

50376
1992
163

50376
1992
163

N° d'Ordre : 949

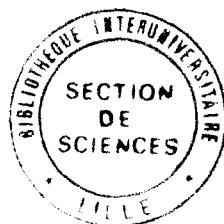
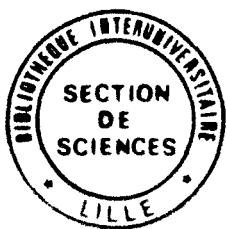
UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE

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
option : Immunologie

par

Ali TAIBI

Approche moléculaire de la maladie de Chagas :
contribution à l'identification des antigènes de sécrétion
de *Trypanosoma cruzi* ayant des potentialités
diagnostiques et/ou vaccinantes



1992

Présentée le 29 Juin devant la commission d'examen

Membres du jury :

| | |
|----------------|--------------------------|
| Président : | Professeur A. Verbert |
| Rapporteurs : | Professeur H. Gras-Masse |
| | Docteur G. Milon |
| Examinateurs : | Professeur A. Capron |
| | Professeur G. Spik |
| | Docteur A. Ouassis |

00000000000000000000000000000000

*A la mémoire de
mes parents,*

à ma famille,

à mes amis,

Ce travail a été réalisé :

Au centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM U167-CNRS 624

Institut Pasteur de Lille

1, Rue du Professeur Calmette, 59019 Lille cédex

sous la direction du Professeur André Capron et dans le groupe du Docteur Ali Ouaïssi, avec le collaboration étroite du groupe dirigé par le Professeur André Tartar.

A Monsieur le Professeur André Capron,

membre de l'Académie des Sciences

Vous m'avez accueilli dans votre laboratoire et honoré de votre confiance .

Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur André Verbert,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Geneviève Milon,

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour avoir accepté de juger ce travail.

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

A Madame le Professeur Hélène Gras-Masse,

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 Madame le Professeur Geneviève Spik,

qui a bien voulu accepter de participer à ce jury de thèse.

Soyez assurée de toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Ali Ouaïssi,

Je tiens à vous remercier de toute l'attention que vous avez portée à la réalisation de ce travail, votre disponibilité de chaque instant et pour les moments d'enthousiasme partagés.

Je tiens à remercier tous les membres du groupe qui m'ont soutenu, conseillé et aidé tout au long de ce travail :

Béatrice Plumas-Marty

Ralf Schöneck

Philippe Velge

Je ne finirai pas sans présenter mes remerciements à Madame Jocelyne Cornette et Monsieur Marc Loyens pour leur aide technique, l'efficacité et l'enthousiasme qu'ils ont manifestés tout au long de ces années passées ensemble. Je tiens à remercier Monsieur Marc Bossus pour toute l'aide technique présentée.

A tous ceux et celles qui ont apporté leur contribution ou leur soutien à ce travail :

Le Docteur D. Afchain, pour ce qu'il m'a appris dans le domaine de la parasitologie, et pour ses conseils scientifiques.

Le Docteur J. Khalife, pour les critiques apportées dans la rédaction de ce manuscrit.

Le Docteur M. Chameck, pour les débats et échanges fructueux qui ont accompagné la réalisation de ce travail. Avec toute mon amitié.

Mademoiselle O. Boyer, pour la lecture attentive de ce mémoire.

Un grand **MERCI** pour tout le personnel du laboratoire qui a alimenté nos besoins bibliographiques et assuré les tâches administratives :

Silvie-Anne, Nadine, Claudine, Maria, Jackelyne, et Christian.

Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS

M.A. Ouaissi, **A. Taibi**, J. Cornette, P. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F. Rizvi, & A. Capron. 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology*. **100**:115-124.

U. Martin, **A. Taibi**, M. Loyens, C. Maidana, J. Cornette, C. Candioti, A. Marteleur, D. Afchain, B. Marty, P. Velge, A. Ouaissi, & A. Capron. 1990. *Trypanosoma cruzi* : IgM antibodies to 84 kDa polypeptide epitope as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Medecine Science Research*. **18**:725-726.

