo* du mécanisme d'ADCC que nous avons mis en évidence mais il pourrait participer à la genèse des processus auto-immuns observés lors de la maladie et à l'inversion du rapport lymphocytes T/B observé lors de la phase aiguë.

Il est clair que toute la pathologie de la maladie de Chagas ne peut être simplement expliquée sur la base d'une infection et d'une destruction des lymphocytes T par le trypomastigote. Néanmoins, cette infection pourrait participer à la très forte immunosuppression observée lors de la phase aiguë de la maladie. Il est d'ailleurs surprenant qu'aucun travail n'ait été réalisé sur l'influence de l'infection des cellules sanguines sur la dérégulation de la réponse immune. Si de nombreux travaux décrivent l'immunosuppression qui permet l'établissement du parasite dans l'organisme, très peu en expliquent l'origine. Certains auteurs ont montré l'existence de substances non parasitaires, mais provenant des cellules mononucléées de la rate d'animaux en phase aiguë, susceptibles de provoquer cette immunosuppression (Serrano et O'Daly 1987). D'autre part, la coculture pendant 48 à 96 h de trypomastigotes de *T. cruzi* avec des cellules mononucléées est capable d'inhiber leur prolifération après activation ainsi que l'expression du récepteur à l'IL2 à leurs surfaces (Beltz et coll. 1990). Ces auteurs suggèrent que les parasites peuvent induire directement les phénomènes observés. Néanmoins 48 à 96 h est le temps nécessaire au trypomastigote pour infecter notablement les lymphocytes qui pourraient libérer de façon anarchique des substances suppressives, substances qui ne seraient pas d'origine parasitaire mais induites par la coculture des parasites. Ainsi les cellules infectées pourraient inhiber les fonctions effectrices des cellules non infectées. Cette hypothèse est actuellement à l'étude en collaboration avec le Dr J. C. Ameisen.

En conclusion, ces travaux font apparaître la complexité des phénomènes d'interaction entre le trypanostigote, forme infectante, et les différentes cellules hôtes. Le parasite possède deux récepteurs de 85 et de 58/68 kDa qui reconnaissent deux ligands cellulaires, le collagène et la fibronectine présents à la surface des fibroblastes et de nombreuses autres cellules. Dans certains cas néanmoins, le trypanostigote utilise des sites d'adhésion beaucoup plus spécifiques, comme le récepteur T du lymphocyte. Mais dans ce cas, nous ne savons pas encore la nature du récepteur parasite qui semble toutefois différent de la gp 85 et de la gp 58/68.

La stratégie vaccinale visant à produire des anticorps dirigés vis-à-vis des récepteurs parasites d'adhésion devra tenir compte de ces observations. Il est clair qu'à la multiplicité des récepteurs parasites devra être mis en place un vaccin multiprotéique. De plus, le fait que ces récepteurs possèdent également des fonctions permettant au parasite d'échapper à la réponse immune, conduira certainement à utiliser différents peptides synthétiques de ces récepteurs. Ainsi, en 20 années, la notion de vaccin est passée de l'utilisation d'un extrait brut de parasite, à des molécules purifiées, pour aboutir à l'utilisation de domaines moléculaires très précis.

Le résultat le plus original reste la démonstration que le lymphocyte T soit une cellule hôte pour *T. cruzi* et permette sa dissémination dans l'organisme. Le fait qu'un pourcentage relativement faible de cellules soit infecté *in vivo* ne diminue en rien la portée de cette observation qui modifie profondément l'approche que l'on peut avoir de la pathologie de la maladie. En effet, d'autres infections, notamment virales, nous montrent clairement qu'un faible pourcentage de lymphocytes T infectés peut modifier profondément le système immunitaire. L'infection et la destruction des lymphocytes T lors de la phase aiguë de la maladie pourraient jouer un rôle crucial dans l'immunopathologie de la maladie de Chagas, notamment dans l'établissement de l'immunosuppression caractéristique de cette phase, en modifiant la synthèse des interleukines soit directement soit indirectement comme cela a été suggéré dans le cas de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine. Ainsi l'étude des conséquences de l'infection des leucocytes sur la réponse immune pourrait être le nouveau défi à relever dans la maladie de Chagas.

## **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Obtention des différents stades de *T. cruzi*.

#### 1. 1. Souches parasitaires utilisées.

Deux souches de *T. cruzi* ont été utilisées dans ce travail.

- La souche Tehuantepec, qui a été isolée en 1938 par Brumpt et qui infecte plus particulièrement les cellules musculaires (Darman 1941).
- La souche Y qui infecte préférentiellement les cellules macrophagiques.

#### 1. 2. Obtention des parasites *in vitro*.

Les épimastigotes sont obtenus par repiquage bi-hebdomadaire à 28°C en milieu G.L.S.H. contenant 1 g/l de glucose, 4,5 g/l de lactalbumine hydrolysée, 15% d'extrait d'hémoglobine de boeuf et 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Boehringer, Mannheim), préalablement inactivé à 56°C pendant 30 min. (Jadin et Le Ray 1969).

La culture des trypomastigotes est réalisée sur cellules fibroblastiques (3T3 FR). Ces fibroblastes sont entretenus sur flacon de culture de 75 ou de 150 cm<sup>2</sup>, incubés à 37°C en étuve à 5% en CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé est le RPMI 1640 (Gibco, Laboratories Grand Island, N. Y.) additionné de 200 UI de pénicilline/ml, 50 µg/ml de streptomycine et 5% de SVF. Les fibroblastes sont repiqués tous les 3 jours après traitement au versène-trypsine. 10<sup>6</sup> trypomastigotes environ sont inoculés à des cultures cellulaires presque confluentes. Après 3 à 4 jours de culture apparaissent les trypomastigotes dans le milieu de culture, à partir desquels de nouvelles infections sont réalisées (Santiago et coll. 1981).

Une première centrifugation des surnageants de culture à 300xg pendant 5 min. permet d'éliminer les débris cellulaires. Une deuxième centrifugation du milieu de culture à 1000xg pendant 10 min. permet de recueillir les trypomastigotes dans le culot.

### *1. 3. Cycle in vivo du parasite.*

La forme sanguicole de *T. cruzi* est entretenue et stabilisée par passage tous les 12 jours chez la souris BALB/c mâle. Les trypomastigotes sont obtenus par ponction intracardiaque en présence d'anti-coagulant (héparine à la dose de 80 UI/ml) et dilué en HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). 1 ml de cette solution contenant  $1 \times 10^5$  trypomastigotes est inoculé par voie intrapéritonéale et par souris. La parasitémie est déterminée dans le sang selon la méthode de Riveras-Vanderpas et coll. (1983).

## **2. Obtention des lymphocytes.**

### *2. 1. Milieu de culture des lymphocytes.*

Pour toutes les cultures de lymphocytes le milieu R10 est utilisé: RPMI 1640 (Flow laboratories) supplémenté de glutamine (Merck) 2mM, de pyruvate de sodium (Gibco) 1mM, d'HEPES (Sigma) 10mM, d'antibiotiques (1000 U/ml de péniciline, 100  $\mu$ g /ml de streptomycine) et de 10% de SVF.

### *2. 2. Purification des lymphocytes.*

La rate ou les ganglions de souris sont prélevés et dilacérés en HBSS. Les cellules adhérentes sont éliminées par incubation de 1 h à 37°C en boîte de culture (Corning) puis les érythrocytes sont détruits par un choc osmotique (NaCl 0,2%) pendant 40 secondes. Les lymphocytes B sont enfin retenus par un contact de 2 h avec de la laine de nylon (Du Pont de Nemours).



Pour obtenir des lymphocytes T humains, le sang périphérique de donneurs sains est utilisé. Les cellules mononuclées humaines sont purifiées sur gradient de Ficoll-Paque (Pharmacia, Upsalla, Suède) 45 min. à 800xg. Après lavages, les lymphocytes T humains sont recueillis après un passage sur une colonne de laine de nylon et de billes de verres recouvertes d'immunoglobulines et d'anti IgG humaine (Pancre et coll. 1986).

Les différentes populations enrichies sont contrôlées au cytofluorimètre (modèle 50H, Ortho instruments) avec les anticorps monoclonaux (Ac Mc) anti-CD3 (Ortho Diagnostic Systems) ou anti-Thy 1.2 (Immunotech).

### 3. Marquages radioactifs.

#### 3. 1. Marquage à l'iodogène des antigènes de surface des trypomastigotes.

Le marquage à l'iode 125 des protéines de surface de *T. cruzi* est réalisée sur  $4 \times 10^8$  trypomastigotes suivant les travaux de Markwell et Fo (1978) modifié par Camargo et coll. (1982) en présence de 11.1 MBq de Na  $^{125}\text{I}$  et 200  $\mu\text{g}$  d'iodogène pendant 15 min. à température ambiante. Les parasites sont ensuite lysés par un détergent non ionique (NP 40 1%, aprotinine 100 UI/ml, Tris-HCl 10 mM, pH 6,8) à 4°C et l'iode libre est éliminé par passage du lysat sur une colonne PD 10 (Pharmacia, Suède).

Les protéines purifiées sont marquées à l'iode par la même technique sauf le collagène qui est marqué par la méthode à la chloramine T (Mc Conahey et Dixon 1966).

#### 3. 2. Marquage métabolique des protéines de *T. cruzi* par la méthionine $^{35}\text{S}$ .

$1 \times 10^8$  trypomastigotes sont lavés en RPMI sans méthionine et "mis à jeun" dans ce milieu pendant 30 min. à 37°C. Après centrifugation à 1000 x g, 10 min., le culot de parasites est incubé 1 h en présence de 7,4 MBq de méthionine  $^{35}\text{S}$  en RPMI sans méthionine. La réaction est arrêtée par le même tampon de lyse que décrit précédemment et les parasites sont détruits sous agitation pendant la nuit.

### 3. 3. *Marquage de la sonde oligonucléotidique par le $^{32}\text{P}$ .*

15 pmoles d'oligonucléotides sont incubées 30 min. à 37°C en tampon kinase (Tris HCl 250 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  40 mM, dithiothréitol 20 mM) en présence de 10 UI de polynucléotide kinase (Boehringer, mannheim) et de 1,85 MBq de  $\delta^{32}\text{P}$  ATP. La réaction est arrêtée par de l'EDTA 20 mM. La qualité du marquage est vérifiée en gel 20% d'acrylamide.

## 4. Purification des récepteurs parasitaires.

### 4. 1. *Purification sur colonne d'Ultrogel gélatine.*

Une colonne d'Ultrogel gélatine (IBF France) est stabilisée en PBS 150 mM par 20 fois le volume de gel.  $2 \times 10^8$  trypomastigotes marqués à l'iode et lysés sont mis en contact avec 4 ml de gel en "batch" et laissé en contact une nuit à 4°C sous faible agitation. une colonne est ensuite réalisée et le matériel non adsorbé est éliminé par lavages avec du PBS froid (20 fois le volume de gel). Le matériel adsorbé est élué par l'urée 4 M en PBS 75 mM à 4°C sous flux constant de 0,2 ml/min. (environ 15 ml). Des fractions de 1ml sont recueillies et la radioactivité est mesurée par un compteur gamma (LKB). Les protéines éluées sont dialysées 48 h à 4°C, lyophilisées et analysées en gel de poly-acrylamide (SDS-PAGE).

### 4. 2. *Purification sur colonne D'Ultrogel WGA.*

Les différentes étapes concernant l'équilibration de la colonne d'affinité sur lectine WGA (Wheat Germ Agglutinine), la mise en contact du lysat de trypomastigotes (marqué ou non à  $^{125}\text{I}$ ) et le lavage du matériel non fixé, se font suivant le même protocole déjà décrit pour la colonne d'Ultrogel gélatine. L'éluion dans un but analytique se fait en

colonne, par la N-acétyl-D-glucosamine 0,2 M en PBS 75mM sous flux constant de 0,2 ml/min à 4°C. Le profil d'élution est réalisé sur des échantillons de 1 ml. L'élution dans un but préparatif se fait en "batch" par 1 volume de N-acétyl-D-glucosamine 0,2 M sous agitation ceci trois fois. Les éluions sont rassemblées et mises en dialyse-concentration sous vide à 4°C grâce au système "microprodicon" (Bioblock). La quantité de protéines éluées est évaluée par la méthode de Lowry adaptée en micro méthode (Lowry et coll. 1951).