M.A. Ouaissi, J.F. Dubremetz, J.P. Kusnierz, J. Cornette, M. Loyens, **A. Taibi**, B. Marty, P. Velge, F. Rizvi, & A. Capron. 1990. *Trypanosoma cruzi* : Differential expression and distribution of an 85-kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Experimental Parasitology*. **71**:207-217.

M.A. Ouaissi, **A. Taibi**, M. Loyens, U. Martin, D. Afchain, C. Maidana, J. Cornette, A. Martelleur, P. Velge, B. Marty, & A. Capron. 1991. *Trypanosoma cruzi* : A carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *American Journal of*

Tropical Medecine and Hygiene. **45:**214-225.

B. Plumas-Marty, C. Verwaerde, M. Loyens, P. Velge, **A. Taibi**, M.F. Cesbron, A. Capron, & M.A. Ouaissi. 1992. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins : immunogenicity during human and experimental Chagas' disease. *Parasitology*. **104**:87-98.

A. Ouaissi, T. Aguirre, B. Plumas-Marty, M. Piras, R. Schöneck, H. Gras-Masse, **A. Taibi**, M. Loyens, A. Tartar, A. Capron, & R. Piras. 1992. Cloning and sequencing of a 24 kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biology of the Cell*. **74** (in press).

A. Taibi, B. Plumas-Marty, H. Pessoa, R. Schöneck, M. Loyens, R. Piras, T. Aguirre, H. Gras-Masse, M. Bossus, A. Tartar, A. Capron, & A. Ouaissi. *Trypanosoma cruzi* : immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of peptide sequence with protective activity. Soumis à *Journal of Immunology*.

B. Plumas-Marty, **A. Taibi**, H. Pessoa, M. Loyens, C. Verwaerde, V. Pommier, P. Velge, A. Ouaissi, & A. Capron. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: protection induced by native proteins in experimental model and analysis of the antibody response. Soumis.

B. Plumas-Marty, R. Schöneck, **A. Taibi**, J. Plumas, C. Verwaerde, M. Loyens,
V. Pommier, H. Gras-Masse, E. Diesis, A. Tartar, A. Capron, & A. Ouaissi.
Molecular cloning of *Trypanosoma cruzi* proteins of 30 and 25 kDa homologous
to elongation factors 1 β . Soumis.

COMMUNICATIONS .

A. Ouaissi, **A. Taibi**, J.F. Dubremetz, B. Marty, J. Cornette, M. Loyens, P. Velge, J.P. Kusnierz, F. Rizvi, & A. Capron. *Trypanosoma cruzi* : differential expression and distribution of the 85 kDa polypeptide by *in vitro* developmental stages.

Caxambu (Brazil), *Memorias do Instituto Oswaldo cruz* **84**, suppl. II. 1989.

A. Taibi, A. Ouaissi, J.F. Dubremetz, B. Marty, J. Cornette, M. Loyens, P. Velge, J.P. Kusnierz, F. Rizvi, & A. Capron. *trypanosoma cruzi* : differential expression and distribution of the 85 kDa polypeptide by *in vitro* developmental stages.

Congrès International de Parasitologie (ICOPA VII), Paris, 20-24 Août 1990.

M.A. Ouaissi, J. Cornette, B. Marty, P. Velge, **A. Taibi**, & A. Capron.
Trypanosoma cruzi : des fragments de clivage de la fibronectine induisent une différenciation des trypomastigotes *in vitro*.

Congrès International de Parasitologie (ICOPA VII), Paris, 20-24 Août 1990.

B. Plumass-Marty, **A. Taibi**, H. Pessoa, M. Loyens, A. Ouaissi, & A. Capron.
Immunoprotection against acute murine Chagas' disease using *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP).