## **5. Préparation et analyse des anticorps polyclonaux et monoclonaux.**

### *5. 1. Préparation des sérums polyclonaux.*

Des souris BALB/c sont immunisées par voie sous cutanée par 50 µg de protéines dans 200 µl de solution saline et de solution d'adjuvant complet de Freund (Difco laboratories Detroit Michigan). Les injections sont répétées 4 fois en adjuvant incomplet de Freund, à 15 jours d'intervalle.

### *5. 2. Préparation des anticorps monoclonaux.*

Les anticorps monoclonaux ont été produits suivant la technique issue des travaux de Kohler et Milstein (1975). La lignée myélomateuse de souris utilisée est la SP<sub>2</sub>O.

### *5. 3. Mesure de l'activité des anticorps.*

Les sérums des animaux immunisés ainsi que les surnageants de culture des cellules hybrides sont testés par trois méthodes:

- un test immunoenzymatique (ELISA), comme décrit Voller et De Savigny (1981), sur un sonicat de trypomastigotes à 5 µg/ml ou sur un extrait de protéines précipitées à l'éthanol à 70% à -20°C (10 µg/ml) ou sur les protéines purifiées (1 µg/ml).

- Un test d'immunofluorescence indirecte sur trypomastigotes fixés sur lame par la glutaraldéhyde 0,25% (Ouaissi et coll. 1985).
- Un test d'immunofluorescence indirecte sur trypomastigotes vivants d'après la méthode décrite par Krettli et Brener (1982).

## **6. Analyse immunochimique des antigènes parasitaires.**

### *6. 1. Analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide.*

Les différentes protéines de *T. cruzi* sont séparées sur gel 10% de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS PAGE) dans les conditions décrites par Laemmli (1970). Un gel de concentration de 5% en polyacrylamide est utilisé. Avant migration, les échantillons sont repris dans le tampon d'échantillon (Tris-HCl 62,5 mM, SDS 3%, saccharose 10%, pH 6,8) et pour travailler en conditions réductrices, 15,43 mg/ml de di-thio-treitol est ajouté au tampon extemporanément. Les échantillons sont portés deux fois 2 min. à 100°C puis déposés sur le gel. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon d'électrophorèse (glycine 192 mM, SDS 0,1%, Tris-HCl 25 mM ph 8,3) à température ambiante, sous un courant de 6 mA.

A partir de cette technique de séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire apparent, différentes techniques de révélation des protéines peuvent être appliquées.

### 6. 1. 1. Coloration au nitrate d'argent.

Après migration, le gel d'acrylamide est préfixé 30 min. par un mélange méthanol, eau, acide acétique (5/4/1) puis par un mélange aqueux contenant 5% de méthanol et 7% d'acide acétique. La fixation est assurée par la glutaraldehyde 10%. Après un rincage abondant en eau, le gel est incubé 30 min. dans du dithiothreitol à 5  $\mu$ g/ml puis 30 min. dans le nitrate d'argent 0,1% (p/v). Les protéines sont révélées par une solution de formaldéhyde 0,05%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3%. La révélation est arrêtée par 25 ml d'acide citrique 2,3 M (Morrissey 1981).

### 6. 1. 2. Immunoprécipitation des antigènes de *T. cruzi*.

Le surnageant de lyse des parasites marqués est préadsorbé 30 min. à 4°C sur 10 mg de protéine A Sépharose (Pharmacia), préalablement lavée et gonflée dans le tampon d'immunoprécipitation (Tris-HCl 10 mM pH 8,6, NaCl 150 mM, E.D.T.A. 2 mM, N.P 40 0,5% (v/v) et 100 UI/ml d'aprotinine). Après centrifugation à 100 x g, 10<sup>6</sup> c.p.m. sont incubés avec l'anticorps correspondant dans 500  $\mu$ l de tampon d'immunoprécipitation sous agitation 2 h à 4°C, suivi d'un anti-anticorps incubé également 2 h à 4°C. Les immuns complexes formés sont isolés sur protéine A Sépharose (Pharmacia) pendant une nuit à 4°C. Après lavages les antigènes sont élués par le tampon d'échantillon à 100°C et les antigènes marqués sont analysés en SDS PAGE. Après migration, les gels sont fixés par un mélange eau, acide acétique, méthanol (5, 4, 1) et séchés sous vide. Les produits marqués sont révélés par un film Kodak Xo-mat.

## 7. Analyse des molécules impliquées dans l'interaction parasite-cellule.

### 7. 1. Fixation du collagène sur les récepteurs parasitaires purifiés.

Les protéines parasitaires purifiées sont fixées sur une plaque de 96 trous (Falcon 3911) à raison de 8 g/ml dans 100 l de PBS pendant une nuit à 4°C. Les puits sont ensuite saturés par du PBS BSA 2%, 1 h à 20°C, puis lavés. 140 000 c.p.m. de collagène de type I radio-marqué (29 500 c.p.m./ g) sont ajoutés et incubés 3 h à 37°C. Après trois lavages en PBS-BSA 0,1% et deux en PBS-Tween 20 0,3%, les cupules sont découpées et la radioactivité est mesurée directement dans un compteur gamma (LKB).

### 7. 2. Fixation du collagène marqué sur les trypomastigotes.

Une suspension de  $10^6$  trypomastigotes dans 100 l de RPMI sont incubés avec des concentrations croissantes de collagène de type I marqué à  $^{125}\text{I}$  (type III d'après Sigma provenant de la peau, type VIII provenant de placenta humain), ceci en présence ou non de 100 fois la quantité de collagène froid. Après 1 h à 4°C le mélange est appliqué sur du sucrose à 20% en RPMI et centrifugé à 3000 x g pendant 20 min. à 4°C. La radioactivité présente dans le culot est déterminée, et le pourcentage de fixation spécifique du collagène est calculé en soustrayant de la fixation totale, la fixation obtenue en présence de collagène froid.

### 7. 3. Fixation des antigènes parasitaires sur les lymphocytes.

Les trypomastigotes ( $4 \times 10^8$ ) sont marqués par l' $^{125}\text{I}$  selon la technique à l'iodogène puis lysés par 0,4 ml de dodecyl  $\beta$ -D-maltoside 0,05% (Boehringer) contenant 1mM de PMSF (phenyl methyl sulfonyl fluoride), 1 mM d'EDTA, 0,1 mM de TPCK, TLCK. Le détergent est éliminé par passage sur 1 ml d'Extracti gel D (Pierce chemical Co., Rockford). Différentes dilutions de lymphome T Jurkat ( $0,5 \times 10^5$  -  $10 \times 10^5$ ) sont lavées en

milieu sans SVF, puis incubées 1 h à 4°C avec des doses croissantes de protéines parasitaires radio-marquées ( $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^5$  c.p.m.) dans un volume final de 300  $\mu$ l d'HBSS. Les cellules sont ensuite lavées trois fois en RPMI, transférées dans un nouveau tube et la radioactivité fixée est appréciée par comptage au compteur gamma.

Pour l'inhibition de fixation des antigènes parasitaires sur les lymphomes, des protéines froides, des parasites non marqués, de la BSA ou des protéines du SVF sont traités comme les protéines marquées c'est-à-dire qu'elles sont incubées en présence de dodecyl  $\beta$ -D-maltoside et passées sur une colonne PD10 et une colonne d'Extracti gel D. Puis  $1 \times 10^6$  cellules sont incubées 15 min. à 4°C, avec des concentrations croissantes des extraits protéiques non marqués dans un volume final de 200  $\mu$ l puis 100 000 cpm d'antigènes parasitaires radio-marqués sont ajoutés. Après 1 h à 4°C les cellules sont lavées trois fois puis transférées dans de nouveaux tubes et comptées.

#### *7. 4. Fixation des antigènes parasitaires sur les lymphocytes en présence de fibronectine.*

Le milieu Ultrosor ne contient pas de collagène. Il a été épuisé en fibronectine par passage sur une colonne d'Ultrogel gélatine. L'absence de fibronectine a été ensuite vérifiée en test ELISA avec un sérum polyclonal de lapin anti-fibronectine.

Les trypomastigotes sont marqués en surface par l'iode 125, lysés par le D B M puis passés sur une colonne d'Extracti gel D comme décrit ci dessus. Les cellules MOLT4 ( $1 \times 10^6$ ) sont incubées dans un volume final de 400  $\mu$ l d'HBSS, en présence de concentrations croissantes de fibronectine ou d'albumine bovine. Après 30 min. à 4°C, 400 000 cpm d'antigène parasite sont ajoutés et incubés pendant 3 h à 4°C. Les cellules sont transférées dans de nouveaux tubes après trois lavages, et la radioactivité est appréciée dans un compteur gamma.

## **8. Infection des lymphocytes par les trypanostigotes.**

### *8. 1. Infection in vitro.*

Les lymphomes T ou B sont préalablement irradiés à 10.000 rads afin d'éviter leur prolifération. Les lymphomes irradiés ou les autres cellules T sont incubés à 37°C avec les trypanostigotes de culture en milieu R10 dans un rapport parasite/cellule de 10/1. Après 16h, les cellules sont lavées jusqu'à disparition des parasites extracellulaires (environ 5 fois). Des cyto-centrifugations sont réalisées après 48h d'incubation supplémentaire et colorées par le RAL 555 (Farmitalia Carlo Erba). Le nombre de cellules infectées est déterminé par observation au microscope optique (grossissement x 1000) sur un total de 1000 à 1500 cellules comptées par lame.

### *8. 2. Immunopéroxydase indirecte sur lame.*

Les cellules sont étalées sur lame par cyto-centrifugation, séchées puis fixées par le méthanol pendant 5 min.. Les récepteurs Fc des cellules sont saturés préalablement par un sérum de souris saine (1/50) pendant 20 min. puis sans lavage, les cellules sont incubées 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire (1/50). Ac Mc de rat anti-Thy 1.2 pour les lymphocytes T, Ac Mc de rat anti-Mac-1 pour les macrophages. Après trois lavages en HBSS elles sont mises en présence de l'anticorps secondaire correspondant marqué à la peroxydase. La révélation s'effectue après lavages par le di-amino-benzidine tétrahydrochloride (Fluka AG, Buchs, Suisse) pendant 30 min. à l'obscurité.

Les seconds anticorps sont : un anti-immunoglobulines de souris (Cappel) pour les lymphocytes B; un anti-immunoglobulines de rat (adsorbé) (Cappel) pour les lymphocytes T et les macrophages.



### 8. 3. Microscopie électronique.

Après infection *in vitro* des lymphocytes T par les trypanostigotes et maturation intracellulaire de ceux-ci, les cellules sont fixées 1 h à 4°C par la glutaraldehyde 0,5% en tampon cacodylate 0,5 M pH 7,4. Après deux lavages en tampon cacodylate 0,1 M pH 7,4 les cellules sont centrifugées, fixées par le tetroxide d'osmium 0,1% pendant 1 h à température ambiante, lavées quatre fois en eau distillée, colorées par l'acétate d'uranyl 0,5% 1 h à température ambiante, puis déshydratées dans des concentrations croissantes d'éthanol (50-70-90-100%). Un bloc est formé dans l'araldite et des coupes sont réalisées à l'ultramicrotome et sont observées au microscope électronique (Philips) à 70 kV.

### 8. 4. Mesure de l'infection *in vitro* par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée.

$3 \times 10^6$  cellules irradiées sont infectées comme décrit précédemment. L'hypoxanthine tritiée (Amersham) est ajoutée au milieu après 40 h (185 kBq/essais), l'incorporation se poursuit pendant 48 à 72 h. Les cellules sont ensuite précipitées au TCA 20% et filtrées sur filtre de verre (Whatman GF/C). Les filtres sont ensuite placés dans un liquide de scintillation et la radioactivité incorporée est appréciée dans un compteur  $\beta$  (LKB).

### 8. 5. Test d'hybridation moléculaire.

Les leucocytes (clone T, cellules mononuclées, lymphocytes T purifiés) infectés ou non infectés sont lysés dans 20 volumes de tampon de lyse (EDTA 0,1 M, SDS 0,5 % p/v, Tris HCl 10 mM pH 7,4). La ribonucléase (Boehringer), préincubée 10 min. à 90°C, est ajoutée à 50  $\mu\text{g/ml}$  final et incubée 2 h à 37°C. Les protéines sont détruites par la protéinase K (Boehringer) (100  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 3 h à 37°C.