Trypanosomiasis Seminar (colloque International), Anvers (Belgique), 11-13 Décembre 1991.

R. Schöneck, B. Marty, **A. Taibi**, M. Loyens, A. Capron, & A. Ouaissi.
Identification of *Trypanosoma cruzi* proteins with acetylcholinesterase activity.
Trypanosomiasis Seminar (Colloque International), Anvers (Belgique), 11-13 Décembre 1991.

A. Taibi, B. Plumass-Marty, H. Pessoa, M. Loyens, A. Capron, & A. Ouaissi.
Trypanosoma cruzi : immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens.
Trypanosomiasis Seminar (Colloque International), Anvers (Belgique), 11-13 Décembre 1991.

A. Ouaissi, J. Cornette, B. Plumas-Marty, A. Taibi, P. Velge, R. Schöneck, & A. Capron. Molecular aspect of *Trypanosoma cruzi* interaction with host cell and parasite differentiation mechanisms.

Trypanosomiasis Seminar (Colloque International) , Anvers (Belgique), 11-13 Décembre 1991.

VALORISATION :

- 1-** Dépôt de souche de l'hybridome VG3/G11 à la collection nationale de cultures de microorganismes : dossier proposé à Pasteur Sanofi Diagnostics.
- 2-** Projet de dépôt d'une demande de brevet de la séquence peptidique protectrice.

SOMMAIRE

| | Page |
|--|------------|
| RESUME | 13 |
| ABREVIATIONS | 15 |
| INTRODUCTION | 16 |
| GENERALITES | 19 |
| TRAVAUX PERSONNELS | 85 |
| DISCUSSION ET CONCLUSION | 160 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 177 |
| TABLE DES MATIERES | 195 |

RESUME

La maladie de Chagas causée par *Trypanosoma cruzi*, connaît une évolution en deux étapes : une phase aiguë suivie d'une phase chronique. Le bon contrôle de cette affection réside dans le développement de techniques de diagnostic spécifiques et sensibles, et nécessite la recherche de protéines à potentialités vaccinantes. Dans le présent travail, nous avons d'abord caractérisé les immunogènes majeurs parmi les ESA des formes trypomastigotes, et tenter de développer une technique de diagnostic de la phase aiguë de la maladie. Les résultats obtenus ont abouti à la mise au point d'un test appelé SCCA, fondé sur la détection de complexes immuns circulants IgM, IgA et IgG dans les sérums de patients, et dont l'utilisation pourra être envisagée en zones d'endémie.

Les ESA ont également été utilisés dans des protocoles d'immunisation en association avec *Bordetella pertussis* comme adjuvant, afin d'évaluer leur pouvoir protecteur. Dans les deux modèles expérimentaux utilisés, la souris BALB/c et le rat Fischer, des niveaux de protection significatifs ont été obtenus. L'analyse de la réponse isotypique spécifique montre une prédominance des anticorps IgG1, IgG2a et IgG2b. Ces anticorps réagissent majoritairement vis-à-vis de deux composants de 85 et 24 kDa, et sont lytiques *in vitro* en présence du complément vis-à-vis des formes infectantes.

Le clonage et le séquençage de la molécule de 24 kDa a été réalisé. Sa localisation paraît être différente d'un stade parasitaire à un autre. Les peptides

20-40 et 109-124 dérivés de la séquence ont été testés pour leur pouvoir protecteur éventuel chez la souris. Seul le peptide 109-124 est capable d'induire une protection significative contre une infection léthale. Une étude plus approfondie des mécanismes humoraux et/ou cellulaires impliqués dans cette protection, est nécessaire. Elle permettra également de mieux définir le type de réponse suscitée par le peptide 109-124, et d'envisager des constructions et des protocoles tels qu'ils soient capables de favoriser cette réponse.