Avant l'extraction de l'ADN, on ajoute une solution de NaCl pour obtenir une concentration finale de 0,1 M. L'extraction de l'ADN est réalisée par du phénol saturé en TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Une deuxième extraction est réalisée sur la fraction phénolique et la fraction aqueuse. Les différentes fractions aqueuses sont mélangées, et une extraction par le chloroforme saturé en phénol est réalisée, suivie d'une extraction par le chloroforme saturé en TE. L'ADN contenu dans la fraction aqueuse est ensuite précipité par de l'éthanol à 70%. La pelote d'ADN est prélevée, séchée et redissoute en TE.

La concentration en ADN est appréciée par son adsorption à 260 nm. 20  $\mu$ g d'ADN sont ensuite digérés par Eco RI (2U/ $\mu$ g ADN) à 37°C pendant 8 h. La digestion est ensuite vérifiée en gel d'agarose.

Des concentrations croissantes d'ADN (dilué en TE) sont déposées sur nitrocellulose à raison de 1 l par dépôt. L'ADN est dénaturé par une solution de NaCl 1,5 M, NaOH 0,5M puis neutralisé par une solution de NaCl 1,5 M Tris HCl pH 7,4 et fixé par un chauffage de 2 h à 80°C.

L'hybridation et la préhybridation sont réalisées avec la même solution : formamide désionisée 50% v/v, NaCl 0,75 M, Citrate bisodique 75mM, Polyvinylpyrrolidon 0,1% p/v, albumine bovine 0,1%, Ficoll 400 0,1%, SDS 0,1%, tampon phosphate pH 6,8 0,05 M; additionné au moment de l'emploi, d'ADN de Hareng à 25  $\mu$ g/ml. Après une préhybridation de 4 h à 42°C la sonde oligonucléotidique marquée (voir chapitre 3. 3.) est ajoutée ( $1 \times 10^8$  cpm) et incubée sur la nuit à 42°C. Les lavages sont réalisés 2 fois à température ambiante par une solution de NaCl 0,15 M, citrate trisodique 15 mM, puis deux fois à 42°C par une solution de NaCl 0,45 M, citrate trisodique 45 mM, SDS 0,1%.

La nitrocellulose est exposée 2 à 3 jours en autoradiographie. Le film est ensuite analysé par le système Chromoscan 3 (Loebl Joyce).

La séquence de l'oligonucléotide est issue d'un fragment de 195 pb d'ADN de *T. cruzi* décrit par Gonzales et coll. (1984) : AGC TCT TGC CCA CAC GGG TGC TGC ACT CGG CTG ATC G.

8. 6. *Mesure de l'infection des lymphocytes in vitro après activation.*

Les lymphocytes T des souris saines ou infectées sont purifiés et mis en milieu R10. Les cellules sont activées pendant 24 h à 37°C par la Phytohemagglutinine (PHA) (0,4% v/v), l'acide phorbol miristique (PMA) (10 ng/ml) ou le peptide parasitaire (PP), couplé à l'ovalbumine (20 µg/ml). Le peptide PP provient d'une protéine parasitaire de 85 kDa clonée et séquencée par Peterson et coll. (1986) dont la séquence est la suivante : Asp-Lys-Lys-Glu-Glu-Ser-Gly-Asp-Ser-Glu. Après lavage, les lymphocytes sont infectés *in vitro* 16 h à 37°C par les trypomastigotes (rapport parasites/cellules = 10). Les parasites libres sont éliminés par lavages et la maturation des parasites intracellulaires est poursuivie pendant 48 h. Le taux d'infection est mesuré après cyto-centrifugation et coloration au RAL 555.

8. 7. *Mesure de l'adhésion et de la pénétration du trypomastigote dans le lymphocyte.*

Le lymphome Jurkat est cultivé trois semaines dans le milieu Ultrosor épuisé en fibronectine (cf 7. 4.) avant d'être utilisé. Une suspension de  $1 \times 10^6$  cellules Jurkats est mise en contact pendant des temps variables avec  $5 \times 10^6$  trypomastigotes en milieu Ultrosor additionné ou non de fibronectine (50 µg/ml), de collagène de type I (50 µg/ml) ou du mélange de ces deux glycoprotéines. La réaction est arrêtée par cyto-centrifugation et coloration. Le nombre de parasites pour 100 cellules ainsi que le taux d'infection est mesuré en microscopie optique.

## **9. Inhibition de l'infection *in vitro* par les anticorps.**

### *9. 1. Inhibition de l'infection des fibroblastes par les anticorps.*

Nous avons adapté la technique décrite par Plata et coll. (1984). Des cellules fibroblastiques 3T3 sont irradiées à 10 000 rads et distribuées, à raison de 150 000 cellules par puit, dans des plaques Nunclon de 24 trous. Les cellules sont incubées dans du milieu de culture additionné de 5% de SVF et mises une nuit dans une étuve à 37°C pour qu'elles puissent adhérer au plastique. Chaque puit est additionné avec le sérum ou les AcMc appropriés, à la dilution requise, dans 1 ml de RPMI 2% de SVF. 300 000 trypanomastigotes sont incubés avec les cellules 5 h à 37°C, les parasites n'ayant pas adhérents aux cellules sont éliminés par plusieurs lavages en RPMI. Après maturation des parasites intracellulaires pendant 48 h à 37°C, les cellules sont lavées, fixées par de la glutaraldehyde 10% et deshydratées dans le méthanol à concentration croissante (50, 70, 100%) puis colorées au Giemsa.

La proportion de cellules infectées est déterminée par comptage au microscope optique sur 300 cellules par puit. Les cellules sont considérées comme infectées si elles contiennent plus de 4 amastigotes dans le cytoplasme. Chaque valeur d'infection représente la moyenne statistique de trois essais. Le pourcentage d'infection est calculé par rapport à un taux maximal d'infection en présence de milieu seul.

### *9. 2. Inhibition de l'infection des lymphocytes par les anticorps monoclonaux.*

Dans l'inhibition de l'infection des lymphocytes par les Ac Mc, ces derniers sont incubés préalablement 1 h à 4°C avec  $5 \times 10^6$  lymphocytes ou avec  $50 \times 10^6$  trypanomastigotes de culture suivant leurs spécificités. L'infection est réalisée en incubant pendant 16 h à 37°C les cellules et les parasites dans un volume final de 1 ml. Après élimination des parasites extracellulaires par 5 à 10 lavages, les cellules sont soit congelées pour extraire l'ADN pour le test d'hybridation de l'ADN parasite soit, pour le comptage en

microscopie photonique, réincubées à 37°C pendant 48 h pour que les parasites intracellulaires se multiplient. Les Ac Mc anti-CD3, CD4, HLA-DR sont produits par Ortho Diagnostic System et sont d'isotype IgG2a. Les Ac Mc anti-CD2 et anti-CD45Ra sont produits par Immunotech et sont d'isotypes IgG1. L'Ac Mc anti-CD8 est d'isotype IgG1 et produit par Coulter.

## **10. Mise en évidence d'antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes de souris infectées.**

### *10. 1. Par immunoprécipitation.*

$2 \times 10^7$  lymphocytes T purifiés de souris saine ou en phase aiguë de la maladie, sont lavés trois fois en HBSS et marqués en surface par 11,1 MBq de  $^{125}\text{I}$ Na et 200  $\mu\text{g}$  d'iodogène 15 min. à 4°C. Après lavages les lymphocytes marqués sont lysés par le tampon de lyse une nuit à 4°C et passés sur une colonne PD 10. Les antigènes des lymphocytes marqués en surface sont immunoprécipités par différents sérums humains comme décrit dans le chapitre 6. 1. 2..

### *10. 2. Par cytofluorimétrie en flux.*

Une suspension de  $1 \times 10^6$  lymphocytes est préparée à partir de la rate de souris saines ou infectées par *T. cruzi* comme décrit plus haut. Lors de l'utilisation de sérums humains, les différentes cellules sont lavées trois fois en HBSS à 4°C et incubées 30 min. avec du sérum sain, dilué au  $1/50^{\text{e}}$ , pour bloquer les récepteurs Fc. Après un lavage, les lymphocytes sont incubés 1 h à 4°C avec le sérum humain à tester dilué au  $1/50^{\text{e}}$  en HBSS puis lavés et révélés par une incubation de 30 min. à 4°C avec des anticorps anti-immunoglobulines humaines, marqués à la fluoresceine (Cappel).

Lors de l'utilisation de sérums de souris, les cellules sont directement incubées en présence du sérum de souris saine ou infectée, dilué au 1/50<sup>e</sup> en HBSS pendant 1h à 4°C. Les cellules lavées sont ensuite incubées 30 min. à 4°C en présence de F(ab')<sub>2</sub> fluorescent, de chèvre anti IgG de souris dilués au 1/50<sup>e</sup> en HBSS. Enfin dans tous les cas, les cellules sont lavées et fixées par le para-formaldéhyde à 1% puis analysées au cytofluorimètre (50-H cytofluorograph, Ortho instrument, Westwood, MA).

Pour le test de double marquage, après incubation avec les sérums humains et deux lavages, les cellules sont incubées 30 min. à 4°C avec un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines humaines, marqué à la phycoerythrine et, en même temps, avec un Ac Mc anti Thy 1.2 de souris, marqué à la fluoresceine, dilué au 1/100<sup>e</sup>. Après lavages, les cellules sont fixées et analysées par cytofluorimétrie en flux (Epics).

#### **11. Evaluation des sous populations leucocytaires pendant la phase aiguë.**

La cinétique d'évolution des leucocytes d'animaux en phase aiguë a été réalisée sur des souris BALB/C entre 0 et 13 jours après l'infection par *T. cruzi*. Des lots de 3 souris sont infectés par injection en intrapéritonéale de trypanostigotes sanguicoles à différents jours, afin que tous les animaux soient sacrifiés en même temps. La rate est prélevée, homogénéisée et les érythrocytes sont éliminés par un choc hypotonique.

Le pourcentage des différentes populations leucocytaires est évalué en cytofluorimétrie en flux en utilisant différents anticorps spécifiques de ces sous populations. Un Ac Mc de rat anti-MAC 1 (Boehringer) révéle par un F(ab')<sub>2</sub> fluorescent de chèvre anti-immunoglobulines de rat (adsorbé) marque les macrophages; un F(ab')<sub>2</sub> fluorescent de chèvre anti-immunoglobulines de souris marque les lymphocytes B; un Ac Mc de souris anti-Thy 1.2, révéle par le F(ab')<sub>2</sub> fluorescent de chèvre anti-immunoglobulines de souris, marque les lymphocytes B et T (par différence avec les cellules B on obtient le nombre de lymphocytes T); les PMN sont appréciés par leur taille au cytofluorimètre.

Pour la numération des macrophages, les Fc récepteurs de ces cellules sont préalablement saturés par un sérum de souris saine dilué au  $1/10^6$  en HBSS, 15 min. à  $4^\circ\text{C}$  puis lavées.

Le test en cytofluorimétrie en flux est réalisé sur  $2 \times 10^6$  cellules. L'anticorps correspondant, dilué au  $1/100^e$ , est incubé 1 h à  $4^\circ\text{C}$  puis, après deux lavages en HBSS, l'anticorps est révélé à  $4^\circ\text{C}$  pendant 45 min. par le  $\text{F(ab')}_2$  fluorescent de chèvre dilué au  $1/100^e$ . Deux lavages sont ensuite effectués et les cellules sont fixées par le paraformaldéhyde 1% en tampon cacodylate 0,2 M pH 7,4. Un témoin est réalisé avec le  $\text{F(ab')}_2$  fluorescent de chèvre seul.

Le pourcentage de cellules est obtenu directement par le cytofluorimètre. Le nombre absolu de cellules par souris est calculé par rapport au nombre total de leucocytes dans la rate obtenu après homogénéisation.