ABREVIATIONS

ADCC : cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante

BpAI : *Bordetella pertussis* et de l'alum

CD : Cluster de differentiation (déterminant antigénique présent à la surface des leucocytes)

ConA : concanavaline A

ELISA : "Enzyme Linked Immunosorbant Assay"

ESA : antigènes excrétés-sécrétés

EVI : Endothelial Vascular Interstitial

GP : glycoprotéine

IFA : test d'immunofluorescence indirecte

Ig : immunoglobuline

IL2 : interleukine 2

kDa : kilodalton

LPS : lipopolysaccharide

MAb : anticorps monoclonal

PBS : tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM

p24 : protéine parasitaire de 24 kDa

SCCA : test de capture des complexes immuns dans les sérum

INTRODUCTION

Si à l'heure actuelle, l'homme a réussi à contrôler diverses infections bactériennes et virales grâce à la découverte de vaccins appropriés, le développement de vaccins contre les maladies parasitaires humaines reste cependant un espoir à défier. De plus, le nombre de sujets exposés à ces affections connaît une augmentation progressive due à la croissance régulière et rapide de la population vivant dans les zones d'endémie où les mesures de lutte sont hélas insuffisantes ou parfois inexistantes.

La maladie de Chagas représente l'une des affections parasitaires reconnues comme prioritaires par l'organisation mondiale de la santé. Etant donné les diverses voies de transmission du parasite responsable *Trypanosoma cruzi*, l'expansion de la maladie commence à prendre de l'ampleur dans certains pays jusqu'à indemniser de cette infection.

Les méthodes de diagnostic de cette affection sont de deux ordres :

- Des techniques basées sur la recherche de parasites dans la circulation sanguine de l'hôte. Ces tests ne sont pas toujours rapides et nécessitent de fortes infestations pour être significants.
- Des méthodes d'immunodiagnostic basées généralement sur la détection d'anticorps spécifiques en réponse à l'infection. Ces techniques posent parfois des problèmes de manque de sensibilité et ne permettent pas toujours de dépister des cas d'infection précoce.

Ainsi, récemment l'intérêt s'est focalisé sur la mise en évidence d'antigènes parasitaires dans le sang et les urines de malades infectés. Le développement de ce type de test permettra l'amélioration de la spécificité du diagnostic mais aussi une meilleure évaluation de l'effet de certains traitements chimiothérapeutiques et un bon contrôle de la propagation de la maladie.

La lutte contre cette infection passe par l'élimination de l'insecte vecteur avec l'utilisation d'insecticides et de pesticides. Cependant, ces moyens ne sont pas toujours efficaces à long terme, peuvent entraîner des modifications de l'écosystème et parfois même l'émergence de vecteurs résistants. De plus, le traitement chimiothérapeutique peut avoir des effets secondaires sur le patient et ne prévient pas contre une réinfection.

Ainsi, le moyen le plus efficace réside dans l'identification de protéines à potentialités protectrices pouvant constituer un vaccin permettant à l'homme de bien lutter contre l'infection et les conséquences immunopathologiques qu'elle engendre.

GENERALITES

**SUR LA
MALAIDE
DE CHAGAS**

**I. QU'EST CE QUE
LA MALADIE DE CHAGAS ?**

I.1. Qui a découvert la maladie de Chagas ? :

En 1909, alors qu'il était en mission pour une enquête épidémiologique dans la région de Lassance au Brésil, Carlos Chagas fût le premier homme à découvrir le parasite responsable de la maladie de Chagas et le nomma d'abord *Schizotrypanum* avant de l'appeler *Trypanosoma cruzi* en hommage à son maître Oswaldo Cruz. Le même auteur a découvert alors par la suite le vecteur, a décrit le cycle du parasite et défini les formes cliniques aiguë et chronique de la maladie (CHAGAS 1911), une affection qui compte actuellement 16 à 18 millions le nombre d'individus atteints avec une population à risque représentée par 90 millions d'individus (OMS 1988).