## **12. Mesure de la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante vis à vis des lymphocytes d'animaux infectés.**

$1 \times 10^7$  lymphocytes T purifiés sont marqués avec 7,4 MBq (200 Ci) de  $^{51}\text{Cr}$  (chromate de sodium, CEA, Gif/Yvette) pendant 3 h à  $37^\circ\text{C}$  en milieu R10 puis lavés trois fois avant leur utilisation. Les cellules cibles ( $1 \times 10^5$ ) sont incubées dans  $50 \mu\text{l}$  en plaque 24 trous (Falcon 3040) avec  $50 \mu\text{l}$  de dilutions différentes de sérum inactivé (30 min. à  $56^\circ\text{C}$ ) ou d'immunoglobulines purifiées ( $10 \mu\text{g/puits}$ ) pendant 30 min. à  $37^\circ\text{C}$ . Les cellules effectrices ( $2 \times 10^6$ ) dans  $100 \mu\text{l}$  sont ensuite ajoutées. Ces cellules mononuclées sont purifiées sur Ficoll-Paque (Pharmacia) à partir du sang périphérique, pour les cellules humaines; à partir de la rate et des ganglions pour les cellules de souris. Les plaques sont centrifugées 2 min. à  $20 \times g$  puis incubées 12 h à  $37^\circ\text{C}$ , centrifugées de nouveau à  $100 \times g$  2

min. et 100 l de chaque puit sont prélevés et comptés dans un compteur gamma. Chaque condition est réalisée en triple et le pourcentage de cytotoxicité est calculé suivant la formule :

$$\frac{\text{valeur expérimentale} - \text{libération spontanée}}{\text{libération totale} - \text{libération spontanée}} \times 100$$

La libération totale est déterminée après lyse des cellules cibles marquées par de l'HCl 1 M. La libération spontanée est obtenue en incubant les cellules cibles seules dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous classifions un test d'ADCC positif si le test de Student est significatif ( $p < 0,01$ ) quand on compare (cpm cellules cibles + cellules effectrices + sérum) à (cpm cellules cibles + sérum) ou à (cpm cellules cibles + cellules effectrices).



**BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- Acosta A. M. and Santos-Buch C. A. (1985). Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*. *Circulation*. 71: 1255.
- Adamson E. D. (1983). The effect of collagen on cell division, cellular differentiation and embryonic development. In *Collagen in health and disease* (ed. M. Jayson and J. Weiss), pp 218. London : Churchill-Livingston.
- Akiyama S. K., Yamada S. S. and Yamada K. M. (1986). Characterization of a 140-kD avian cell surface antigen as a fibronectin-binding molecule. *J. Cell Biol.* 102: 442.
- Andrews N. W., Hong K., Robbins, E. S. and Nussenzweig V. (1987). Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 64: 112.
- Andrews N. W. and Whitlow M. B. (1989). Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 249.
- Auriault C., Ouaisi A., Torpier G. Eisen H. and Capron A. (1981). Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasit. Immunol.* 3: 33.
- Arauyo F. G. (1985). *Trypanosoma cruzi* : Expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. *J. Immunol.* 135: 4149.
- Arauyo F. G. and Morein B. (1988). A 45 K antigen isolated from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against the organism. *Mem. Inst. O. Cruz.* 83: 138.
- Bannister L. H., Butcher G. A. and Mitchell G. H. (1977). Recent advances in understanding the invasion of erythrocytes by merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Bull. World Health Organisation.* 55: 163.
- Beltz L. A. and Kierszenbaum F. (1987). Suppression of human lymphocyte responses by *Trypanosoma cruzi*. *Immunol.* 60: 309.
- Beltz L. A., Kierszenbaum F. and Szein M. B. (1990). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human peripheral blood lymphocytes activated via the alternative (CD2) pathway. *Infect Immun.* 58: 1114.
- Bernard M. P., Myers J. C., Chu M. L., Ramirez F., Eikenberry E. F. and Prockop D. J. (1983). Structure of a cDNA for the pro 2 chain of human type I procollagen. Comparison with chick cDNA for pro 2 (I) identifies structurally conserved features of the protein and the gene. *Biochem.* 22: 1139.
- Black C. M., Israelski D. M., Suzuki Y. and Remington J. S. (1989). Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. *Immunol.* 68: 570.
- Bornstein P. and Sage H. (1980). Structurally distinct collagen types. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 957.
- Brack, C. (1968). Elektronenmikroskopisch untersuchungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. *Act. Trop.* 25: 289.

- Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347.
- Brumpt E. (1912a). Le *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Cornorhinus megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex boueti* et *Ornithodon moubata*. Cycle évolutif de ce parasite. *Bull. Soc. Path. Exot.* 5: 360.
- Brumpt E. (1912b). Pénétration du *S. cruzi* à travers la muqueuse oculaire saine. *Bull. Soc. Path. Exot. Filiales* 5: 723.
- Brumpt E. (1980). Epidémiologie de la maladie de Chagas. *Bull. Soc. Acad. Nat. Med.* 164: 88.
- Budzko D. B., Pizzimenti M. C. and Kierszenbaum F. (1975). Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease : immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 11: 86.
- Burgess D. E. and Hanson W. L. (1979). Adoptive transfer of protection against *Trypanosoma cruzi* with lymphocytes and macrophages. *Infect. Immun.* 25: 838.
- Camargo E. P., Barbieri C. L. and Sanbevicus J. V. (1982). Possible artefacts in the radioiodination of surface proteins of trypanosomatids. *J. Immunol. Methods* 52: 245.
- Capbern A., Mattern P. and Pautrizel R. (1974). Etude comparative du taux des protéines sériques au cours de trypanosomes à *Trypanosoma gambiense* et à *Trypanosoma cruzi* chez la souris. *Exp. Parasitol.* 35: 86.
- Capron A. and Dessaint J. P. (1986). L'immunité anti-parasitaire. *Immunologie : Bach J. F. éditeur, 3<sup>ème</sup> édition* p. 640.
- Capron A. and Dessaint J. P. (1989). Molecular basis of host-parasite relationship : towards the definition of protective antigens. *Immunol. Reviews.* 112: 27.
- Carneiro M., Chiari E., Goncalves A. M., da Silva Pereira A. A., Morel C. M. and Romanha A. J. (1990). Changes in the isoenzyme and kinetoplast DNA patterns of *Trypanosoma cruzi* strains induced by maintenance in mice. *Act. Trop.* 47: 35.
- Carter K. C. and Smith J. E. (1988). BSI symposium on parasite antigens and vaccination. *Parasitol. Today.* 4: 288.
- Cerisola J. A. (1970). Immunodiagnosis of Chagas' disease : Hemagglutination and immunofluorescence test. *J. Parasitol.* 56: 409.
- Chagas C. (1909). Nova trypanosomase humana. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* , 1: 159.
- Chagas C. (1911). Molestia de Chagas on tireoidite parazitaria tipografia Leuzinger, Rio de Janeiro.
- Chao, D., Lotz, J. M. and Dusanic, D. G. J. (1984). Infection of a rodent myeloma Y3-Ag 1.2.3. cells by *trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Parasitol.* 70: 1005.
- Charles D. Maladie de Chagas. (1987). *Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Maladie infectieuses.* 8095 C<sup>10</sup>, 7: 1.
- Chess Q., Acosta, A. M., Sethi, J. K. and Santos-Buch C. A. (1983). Reversible acquisition of a host surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 40: 299.

- Choromanski L. and Kuhn R. (1987). Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* **55**: 403.
- Cicarelli R. M. and Lopes J. D. (1989). Characterization of a protein from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes that cleaves non-immune IgG bound through its Fab fragment. *J. Immunol.* **142**: 1685.
- Clinton B. A., Ortiz-Ortiz L., Garcia W., Martinez T. and Capin R. (1975). *Trypanosoma cruzi* : Early immune response in infected mice. *Exp. Parasitol.* **37**: 417.
- Cohen S. (1974). The immune response to parasites. in "Parasite in the immunized host : mechanisms of survival". *Associated Scientific Publishers*; Amsterdam, 3.
- Colli W., Katzin A. M., Andrews N. W., Kuwajima V. Y. Goncalves M. F., Abuin G., Alves M. J. M. and Zingales B. (1983). Perspectives for vaccinations against Chagas' disease through biotechnology. I. Definition of relevant antigens possibly involved in parasite-host cell interaction. *New approaches to vaccine development*. proceeding of a meeting organized by the W.H.O. 418.
- Corsini A. C., Clayton C., Askonas B. A., Ogilvie, B. M. (1977) Loss of B cell potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Clin. Exp. Immunol.* **29**: 122.
- Cossio P. M., Laguens R. P., Diez C., Szarfman A., Segal A. Arana R. M. (1974). Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting the plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation.* **50**: 1252.
- Crane M. S. J. and Dvorak J. A. (1982). Influence of monosaccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**: 333.
- Cunningham D. S. and Kuhn R. (1980). *Trypanosoma cruzi*-induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterisation. *J. Immunol.* **124**: 2122.
- Dalmaso A. P. and Jarvinen J. A. (1980). Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infect. Immun.* **28**: 434.
- Darman M. (1941) : Multiplication du *Trypanosoma cruzi* dans le sang périphérique de la souris par passages successifs. Recherche de la prémunition vis-à-vis des souches homologues et hétérologues. *Ann. Parasit. (Paris)*. **18**: 166.
- De Titto E. H., Catterall J. R. and Remington J. S. (1986). Activity of recombinant tumour necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **137**: 1342.
- Dias E. (1944). Nao receptividade do pombo domestico a infeccao por Schiotrypanum. *Mem. Inst. Osw. Cruz* **40**: 191.
- D'Imperio Lima M. R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M., and Continko A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* **137**:353.
- Fischer A., Auffray C. and Durandy A. (1987). Les molécules d'adhésions des lymphocytes T. *Médecine Sciences.* **3**: 334.
- Fischer E., Ouaisi M. A., Velge Ph., Cornette J. and Kazatchkine M.D. (1988). gp 58/68, a parasite component which contributes to the escape of the trypomastigote form of *T.cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunol.* **65**: 299.

Frasch, A. C. C. (1989). Specific antibody response during the acute period of Chagas Disease. *Parasitol. Today* 5: 355.

Goldenberg S., Coutreras V. T., Salles J. M., Franco M. P. A. L., Bonaldo M. C., Valle D., Goncalves A. M. and Morel C. L. (1983). Perspectives for vaccinations against Chagas' disease through biotechnology. II. Genes expression in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and cell free translation of mRNAs coding for relevant surface antigens. *New approaches to vaccin developement* proceeding of a meeting organized by the W.H.O. 442.

Gonzales A., Prediger E., Huecas M. E., Nogueira N. and Lizardi P. M. (1984). Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi* : Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 3356.

Hanson W. L. (1976). Immunology of american trypanosomiasis (Chagas' disease). *Imm. Paras. Inf.* 17: 222.

Harel-Bellan A., Joskowicz M., Fradelizi D. and Eisen H. (1983). Modification of T cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 80: 3466.

Hatcher F. M. and Kuhn R. E. (1982). Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science*. 218: 295.

Hauschka T. S., Goodwin M. B., Palmquist J. and Brown E. (1950). Immunological relation ship between seven strains of *Trypanosoma cruzi* and its application in the diagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med.* 30: 1.

Hayes, M. M. and Kierszenbaum F. (1981). Experimental Chagas' disease : kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 31: 1117.

Henriquez D., Piras R. and Piras M. M. (1981). The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells and the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2: 359.

Hoff, R. (1975). Killing *in vitro* of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity of challenge *in vivo*. *J. Exp. Med.* 142: 299.

Hofflin J. M., Sadler R. H., Araujo F. G., Page W. E. and Remington J. S. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 437.

Hynes R. O. (1986). Les fibronectines. *Pour la Science* (Aout) p18.

Hynes R. O. (1987). Integrins : a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549.

Jadin J. R. and Le Ray D. (1969). Acquisitions récentes dans les techniques de culture des trypanosomes africains. *Ann. Soc. Belge Med. Biop.* 49: 331.

Jenni L., Marti S., Schweizer J., Betschart B., Le Page R. W., Wells J. M., Tait A., Paindavoine P., Pays E. and Steinert M. (1986). Hybrid formation between african trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322: 173.

Joiner K., Sher A., Gaither T. and Hammer C. (1986). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83: 6593.

Joskowicz M. (1985). Maladie de Chagas et autoimmunité. *Médecine Sciences*. 1: 412.

- Joskowicz M. (1985). Maladie de Chagas et autoimmunité. *Médecine Sciences*. 1: 412.
- Katzin A. M. and Colli W. (1983). Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi* : an N-acetyl, D glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. *Biochem. Biophys. Acta*. 727: 403.
- Khoury E. L., Ritacco V., Cossio P. M., Laguens R. P., Szarfman A., Diez C. and Arana R. M. (1979). Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36: 8.
- Kierszenbaum F. (1981). On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune responses. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunol.* 44: 641.
- Kierszenbaum F. (1986). Autoimmunity in Chagas' disease. *J. Parasitol.* 72: 201.
- Kierszenbaum F. and Piewkowski M. M. (1979). Thymus dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 24: 117.
- Kierszenbaum F. and Stiles B. (1985). Evidence supporting the existence of a host cell surface receptor for *Trypanosoma cruzi*. *J. Protozool.* 32: 364.
- Kierszenbaum F., Szein M. B. and Beltz L. A. (1989a). Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunol. Today*. 10: 129.
- Kierszenbaum F., Washington R. C., Beltz L. A. and Szein B. (1989b). *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *J. Immunol.* 143: 275.
- Kirchhoff L. V. (1987). *Am. J. Med.* 82: 915.
- Kipnis T. L., James S. L., Sher A. and David J. R. (1981). Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 47.
- Koberle F. (1969). Chagas' disease and Chagas' syndrome : the pathology of american trypanosomiasis. *Adv. Parasit.* 6: 63.
- Kohler G. and Milstein C. (1975). Continuous culture fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 26: 495.
- Krettli A. U. and Brener Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116: 755.
- Krettli A. U. and Brener Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigotes antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009.
- Krettli A. U., Carrington P. W. and Nussenzweig R. S. (1979). Membrane bound antibodies of bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice : strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* 3: 1.
- Kuhn R. E. and Murnane J. E. (1977). *Trypanosoma cruzi* : immune destruction of parasitized mouse fibroblasts *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 41: 66.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 681.

- Lanar D. E., Levy L. S. and Manning J. (1981). Complexity and content of the DNA and RNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 327.
- Ley V., Andrews N. W., Robbins E. S. and Nussenzweig V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168: 649.
- Liew F. Y. (1988). Immune suppressor substance in experimental Chagas' disease. *Parasitol. Today.* 4: 355.
- Lima M. F. and Villalta F. (1989). *Trypanosoma cruzi* trypomastigote clones differentially express a parasite cell adhesion molecule. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 159.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Farr A. L. and Randall R. (1951). *J. Biol. Chem.* 193: 265.
- Maleckar J. R. and Kierszenbaum F. (1983). Inhibition of mitogen induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 130: 908.
- Markwell M. A. K. and FO C. F. (1978). Surface specific iodination of membrane proteins of viruses and eukaryotic cells using 1.3.4.6-tetrachloro-3, 6 -diphenylglycosuril. *Biochem.* 17: 4807.
- McConahey P. J. and Dixon F. J. (1966). A method for trace iodination of proteins for immunology studies. *Int. Arch. All. Appl. Immunol.* 29: 185.
- McHardy N. (1977). Passive immunisation of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. *Tropenmed. Paras.* 28: 195.
- Milder R. and Kloetzel J. (1980). The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitol.* 80: 139.
- Minoprio P., Eisen H., Joskowicz M., Pereira P. and Coutinho A. (1987). Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139: 545.
- Morel C. M., Chiari E., Camargo E. P., Mattei D. M., Romahna A. J. and 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.
- Morrissey J. H. (1981). Silver stain for protein in polyacrylamide gels : modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Ann. Biochem.* 117: 307.
- Mosca W., Castes M., Ojeda A. and El Homsy A. (1986). Evaluation of the interaction of leucocytes from Chagas' disease patients with trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 975.
- Muniz J. and Freitas G. (1944). Contribucao para o diagnostico da doenca de Chagas pelas reacoes de imunidade : I. Estudio comparativo entre as reacoes de aglutinacao de complemento. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 41: 303.
- Nicholson-Weller A. Burge J. Fearon D. T., Weller P. F. and Austen K. F. (1982). Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertase of the complement system. *J. Immunol.* 129: 184.
- Nogueira N., Bianco C. and Cohen Z. (1975). Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 142: 224.

- O'Daly J. A., Simonis S., De Rolo N. and Caballero H. (1984). Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 26: 67.
- Okabe K., Kipnis T. L., Galich V. L. C. and Da Silva W. D. (1980). Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 16: 344.
- Ouaissi M. A., Afchain D., Capron A. and Grimaud J. A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological functions. *Nature* 308: 380.
- Ouaissi M. A., Cornette J., Afchain D., Capron A., Gras-Masse H. and Tartar A. (1986a). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* 234: 603.
- Ouaissi M. A., Cornette J. and Capron A. (1985). *Trypanosoma cruzi* : modulation of parasite-cells interaction by plasma fibronectin. *Eur. J. Immunol.* 15: 1096.
- Ouaissi M. A., Cornette J. and Capron A. (1986b). Isolation and functional characterization of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201.
- Ouaissi M. A., Cornette J., Velge Ph. and Capron A. (1988). Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas' disease: Pathological implications. *Eur. J. Immunol.* 18: 1889-1894.
- Ouaissi M. A., Defoort J. P., Afchain D., Gras-Masse, H., Cornette J., Caron H., Tartar A. and Capron A. (1989). Use of synthetic peptides in two different approaches to interfere with host cell penetration by *Trypanosoma cruzi*. *Synthetic peptides: Approaches to biological problems.* 43.
- Ouaissi, M. A., Kusnierz J. P., Gras-Masse H., Drobecq H., Velge Ph., Cornette J., Tartar A. and Capron A. (1988). Fluorescence-Activated Cell-Sorting Analysis of Fibronectin Peptides Binding to *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes. *J. Protozool.* 35: 111.
- Ouaissi, M.A., A. Taibi, J. Cornette, Ph. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F.S. Rizvi & A. Capron (1989). Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100: 115-124.
- Pan S. C. (1978). *Trypanosoma cruzi*: intracellular stages grown in cell-free medium at 37°C. *Exp. Parasitol.* 45: 215.
- Pancre V., Auriault C., Joseph M., Cesbron J. Y., Kusnierz J. P. and Capron A. (1986). Suppressive lymphokine of platelet cytotoxic functions. *J. Immunol.* 137:585.
- Pearson, T. W., Dolan T. T., Stagg D. A. and Lundin L. B. (1979). Cell mediated immunity to *Theileria*-transformed cell lines. *Nature* 281: 678.
- Peterson D. S., Wrightsman R. A. and Manning J. E. (1986). Cloning of a major surface-antigen gene of *trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature.* 322: 566.
- Pierschbacher M. D. and Ruoslahti E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature (London).* 309: 30.



- Piras M. M., Henriquez D. and Piras R. (1985). The effect of proteolytic enzymes and protease inhibitors on the interaction *Trypanosoma cruzi*-fibroblast. *Mol. Biochem. Parasitol.* 14: 151.
- Piras M. M., Henriquez D. and Piras R. (1986). The effect of fetuin and other sialoglycoproteins on the *in vitro* pénétration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes into fibroblastic cells. *Mol. Biochem. Parasitol.* 22: 234.
- Piras R., Piras M. M. and Henriquez D. (1982a). The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis and the *in vitro* infectivity and morphology of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 83.
- Piras R., Piras M. M. and Henriquez D. (1982b). Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 67.
- Piras R., Piras M. M. and Henriquez D. (1983). *Trypanosoma cruzi*-fibroblastic cell interaction necessary for cellular invasion in cytopathology of parasitic disease. *Pitman books, London (Ciba foundation symposium 99)* 31.
- Plata F. (1985). Enhancement of tumor growth correlates with suppression of the tumor specific cytolytic T lymphocyte response in mice chronically infected by *T. cruzi*. *J. Immunol.* 134: 1312.
- Plata F., Wietzerbin J., Pons F. G., Falcoff E. and Eisen H. (1984). Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14: 930.
- Reed S. G. (1980). Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocytes-enriched spleen cells. *Infect. Immun.* 28: 404.
- Ribeiro dos Santos, R. and Hudson L. (1980). *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. *Parasit. Immunol.* 2: 1.
- Rivera-Vanderpas M. T., Rodriguez A. M., Afchain D., Bazin H. and Capron A. (1983). *Trypanosoma cruzi* : variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Act. Trop.* 40: 5.
- Roberson E. L. and Hanson W. L. (1974). Transfert of immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 338.
- Roberson E. L., Hanson, W. L. and Chapman, W. L. (1973). *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34: 168.
- Romanha A. J., Silva Pereira A. A., Chiari E. and Dias J. C. P. (1979). Isoenzyme patterns of *Trypanosoma cruzi* isolated from patients with Chagas' disease. *Cong. Int. Doença de Chagas, Rio de Janeiro.*
- Rottenberg M., Lindqvist C., Koman A., Segura E. L. and Örn A. (1989). Modulation of both interleukin 2 receptor expression and interleukin 2 production during experimental murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol.* 30: 65.
- Rowland E. C. and Masters E. A. (1987). *Trypanosoma cruzi* specific antibody response in immunized C3H (HE) mice during infection. *Int. J. Parasitol.* 17: 1125.
- Rowland E. C. and Ritter D. M. (1984). Corpus Christi strain induced protection to *Trypanosoma cruzi* infection in C3H (HE) mice : transfert resistance to Brasil strain challenge with lymphocytes. *J. Parasitol.* 70: 760.

- Ruoslahti E. and Pierschbacher M. D. (1986). Arg-Gly-Asp : a versatile cell recognition signal. *Cell* 44: 517.
- Ruoslahti E. and Pierschbacher M. D. (1987). New perspectives in cell adhesion : RGD and Integrins. *Science*. 238: 491.
- Russell D. G. (1990). *Leishmania* and the macrophages. *Immunol. Today*. 11: 74.
- Sanderson C. J., Lopez A. F. and Bunn Moreno M. M. (1977). Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*. 268: 340.
- Santiago A. R., Afchain D. and Capron A. (1981). Specific antigens of *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 61: 369.
- Santos-Buch, C. A. and Teixeira R. L. (1974). The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogenic heart cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 140: 38.
- Scott M. T. (1981). The nature of immunity against *trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasit. Immunol.* 3: 209.
- Scott M. T. and Snary D. (1979). Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature*. 73: 282.
- Seah S., and Marsden P. D. (1969). The protection of mice against a virulent strain of *Trypanosoma cruzi* by previous inoculation with an avirulent strain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63: 211
- Serrano L. E. and O'Daly J. A. (1987). Protein fraction from *Trypanosoma cruzi* infected spleen cell supernatants with immunosuppressive activity *in vitro*. *Int. J. Parasitol.* 17: 851.
- Sher A., Hieny S. and Joiner K. (1986). Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* : dependence on the developmentally regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate. *J. Immunol.* 137: 2961.
- Sher A. and Ottesen E. (1988) Immunoparasitology. *Nonatopic Immunological Disorders* 34: 923
- 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.
- Taliaferro W. H. and Pizzi T. (1955). Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96: 199.
- Tambourgi D. V., Kipnis T. L. and Da Silva W. D. (1989). *Trypanosoma cruzi*: Antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp. Parasitol.* 68: 192.
- Tarleton R. L. (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J. Immunol.* 140: 2769.
- Tarleton R. L. and Scott D. W. (1987). Initial induction of immunity, followed by suppression of responses to parasite antigens during *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *Parasit. Immunol.* 8: 579.

- Teixeira A. R. L., Teixeira G., Macedo V. and Prata A. (1978). *Trypanosoma cruzi*-sensitized T lymphocyte mediated  $^{51}\text{Cr}$  release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1097.
- Thiéry J. P., Dufour S. and Duband J. L. (1987). Fibronectines, morphogénèse et migrations cellulaires. *Médecine Sciences.* 3: 316.
- Trischmann T. M. (1980). *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp. Parasitol.* 49: 225.
- Trischmann T. M. (1984). Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Parasit. Immunol.* 6: 561.
- Trischmann T. M., Tanowitz H., Wittner M. and Bloom B. (1978). *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45: 160
- Umekita L. F. and Mota I. (1989). *In vitro* lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasit. Immunol.* 11: 561.
- Velge Ph., Ouaiissi M. A., Cornette J., Afchain D. and Capron A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen binding proteins : Possible role in cell-parasite interaction. *Parasitol.* 97: 255.
- Velge Ph., Ouaiissi M. A., Kusniez J. P. and Capron A. (1989). Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR antigens. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 309, Serie III: 93
- Voller A. and De Savigny D. (1981). Diagnostic serology of tropical parasitic disease. *J. Immunol. Methods* 46: 1.
- Vray B., Frih B., Carlier Y. and Ouaiissi A. (1987). Fibronectin inhibits attachment of *Trypanosoma cruzi* to macrophage hybridomas. *Journées de parasitologie des instituts Pasteurs d'outre mer.*
- Wainberg, M. A., Blain, N., Fitz-Gibbon, L. (1987). Differential susceptibility of human lymphocyte cultures to infection by HIV. *Clin. Exp. Immunol.* 70: 136.
- Williams, G. T., Fielder L., Smith H. and Hudson L. (1985). Adsorption of *Trypanosoma cruzi* proteins to mammalian cells *in vitro*. *Act. Trop.* 42: 33.
- Williams, D. M., Sawyer S. and Remington J. S. (1976). Role of activated macrophages in resistance of mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 134: 610.
- Wirth J. J. and Kierszenbaum F. (1984). Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 133: 460.
- Wirth J. J., Kierszenbaum F., Sonnenfeld G. and Zlotnik A. (1985). Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 49: 61.
- Wood J. N., Hudson L. Jessell T. M. and Yamamoto M. (1982). A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature.* 296: 34.
- Yamada K. M. and Hynes R. O. (1982). Fibronectins : multifunctional modular glycoproteins. *J. Cell Biol.* 95: 369.