Ainsi, la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine résulte de l'infestation par *T. cruzi*, un protozoaire flagellé de la famille des trypanosomatidae, de l'ordre des Kinetoplastidae, sous-groupe des Schizotrypanum.

I.2. Cycle évolutif du parasite :

Pour accomplir son cycle, *T. cruzi* nécessite la présence d'un insecte vecteur représenté généralement par le triatome du groupe des réduvidés, et d'un hôte vertébré définitif représenté par l'homme ou encore par des animaux domestiques ou sauvages constituant le réservoir du parasite (Fig. 1).

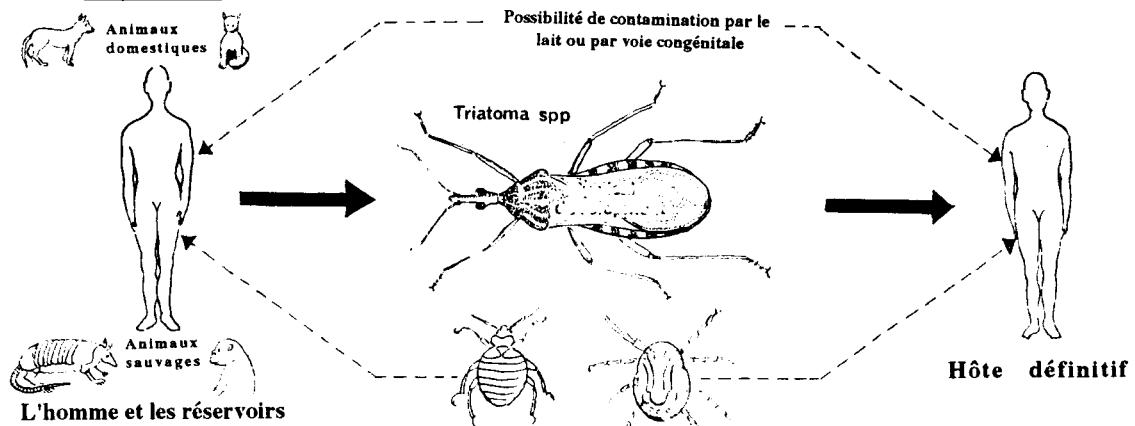
Chez le vecteur, le parasite se multiplie sous la forme non infectante épimastigote qui va subir des changements morphologiques et biochimiques pendant sa migration dans le tube digestif de l'insecte. Ces formes épimastigotes vont s'attacher à la paroi de l'intestin de l'insecte avant de se transformer au niveau du rectum en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes pour l'homme et les animaux et sont transmises par les déjections du triatome (Fig. 1A). Ce processus de différenciation est connu sous le nom de métacyclogenèse.

Chez l'hôte vertébré, le parasite se développe sous la forme trypomastigote dans le sang circulant et infeste différents types de cellules : fibroblastes, macrophages et cellules musculaires (Fig. 1B). Récemment, les lymphocytes T ont été également décrits comme cellules hôtes du parasite (VELGE et coll. 1991). Le parasite se multiplie par division binaire à l'intérieur des cellules sous la forme amastigote qui va se transformer de nouveau en trypomastigote après éclatement des cellules hôtes. Les trypomastigotes libérés dans la circulation ne se multiplient pas et peuvent aller infester d'autres cellules. Les parasites restés dans le sang périphérique peuvent être prélevés par l'insecte vecteur hématophage lors d'un repas sanguin et vont se différencier rapidement dans le tube digestif de l'insecte en formes épimastigotes.

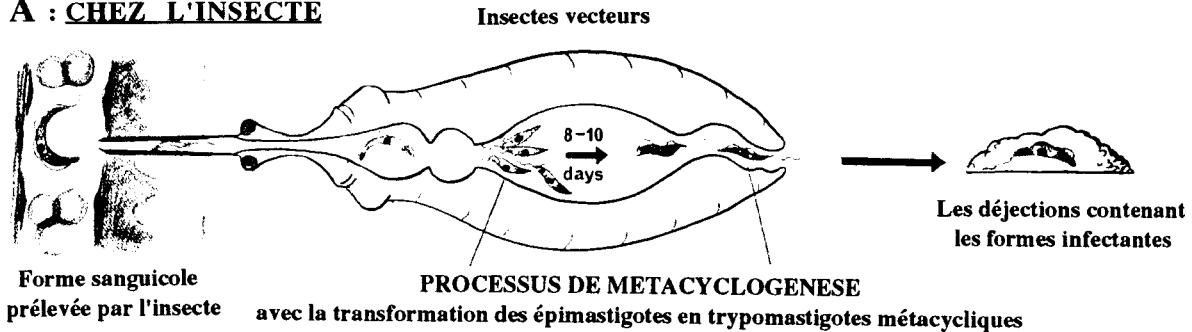
Toutefois, il est important de souligner que le cycle de ce parasite n'est pas parfaitement connu. Actuellement, beaucoup d'auteurs s'intéressent à l'étude de la métacyclogenèse et aux différentes formes parasitaires susceptibles d'infecter les cellules de mammifères. PIRAS et coll. (1982) ont montré qu'à partir des