- Yoshida N. (1986) *Trypanosoma cruzi* : Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. *Exp. Parasitol.* **61**: 184.
- Zenian A. and Kierszenbaum F. (1982). Inhibition of macrophage *Trypanosoma cruzi* interaction by concanavalin A. and differential binding of bloodstream and culture forms to the macrophage surface. *J. Parasitol.* **68**: 408.

## TABLE DES MATIERES

	page
REMERCIEMENTS .....	3
SOMMAIRE.....	7
RESUME.....	8
LISTE DES ABREVIATIONS .....	11
INTRODUCTION.....	13
GENERALITES.....	16
<b>1. Agent de la maladie.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Cycle évolutif du parasite .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Mode de transmission .....</b>	<b>21</b>
<b>4. Moyens de lutte contre la maladie de Chagas. ....</b>	<b>21</b>
4.1. Moyens thérapeutiques.....	21
4. 2. Prophylaxie.....	22
<b>5. Aspects cliniques de la maladie de Chagas. ....</b>	<b>22</b>
5.1. La phase aiguë.....	22
5.2. La phase chronique.....	23

<b>6. La réponse immune de l'hôte.....</b>	<b>23</b>
6.1. Immunité naturelle à <i>T. cruzi</i> .....	24
6.2. L'immunité acquise.....	24
6.2.1. Importance de la réponse anticorps.....	25
6.2.1.1. Démonstration du rôle des anticorps dans l'élimination du parasite.....	25
6.2.1.2. Mécanisme d'action des anticorps.....	27
6.2.2. Importance des lymphocytes T dans la résistance à l'infection.....	30
6. 2. 3. Importance des macrophages dans la résistance à l'infection.....	32
<b>7. Mécanismes d'échappement de <i>T. cruzi</i> à la réponse immune de l'hôte.....</b>	<b>33</b>
7.1. Le travestissement antigénique.....	33
7.1.1. Variation antigénique du parasite.....	33
7.1.2. Mimétisme moléculaire. . . . .	34
7.1.3. Acquisition d'antigènes d'hôte.....	34
7.2. Développement intracellulaire du parasite.....	34
7.3. Modulation de la réponse immune de l'hôte.....	35
7.3.1. Immunopathologie de la phase aiguë. . . . .	35
7.3.1.1. Modulation de l'IL-2 et de son récepteur cellulaire.....	36
7.3.1.2. Activation polyclonale des lymphocytes B.....	38
7.3.1.3. Origine des substances immunosuppressives.....	38
7.3.2. Immunopathologie de la phase chronique. . . . .	39
<b>8. Stratégie vaccinale. . . . .</b>	<b>41</b>
<b>9. Interaction parasite-cellule. . . . .</b>	<b>42</b>
9.1. Les molécules d'adhésion.....	44
9.1.1. Les molécules d'adhésion des lymphocytes T. . . . .	46
9.1.2. Les molécules d'adhésions de la matrice extracellulaire. . . . .	46
9.1.2.1. Les fibronectines.....	46
9.1.2.2. Les collagènes.....	47
9.2. Mécanisme d'adhésions du trypomastigote à la cellule hôte.....	49

RESULTATS.....	51
<b>1. Rôle du collagène dans l'interaction entre le trypomastigote et le fibroblaste. . . .</b>	<b>52</b>
1.1. Présence d'un récepteur pour le collagène à la surface des trypomastigotes.....	53
1.2. Purification du récepteur pour le collagène.....	53
1.3. Contrôle de l'affinité des glycoprotéines parasitaires pour le collagène. ....	57
1.4. Caractérisation des récepteurs parasitaires pour le collagène.....	61
1.5. Inhibition, par les anticorps anti-récepteurs parasitaires, de l'infection in vitro des fibroblastes. ....	64
1.6. Conclusions. ....	64
<b>2. Utilisation à des fins vaccinales du récepteur parasite pour le collagène. . . . .</b>	<b>66</b>
2.1. Potentialité vaccinale des récepteurs parasitaires dans le modèle souris.....	66
2.2. Inhibition de l'activité de la C3 convertase préformée par la gp 58/68.....	67
2.3. Inhibition de la formation d'une C3 convertase primitive.....	69
2. 4. Conclusions.....	69
<b>3. Infection des lymphocytes T par <i>T. cruzi</i>. . . . .</b>	<b>70</b>
3.1. Infection in vitro des lymphocytes T par <i>T. cruzi</i> . ....	70
3.1.1. <i>Observation en microscopie optique</i> .....	72
3.1.2. <i>Observation en microscopie électronique</i> . . . . .	74
3.1.3. <i>Test quantitatif de l'infection parasite par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée</i> .74	
3.2. Démonstration du lymphocyte T comme cellule hôte de <i>T. cruzi</i> .....	76
3.2.1. <i>Développement intracellulaire du parasite</i> . . . . .	76
3.2.2. <i>Libération de trypomastigotes par les lymphocytes T infectés</i> . . . . .	78
3.3. Infection des lymphocytes T <i>in vivo</i> . ....	81
3.3.1. <i>Analyse en microscopie optique</i> .....	81
3.3.2. <i>Détection de cellules infectées in vivo par hybridation du DNA parasite</i> .....	84
3.4. Conclusions. ....	86

<b>4. Nature des lymphocytes T infectés . . . . .</b>	<b>86</b>
4.1. Infection <i>in vitro</i> de lymphocytes d'animaux infectés. ....	86
4.2. Infection <i>in vitro</i> de lymphocytes activés. ....	88
4.3. Conclusions. ....	89
<b>5. Mécanismes de pénétration du parasite dans les lymphocytes T . . . . .</b>	<b>91</b>
5.1. Analyse de la fixation des antigènes parasitaires à la surface de lymphomes. ....	91
5.2. Fixation des antigènes du trypanostigote sur les cellules Jurkat en présence de fibronectine. ....	91
5.3. Mesure de l'adhésion et de la pénétration parasitaire. ....	94
5.4. Modulation de l'infection cellulaire par la fibronectine et le collagène. ....	96
5.5. Etude en microscopie électronique de la pénétration parasitaire. ....	96
5.6. Inhibition par les anticorps monoclonaux de l'infection <i>in vitro</i> des lymphocytes T. 99	
5.6.1. Etude en microscopie optique. ....	99
5.6.2. Etude par hybridation du DNA parasitaire. ....	101
5.7. Conclusions. ....	101
<b>6. Devenir <i>in vivo</i> des lymphocytes infectés . . . . .</b>	<b>104</b>
6.1. Détection d'antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes de souris en phase aiguë de la maladie. ....	104
6.2. Réactivité des sérums humains vis-à-vis des lymphocytes T de souris. ....	105
6.3. Analyse par double marquage de la réactivité des sérums immuns vis-à-vis des lymphocytes d'animaux infectés. ....	108
6.4. Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante. ....	108
6.4.1. En système homologue. . . . .	111
6.4.2. En système hétérologue. . . . .	111
6.5. Variations des populations leucocytaires pendant la phase aiguë. ....	113
6.6. Identification des antigènes parasitaires présents à la surface des lymphocytes T. . . . .	117



DISCUSSION.....	120
MATERIELS ET METHODES .....	134
<b>1. Obtention des différents stades de <i>T. cruzi</i>.</b> .....	135
1.1. Souches parasitaires utilisées.....	135
1.2. Obtention des parasites <i>in vitro</i> .....	135
1.3. Cycle <i>in vivo</i> du parasite.....	136
<b>2. Obtention des lymphocytes.</b> .....	136
2.1. Milieu de culture des lymphocytes.....	136
2.2. Purification des lymphocytes.....	136
<b>3. Marquages radioactifs.</b> .....	137
3.1. Marquage à l'iodogène des antigènes de surface des trypomastigotes.....	137
3.2. Marquage métabolique des protéines de <i>T. cruzi</i> par la méthionine <sup>35</sup> S.....	137
3.3. Marquage de la sonde oligonucléotidique par le <sup>32</sup> P.....	138
<b>4. Purification des récepteurs parasitaires.</b> .....	138
4.1. Purification sur colonne d'Ultrogel gélatine.....	138
4.2. Purification sur colonne D'Ultrogel WGA.....	138
<b>5. Préparation et analyse des anticorps polyclonaux et monoclonaux.</b> .....	139
5.1. Préparation des sérums polyclonaux.....	139
5.2. Préparation des anticorps monoclonaux.....	139
5.3. Mesure de l'activité des anticorps.....	139

<b>6. Analyse immunochimique des antigènes parasitaires . . . . .</b>	<b>140</b>
6.1. Analyse en électrophorèse en gel de polyacrylamide.....	140
6.1.1. Coloration au nitrate d'argent.....	141
6.1.2. Immunoprécipitation des antigènes de <i>T. cruzi</i> . ....	141
<b>7. Analyse des molécules impliquées dans l'interaction parasite-cellule . . . . .</b>	<b>142</b>
7.1. Fixation du collagène sur les récepteurs parasitaires purifiées.....	142
7.2. Fixation du collagène marqué sur les trypomastigotes. ....	142
7.3. Fixation des antigènes parasitaires sur les lymphocytes.....	142
7.4. Fixation des antigènes parasite sur les lymphocytes en présence de fibronectine.	143
<b>8. Infection des lymphocytes par les trypomastigotes . . . . .</b>	<b>144</b>
8.1. Infection <i>in vitro</i> .....	144
8.2. Immunopéroxydase indirecte sur lame.....	144
8.3. Microscopie électronique. ....	145
8.4. Mesure de l'infection <i>in vitro</i> par l'incorporation d'hypoxanthine tritiée.....	145
8.5. Test d'hybridation moléculaire. ....	145
8.6. Mesure de l'infection des lymphocytes <i>in vitro</i> après activation. ....	147
8.7. Mesure de l'adhésion et de la pénétration du trypomastigote dans le lymphocyte. .	147
<b>9. Inhibition de l'infection <i>in vitro</i> par les anticorps . . . . .</b>	<b>148</b>
9.1. Inhibition de l'infection des fibroblastes par les anticorps.....	148
9.2. Inhibition de l'infection des lymphocytes par les anticorps monoclonaux.....	148
<b>10. Mise en évidence d'antigènes parasitaires à la surface des lymphocytes . . . . .</b>	<b>149</b>
10.1. Par immunoprécipitation.....	149
10.2. Par cytofluorimétrie en flux.....	149
<b>11. Evaluation des sous populations leucocytaires pendant la phase aiguë.....</b>	<b>150</b>

<b>12. Mesure de la cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante vis à vis des lymphocytes d'animaux infectés.</b> .....	151
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	153
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	165

## Fluorescence-Activated Cell-Sorting Analysis of Fibronectin Peptides Binding to *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes<sup>1</sup>

M. ALI OUAISSI,\*<sup>2</sup> J. P. KUSNIERZ,\* H. GRAS-MASSÉ,\*\* H. DROBECQ,\*\* P. VELGE,\*  
 J. CORNETTE,\* A. CAPRON,\* and A. TARTAR\*\*

\*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167—CNRS 624 and  
 \*\*Service de Chimie des Biomolécules, JE CNRS, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cédex, France

**ABSTRACT.** The binding of synthetic peptides modeled from the sequence of the cell attachment site of fibronectin to *T. cruzi* trypomastigote surface receptors was investigated by fluorescence-activated cell-sorting analysis using fluorescein-labeled peptides. Peptides with the sequence Arg-Gly-Asp-Ser bound to the parasite surface. A low percentage of fresh parasites recently liberated from infected fibroblasts had the capacity to bind the peptide. In contrast, these parasites showed a time-dependent several-fold increase in their ability to bind the Arg-Gly-Asp-Ser-containing peptides during extracellular incubation. From these observations, it appears that the expression of surface receptors on a particular, mature stage of the parasite parallels its ability to adhere to and infect host cells.