CYCLE EVOLUTIF DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

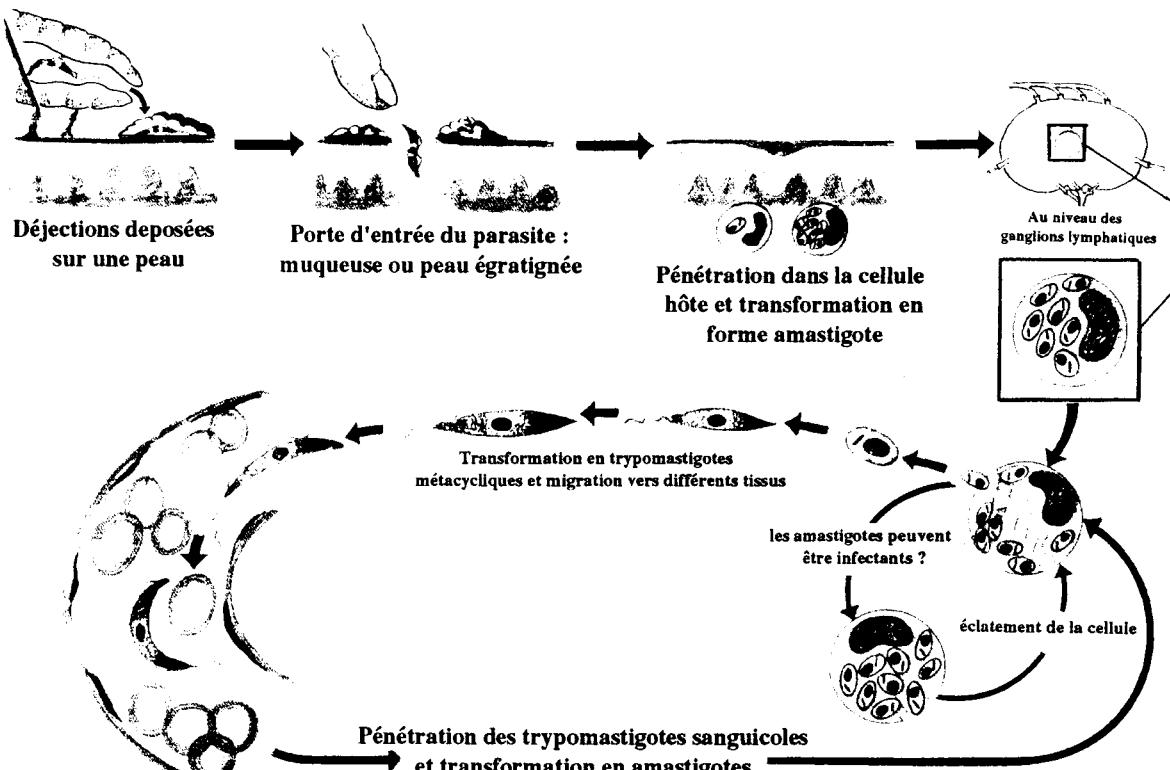
ASPECTS GENERAUX DU CYCLE



A : CHEZ L'INSECTE



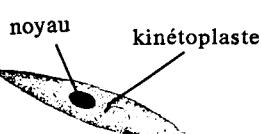
B : CHEZ L'HOMME



C : MORPHOLOGIE

La forme trypomastigote rencontrée dans la circulation de l'hôte

La forme intracellulaire : amastigote



trypomastigotes de culture, on peut obtenir *in vitro* des formes rondes similaires aux formes amastigotes intracellulaires mais non identiques. Ces formes portent le nom de sphéromastigotes et possèdent un pouvoir infectieux 4 à 12 fois plus important que celui des trypomastigotes provenant de cellules après leur éclatement. D'autres auteurs ont montré par ailleurs que même les formes amastigotes ne représentent pas uniquement des formes de multiplication du parasite mais sont également capables d'infester des monocytes et des fibroblastes (LEY et coll. 1988).

I.3. Morphologie :

En fonction de la localisation du parasite, sa morphologie change selon qu'il se trouve dans le sang ou les tissus des vertébrés ou encore dans le tube digestif de l'insecte vecteur (Fig. 1-C).

- Dans le sang circulant, deux formes de trypomastigotes de mobilité et taille différentes sont à distinguer : une forme rapide de 1 µm de largeur et une forme lente de 2 µm de largeur. Elles possèdent un kinétoplaste en position postérieure par rapport au noyau, une membrane ondulante et une longueur de 20 µm.
- Dans certains tissus de l'hôte vertébré, principalement les fibres musculaires et les cellules du système réticuloendothélial, on retrouve les amastigotes de forme ronde de 4 µm de diamètre. Ces formes parasitaires se multiplient par division binaire avec un temps de dédoublement variable selon la souche de parasite et la

température, et qui peut aller de 7 à 14 heures.

- Enfin les épimastigotes de forme en fuseau de 20 à 40 µm de longueur. Elles se multiplient dans l'intestin moyen de l'insecte et possèdent un kinétoplaste antérieur par rapport au noyau.

I.4. Souches de *T. cruzi* :

En plus des différences morphologiques et biochimiques existant entre les stades de développement du parasite, *T. cruzi* comporte plusieurs souches présentant des comportements biologiques et des caractéristiques d'infection différents, à savoir le développement de la parasitémie, la durée de la période d'incubation et la mortalité.

Si l'analyse des profils isoenzymatiques (zymodèmes) a apporté plus de précision ces dernières années dans l'étude des différentes souches parasitaires, il n'est cependant pas encore bien établi qu'à un zymodème donné corresponde une pathologie précise. On a noté par ailleurs que toutes les souches de *T. cruzi* ne possèdent pas le même tropisme tissulaire. C'est ainsi que l'on a qualifié de myotropes les souches présentant une affinité pour le tissu musculaire c'est l'exemple de la souche CL, et de réticulotropes les souches à affinité plutôt pour les cellules du système réticuloendothélial et c'est l'exemple de la souche Y. Cependant, certaines données actuelles indiquent que la souche Y peut avoir également une localisation musculaire (Fig. 2), ce qui remet en question le principe de classification basé sur le tropisme tissulaire.

I.5. Mode de transmission :

Dans plus de 80% des cas, la maladie de Chagas est transmise par le contact des déjections des triatomidés infectés avec une surface égratignée ou une muqueuse. Cependant d'autres voies de contamination constituant un danger réel sont à considérer.