**R**ECENT studies in protozoan parasite biology have focused on the possible role of fibronectin (Fn) in the parasite-host cell interaction (5, 6, 12, 13). These studies provided initial support for the suggestion that Fn may be important in the attachment phase of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species to the host cell.

In the case of *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, we have recently identified a parasite surface component that could be the Fn receptor (7). On the other hand, Fn attachment to *T. cruzi* was found to be mediated by the important arginine-glycine-aspartic acid-serine (RGDS) tetrapeptide of the cell-binding domain of Fn (8).

*Trypanosoma cruzi* trypomastigotes occur in natural and experimental infections as a heterogeneous population (1). Until now, all the measurements we made were done using mixed in vitro culture forms. Therefore, a certain degree of variation would be expected in a mixed population, the effects of which are difficult to eliminate in simple, competitive, exclusion-binding assays with radiolabeled and unlabeled ligands. The experiments described in this report were designed (a) to confirm the previous results by the use of the fluorescence-activated cell sorter (FACS) and (b) to study the binding of RGDS-containing Fn peptides to the parasite surface in relation to the heterogeneity of the *T. cruzi* population.

### MATERIALS AND METHODS

**Parasites.** The Tehuantepec strain of *T. cruzi* was used throughout. Trypomastigotes were maintained in tissue culture by weekly infection of fibroblasts as described elsewhere (6). Parasite suspensions used in the present study consisted of 90% trypomastigotes and 10% amastigotes.

**Reagents.** Human plasma fibronectin (Fn) was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Fluorescein-labeled and non-labeled F(ab)<sub>2</sub> fragments of rabbit IgG anti-Fn were supplied by Cappel Laboratories (Cochranville, PA). Surface radioiodination of trypomastigotes, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and autoradiography of dried gels were performed following the methodology previously described (7).

The peptides (Table I) were synthesized by solid-phase methodology as described in our previous report (8). After gel filtration followed by preparation on a system of C18 reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC), we found

that each peptide (1, 2, and 3) had the expected amino acid composition by amino acid analysis and eluted as a major peak on a C18-reverse phase-HPLC in a linear gradient of acetonitrile/water/sodium phosphate solution, pH 2.5. The fluoresceinyl-peptides 4 and 5 were quantitatively obtained from peptides 1 and 3, respectively, by coupling to fluoresceinylisothiocyanate (10-fold excess) overnight in pyridine/water (2/1) at 4°C. Excess fluoresceinylisothiocyanate was then extracted from the reaction mixture with ethyl acetate. The aqueous phase was lyophilized, and the homogeneity of fluoresceinyl-peptides (FITC peptides) was checked by reverse phase HPLC. The lyophilized preparations contained more than 95% labeled peptides and less than 5% salts.

**Binding studies.** The binding of FITC peptides to *T. cruzi* trypomastigotes was performed as follows: trypomastigotes were fixed in 1 ml Hanks' balanced salt solution (HBSS) containing 1% formaldehyde for 1 h at 4°C and then washed three times in HBSS. Parasite suspensions (1–5 × 10<sup>6</sup> cells) in HBSS were incubated for 30 min at room temperature with the fluorescent synthetic peptide at various concentrations. After two washings, the parasite suspension was then analyzed by cytofluorometry. Treatments using Fn and the corresponding antibodies are indicated in Table II.

Stained parasite suspensions were analyzed for surface fluorescence using an Orthocytofluorograf 50 M (OrthoDiagnostic Systems, Westwood, MA) with two lasers (argon and helium-neon) focused at the same point.

Two optical parameters were used to determine the parasite population: the light scattered at narrow angles (argon laser at 488 nm) and the axial light loss (helium-neon laser). Fluorescence signals corresponding to the light-scattering characteristics of parasites were recorded to produce a histogram of parasites counted vs. fluorescence intensity.

The results are expressed as the percentage of parasites with a fluorescence intensity above the threshold obtained with the fixation of non-relevant fluorescent immunoglobulins.

### RESULTS AND DISCUSSION

As shown in Table II, the indirect immunofluorescence tests with the use of FITC-F(ab)<sub>2</sub> anti-Fn showed that the percentage

TABLE I. Sequences of the synthetic peptides tested.

1. Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys (Acm) <sup>a</sup>
2. Arg-Gly-Asp-Ser
3. Arg-Phe-Asp-Ser-Ala-Ala-Arg-Phe-Asp-Ser
4. Fluoresceinyl-Ala-Val-Thr-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys (Acm)
5. Fluoresceinyl-Arg-Phe-Asp-Ser-Ala-Ala-Arg-Phe-Asp-Ser

<sup>a</sup> Acetamidomethyl group.

<sup>1</sup> This work was supported by INSERM (U167), CNRS (624), and the UNDP: World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. We would like to thank Dr. R. Pierce for critical reading of the manuscript and C. Colson and M. F. Massard for secretarial assistance.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed.

## Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell–parasite interaction

P. VELGE, M. A. OUAISSI\*, J. CORNETTE, D. AFCHAIN  
and A. CAPRON

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U 167–  
CNRS 624, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur A. Calmette, 59019–Lille Cédex, France

(Accepted 21 April 1988)

### SUMMARY

We have shown here that collagen type I bound efficiently to the trypomastigote surface. In addition, monoclonal and polyclonal antibodies against collagen types I and III inhibited the infection of fibroblasts by the parasite. These results suggested the presence of collagen-binding protein(s) on the parasite surface. This protein was identified from trypomastigote surface antigens using affinity chromatography on a Gelatin Ultrogel column (denatured form of collagen). These collagen-binding proteins were revealed as a low-affinity gelatin binding protein (LAG Bp) of 98 kDa, and a high-affinity binding protein (HAG Bp) of 58 and 68 kDa under non-reducing and reducing conditions respectively. In addition, HAG Bp and LAG Bp bound to collagen type I. The 58/68 kDa protein was purified to homogeneity on a wheat germ agglutinin Sepharose column. A polyclonal antibody to this glycoprotein, as well as a monoclonal antibody (McAb) 155D3 produced against the HAG Bp, immunoprecipitated two parasite surface antigens of 160 and 58 kDa under non-reducing conditions which migrated at a position of 80–85 and 68 kDa when reduced. However, only the 80–85 kDa component could be precipitated from [<sup>35</sup>S] methionine-labelled trypomastigote antigens under reducing conditions. The antibodies to the 58/68 kDa glycoprotein as well as McAb 155D3 diminished the invasion of fibroblasts by parasites. Taken together these results suggest that the same receptor binds fibronectin and/or collagen and that both the 80–85 and 58/68 kDa glycoproteins form part of the same receptor. These trypomastigote surface molecules may interact with the host cell fibronectin and/or collagen during the initial phase of parasite–cell recognition.

### INTRODUCTION

The relationship of host and parasite membranes is of particular interest in the life-cycle of many parasitic protozoa, especially those that undergo growth and multiplication inside the host cell. Previous *in vitro* studies have established that *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease, can infect a variety of mammalian cells, but the extent of cell invasion varies with the *T. cruzi* strain and the cell type used (Piras, Piras & Henriquez, 1983). These observations suggest that although a high degree of specificity is not necessary for infection, a certain degree of recognition between the parasite and the host cell might occur as a pre-requisite for cell invasion by *T. cruzi* (Snary, 1985). In recent work it has been reported that cell surface fibronectin (Fn) could mediate the attachment of trypomastigote culture forms to fibroblasts (Ouaissi, Afchain, Capron & Grimaud, 1984; Ouaissi, Cornette & Capron, 1985; Wirth & Kierszenbaum, 1984). The fibronectin receptor of *T. cruzi* trypomastigotes has been identified as being an 80–85/68 kDa protein (Ouaissi, Cornette & Capron, 1986*b*). The involvement of the parasite fibronectin receptor in host cell recognition by the pathogen has also been studied. The association of parasite receptor with the ligand at the cell

\* Reprint requests to Dr M. A. Ouaissi.

## gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway

E. FISCHER,\* M. A. OUAISSI,† P. VELGE,† J. CORNETTE & M. D. KAZATCHKINE\* \*INSERM U28, Hôpital Broussais, Paris and †Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, Lille, France

Accepted for publication 11 May 1988

### SUMMARY

A glycoprotein of apparent molecular weight 58,000 (unreduced)/68,000 (in its reduced form) (gp 58/68), which is one of the fibronectin/collagen receptors of *Trypanosoma cruzi*, was purified to homogeneity from the trypomastigote forms of the Tehuantepec and Y strains of the parasite. Purified gp 58/68 inhibited formation of cell-bound and fluid-phase alternative pathway C3 convertase in a dose-dependent fashion, as assessed using purified human complement components. Gp 58/68 differed from the human regulatory proteins H, DAF, MCP and CR1 and from previously reported regulatory proteins on the parasite membrane in that it was unable to enhance decay-dissociation of preformed alternative pathway C3 convertase sites, did not serve as a co-factor for I-mediated cleavage of C3b and had no inhibitory activity on the classical pathway convertases. The inhibitory effect of gp 58/68 was most likely dependent on an interaction of the protein with factor B rather than with C3b. Gp 58/68 provides trypomastigotes with an additional potential mechanism for escaping complement lysis by the human alternative pathway.

### INTRODUCTION

Blood and tissue culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, are resistant to lysis mediated by human complement (Nogueira, Bianco & Cohen, 1975; Kipnis *et al.*, 1981) in contrast to the epimastigote forms (the major insect stage) of the parasite. The mechanisms by which trypomastigotes evade attack by the alternative complement pathway are not fully understood. Recent observations demonstrated that culture-generated metacyclic trypomastigotes (i.e. the infective stage which develops in the vector) and tissue culture-derived trypomastigotes produce factors that interfere with the function of classical and alternative pathway C3 convertases (Joiner *et al.*, 1987). These studies also indicated that the parasites shed into the culture medium a limited number of components ranging in MW from 87,000 to 155,000, the most

prominent molecules being 87-93,000, which accelerate the intrinsic decay of the alternative and classical pathway C3 convertases. By exhibiting these functions, the parasite proteins behave in an analogous manner to the human membrane regulatory protein, decay-accelerating factor (DAF).

We have been studying the mechanisms of *T. cruzi* trypomastigote-host cell recognition and the implication of host cell fibronectin and collagen in parasite attachment. The parasite receptor for fibronectin/collagen consists of two molecules of MW 80-85,000 and 58/68,000 (Ouaissi, Cornette & Capron, 1986; Velge *et al.*, 1988). These proteins are expressed on the parasite surface and are released in the culture medium (M. A. Ouaissi, J. Cornette, A. Taibi, P. Velge and A. Capron, manuscript submitted for publication). The use of affinity chromatography on Ultrogel-gelatin or wheatgerm agglutinin (WGA), enabled us to purify to homogeneity the 58/68,000 MW protein from the culture and blood forms of *T. cruzi* trypomastigotes. We now report that the parasite glycoprotein gp 58/68 inhibits formation of the cell-bound and fluid-phase alternative pathway C3 convertases. The protein has no inhibitory effect on classical pathway C3 convertase activity. Thus, multiple-acquired surface components contribute to prevent complement-mediated elimination of the trypomastigote form of the parasite.

### MATERIALS AND METHODS

#### Parasites

The Tehuantepec and Y strains of *T. cruzi* were used throughout

Correspondence: Dr E. Fischer, INSERM U28, Hôpital Broussais, Paris, France.

Abbreviations: BSA, bovine serum albumin; CMT, culture-derived metacyclic trypomastigote form; DAF, decay-accelerating factor; DGVB<sup>2+</sup>, half-isotonic GVB with 5% dextrose containing 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.15 mM CaCl<sub>2</sub>; DGVB-Ni<sup>2+</sup>, DGVB containing 0.05 mM NiCl<sub>2</sub>; EPI, epimastigote form; E<sup>s</sup>, sheep erythrocyte; E<sup>c</sup>C3b, C3b bearing E<sup>s</sup>; GVB, VBS containing 0.1% gelatin; GVB-EDTA, GVB containing 0.04 M EDTA; NP-40, Nonidet-P 40; NRS-EDTA, normal rat serum diluted in GVB-EDTA; PBS, phosphate-buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; VBS, veronal-buffered saline; WGA, wheatgerm agglutinin.

Ali Ouaisi,  
Jocelyne Cornette,  
Phillipe Velge and  
André Capron

Centre d'Immunologie et de Biologie  
Parasitaire, Unité Mixte INSERM  
U 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille

## Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas' disease: pathological implications\*

This report presents evidence that human acetylcholinesterase (AChE; acetylcholine hydrolase, EC 3.1.1.7) exhibits immunological cross-reactivity with the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. The immunological probes used indicate that the cross-reactive determinant is an oligosaccharidic epitope. Antibodies to AChE were detected in a high proportion of *T. cruzi*-infected patients sera and during the experimental infection of BALB/c mice. Moreover, anti-idiotypic antibodies against an anti-AChE rabbit antibody or a monoclonal antibody to a parasite surface antigen of 80–85 kDa were detected in sera of patients presenting the chronic cardiac form of the disease. The antibodies were less frequently found in sera from individuals with asymptomatic chronic infection. Our data may provide a biochemical basis for denervation hypersensitivity in Chagas' disease. In addition, it may support the notion of an idiotype-anti-idiotypic regulation of conducting tissue damage during the course of *T. cruzi* infection.

### 1 Introduction

*Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease is a parasitic protozoan that infects more than ten million people in South and Central America [1]. Chagas' disease is characterized by a heart defect and megaviscera in a proportion of patients, and these clinical signs are associated with extensive destruction of parasympathetic, enteric and other neurons, and degeneration of cardiac muscle [2]. Chagas' disease is often associated with the presence of autoantibodies (autoAb) against host tissues, including specialized components of striated muscle, neurons and connective tissue which make auto-immune reactions likely. Interestingly, a remarkable polyspecificity of the autoAb was observed. Indeed, the autoAb have been found to cross-react with animal erythrocytes [3] and structurally distinct basement membrane proteins such as laminin and nidogen [4].

Acetylcholinesterase (acetylcholine hydrolase, EC 3.1.1.7; AChE) is widely distributed in excitable membranes of nerve and muscle where it participates in the synaptic transmission [5]. AChE exists as a multiple molecular form that, based on physical properties, can be separated into two classes, the globular and the asymmetric. The occurrence of these asymmetric

forms often correlates with innervation and constitutes a major fraction of the esterase at neuromuscular junctions.

AChE hydrolyzes acetylcholine into acetate and choline, a process that provides a pool of choline for recycling. Several clinical situations seem to involve AChE. Indeed, the organophosphate poisoning, which induces an inhibition of AChE, results in paralysis of skeletal muscle and autonomic dysfunction [6]. In addition, congenital deficiency of AChE, leading to chronic neuromuscular disease, has been reported [7], and, recently, the presence of autoAb to human red blood cell AChE in sera from patients with thyroid autoimmunity has been reported [8]. In the case of *T. cruzi* infection, a considerable destruction and fibrosis of autonomic nervous system in the heart, oesophagus and colon occurs during the course of the disease [2].

The presence of AChE activity in *T. cruzi* soluble antigens (TcAg) has previously been reported by our laboratory [9]. The enzymatic activity could be specifically inhibited by eserine. This observation allowed us to investigate the relationship between the AChE and TcAg by using immunological and biochemical probes.

### 2 Materials and methods

#### 2.1 Source of parasites

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout this work. Trypomastigotes were maintained in tissue culture by weekly infection of fibroblasts as described elsewhere [10]. Trypomastigote soluble antigens were prepared as described [11].

#### 2.2 Polyclonal and monoclonal antibodies (mAb)

The mAb 155D3 is a purified Ab anti-*T. cruzi* trypomastigote surface polypeptide (80–85 kDa) of IgG<sub>1</sub> isotype [12]. It was produced after fusion of cells from BALB/c mice immunized with *Trypanosoma cruzi* (Tehuantepec strain)-purified proteins and the nonsecretory Sp2/0 myeloma cell line. Ascites fluids from mice injected with hybridoma cells were fraction-

[I 7045]

\* This work was supported by INSERM U 167, CNRS-624 and the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. This work was presented in part at the Joint Meeting of the British Society for Immunology and the French Society of Immunology, Paris, Centre des Congrès de la Villette April 7-8, 1988.

Correspondence: Ali Ouaisi, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue de Professeur Calmette, F-59019 Lille Cédex, France

Abbreviations: mAb: Monoclonal antibody(ies) PBS: Phosphate-buffered saline AChE: Acetylcholinesterase SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis BSA: Bovine serum albumin ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay Id: Idiotype(s) TcAg: *T. cruzi* trypomastigote soluble antigens AutoAb: Autoantibody(ies) RIA: Radioimmunoassay

## Infection des lymphocytes T par *Trypanosoma cruzi*. Rôle possible du CD3 et du HLA-DR

Philippe VELGE, Ali OUAISSI, Jean-Pierre KUSNIERZ et André CAPRON

**Résumé** — Les mécanismes par lesquels *Trypanosoma cruzi*, l'agent responsable de la maladie de Chagas, échappe à la réponse immune de l'hôte, sont très importants mais peu connus. Les résultats présentés montrent pour la première fois que les trypomastigotes de *T. cruzi* peuvent infecter les lymphocytes T *in vitro* et *in vivo* et que les parasites libérés par les lymphocytes sont infectieux pour d'autres types cellulaires. D'autre part des AcMc anti CD3 et anti HLA-DR inhibent de façon significative l'infection parasitaire. La détection d'antigènes parasitaires à la surface de lymphocytes infectés suggère que ces cellules pourraient être la cible des mécanismes cytotoxiques. Ces résultats pourraient ainsi avoir une grande importance pour la compréhension des mécanismes responsables de la forte perturbation de la réponse immune observée lors de la phase aiguë de la maladie de Chagas et pourraient, de façon générale apporter des informations supplémentaires sur l'infection des lymphocytes par les agents pathogènes.

### Infection of T lymphocytes by *Trypanosoma cruzi*. Possible role of CD3 and HLA-DR antigens

**Abstract** — The mechanisms by which the causative agent of Chagas' disease impair its host's immune response are of paramount importance but poorly understood. Results presented in this paper show for the first time that *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes infect T lymphocytes *in vitro* and more interestingly *in vivo*, and that trypomastigotes released from infected cells are infectious. In addition treatment of purified human T lymphocytes with McAb against CD3 and HLA-DR antigens significantly inhibited parasite infection. *T. cruzi* antigens were detected on the membrane of infected T cells and could therefore represent targets for cytotoxic mechanisms. These results might have important consequences for the understanding of the dramatic disruption of immune response observed during Chagas' disease and more generally provide additional information on T lymphocyte infection by pathogens.

**Abridged English Version** — In the present report we studied how purified T or B cells could be affected during cultivation with *T. cruzi*. The results presented here demonstrate for the first time that trypomastigotes can infect and multiply inside T lymphocytes. Parasites incubated with cells overnight at 37°C were able to infect about 3% of T lymphoma cells (Jurkat and MOLT4) and 2% of purified mouse or human T lymphocytes but not B lymphoma cells (U266, L.I.C.R., SP<sub>2</sub>O). These infection levels were consistent with the observations of Mosca *et al.* [9] with polymorphonuclear cells (PMN). The infection of T cells was also studied by electron microscopy. The infected human cells were negative with the  $\alpha$  naphthyl acetate esterase test (Sigma, procedure No. 91) indicating that these cells were not monocytes. Moreover, infected cells were labelled using anti-Thy 1.2 monoclonal antibody (McAb) and peroxydase conjugated anti-mouse immunoglobulins. Our morphological observations were confirmed by the development of a quantitative method using incorporation of <sup>3</sup>H labelled hypoxanthine by intracellular parasites as shown in Figure 1.

Infection of T cells *in vivo* was examined in *T. cruzi* infected BALB/c mice during the acute phase. As shown in Figure 2, the level of T cell infection seems to be related to the parasitemia. Moreover, it appears that the infection rate of T lymphocytes in the spleen is similar to that observed with PMN or macrophages. In lymph nodes where trypomastigotes were not resident the infection level of T cells is lower. However, this result may suggest that these infected cells could serve to disseminate the infection systemically.

Note présentée par André CAPRON.



# Characterization of major surface and excretory–secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen

M. A. OUAISSI<sup>1</sup>\*, A. TAIBI<sup>1</sup>, J. CORNETTE<sup>1</sup>, P. VELGE<sup>1</sup>, B. MARTY<sup>1</sup>, M. LOYENS<sup>1</sup>, M. ESTEVA<sup>2</sup>, F. S. RIZVI<sup>1</sup> and A. CAPRON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167 CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille, France

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Diagnostico e Investigacion de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, Argentina

(Accepted 27 July 1989)

## SUMMARY

The surface antigens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes were identified by immunoprecipitation and were compared with metabolically labelled excretory–secretory products (ES) released by the parasites *in vitro*. A series of major immunogenic components in the ES antigens were revealed (160 kDa, 130 kDa and 80–110 kDa). The trypomastigote surface also bears the 130 kDa band and the 80–110 kDa complex. Competition experiments demonstrated the common antigenic structure of the ES and the surface antigens. Two-dimensional analysis of ES antigens immunoprecipitated by human Chagasic serum revealed several spots in the 80–110 kDa region with a wide range of isoelectric points (PI between 5.4 and 6.7). This reflects a charge heterogeneity of these polypeptides. The trypomastigote 85 kDa polypeptide was also identified in the ES antigens by using a monoclonal antibody against this antigen. Two-dimensional analysis of the 85 kDa proteins shed from the surface of trypomastigotes and immunoprecipitated by the monoclonal antibody 155D3 showed 2 major spots: a major part of the 85 kDa polypeptide was found at pH 6.5–6.6, whereas a substantial amount of the antigen was found at pH 5.7. An additional component with molecular weight of approximately 58 kDa and isoelectric points of 6.5 and 6.6, was also visualized. Detection of the 85 kDa polypeptide circulating in serum from patients with acute and chronic Chagas' disease was achieved using an enzyme-linked immunosorbent assay. In addition, the data obtained showed that a polyclonal antibody to the 85 kDa polypeptide could be used to passively induce a partial protection of Fischer rats against acute lethal infection. Thus, the antigens recognized by polyclonal antibody appear to play a role in the development of protective immunity against *T. cruzi*.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, 85 kDa polypeptide, excretory–secretory antigens.

## INTRODUCTION

Chagas disease, caused by a protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is estimated to affect 10–12 million people in Central and South America (Brenner, 1982). The importance of *T. cruzi* in human health has considerably stimulated research on the identification and isolation of parasite antigens which could be used in serological tests for the detection of *T. cruzi*-specific antibodies or as a vaccine candidate (Dragon *et al.* 1985; Scharfstein *et al.* 1983; Schecher *et al.* 1983; Araujo, 1986). Immunological analysis of cell surface and cytoplasmic antigens of *T. cruzi* has led to the identification of species- and stage-specific antigens, and the production of monoclonal antibodies (Andrews, Katzin & Colli, 1984; Beard, Wrightsman & Manning, 1985). Some monoclonal antibodies have been useful for clinical diagnosis (Orozco *et al.* 1984). However, little work has been reported concerning the products released by the parasite (Joiner *et al.* 1987; Affranchino *et al.* 1989).

Most of the contributions during the recent years

demonstrated that in many parasitic organisms, the antigenic character is a dynamic process. Indeed, in the case of *T. cruzi*, surface antigens were analysed by various investigators (see review by Snary, 1985). There are changes in surface membrane properties for various developmental stages of the parasite. There is, however, no evidence of antigenic variation during the infection. Nevertheless, a high degree of polymorphism between different *T. cruzi* strains and clones has been demonstrated (Nussenzweig, Deane & Kloetzel, 1963; Plata, Garcia-Pons & Eisen, 1984). This variation could be one of the factors among others that contribute to the capacity of *T. cruzi* to bypass the host's immune response.

The excretory–secretory products of *T. cruzi* trypomastigotes (ES) may provide antigenic stimulation leading to host-immune responses; alternatively, they may allow the parasite to avoid the effects of host immune responses. An example of this is the regulatory effect of certain ES antigens of trypomastigotes on C3 convertase formation (Joiner *et al.* 1987; Fischer *et al.* 1988). The ES products of *T. cruzi* may provide a valuable source of antigens for the immunodiagnosis and/or vaccination against the infection.

\* Reprint requests to: Dr M. A. Ouaisi