Depuis quelques années, la transmission par transfusion sanguine pose un nouveau problème en zone endémique et hors zone endémique. En effet, si la zone d'endémie de cette affection est représentée par différents pays d'Amérique du Sud et Centrale avec une prédominance du nombre d'individus atteints particulièrement au Brésil, Venezuela et au Mexique (Tableau 1), des cas de maladie de Chagas aiguë ont été récemment décrits aux Etats-Unis et au Canada à la suite de transfusion sanguine chez des individus immunodéprimés (GRANT et coll. 1989, NICKERSON et coll. 1989). Par la suite, l'identification des donneurs de sang en question a indiqué leur provenance de zone endémique (Bolivie et Paraguay).

La maladie peut être également transmise par voie transplacentaire, à l'occasion de greffes d'organes ou lors d'accidents de laboratoire.

Ainsi, pour la maîtrise et le contrôle de la propagation de la maladie, il est nécessaire de développer des techniques de diagnostic spécifiques et sensibles, et de disposer d'additifs appropriés (Le violet de gentiane est le plus habituellement utilisé) permettant d'éliminer les parasites du sang.

Tableau 1. Prévalence de la maladie de Chagas.

| Country | Total population (millions) | % Rural | Estimated cases (millions) | Main vector |
|--------------|--------------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------|
| Argentina | 26.393 | 21 | 2.640 | <i>T. infestans</i> |
| Belize | 0.145 | ND | 0.003 | <i>T. dimidiata</i> |
| Bolivia | 4.647 | 77 | 1.858 | <i>T. infestans</i> |
| Brazil | 119.024 | 36 | 6.340 | <i>T. infestans</i> |
| Chile | 10.857 | 20 | 0.367 | <i>T. infestans</i> |
| Colombia | 26 | 29 | 1.217 | <i>R. prolixus</i> |
| Costa Rica | 2.110 | 59 | 0.130 | <i>T. dimidiata</i> |
| Ecuador | 6.521 | 58 | 0.180 | <i>T. dimidiata</i> |
| El Salvador | 4.300 | 60 | 0.322 | <i>T. dimidiata</i> |
| Fr. Guyana | 0.080 | ND | 0.021 | <i>R. pictipes?</i> |
| Guatemala | 7.110 | 64 | 0.730 | <i>T. dimidiata</i> |
| Guyana | 0.835 | 73 | 0.208 | <i>R. prolixus?</i> |
| Honduras | 3.400 | 68 | 0.213 | <i>R. prolixus</i> |
| Mexico | 69.950 | 34 | 3.798 | <i>T. barberi</i> |
| Nicaragua | 2.400 | 52 | 0.114 | <i>T. dimidiata</i> |
| Panama | 1.630 | 49 | 0.226 | <i>R. pallescens</i> |
| Paraguay | 2.880 | 56 | 0.397 | <i>T. infestans</i> |
| Peru | 16.800 | 42 | 0.643 | <i>T. infestans</i> |
| Suriname | 0.352 | ND | 0.147 | <i>R. pictipes?</i> |
| Uruguay | 2.886 | 17 | 0.278 | <i>T. infestans</i> |
| Venezuela | 13.913 | 30 | 4.865 | <i>R. prolixus</i> |
| Total | 322.233 | 36 | 24.697 | |

D'après Englund P.T. et A. Sher. (1988).

I.6. Moyens de lutte et traitement :

I.6.1. Lutte anti-vectorielle:

Il existe plus d'une centaine d'espèces d'insectes hématophages vecteurs de *T. cruzi* dont les principales sont représentées par des triatomes appartenant au genre *Triatoma*, *Rodnus*, et *Panstrongylus*. Ces insectes peuvent se rencontrer à l'intérieur et autour des habitations rurales.

Actuellement, la stratégie de lutte entreprise repose sur l'utilisation de peintures insecticides et de cartouches fumigènes, des traitements qui ont fait leur preuve ces dernières années dans certains pays d'Amérique latine (Brésil, Argentine, Venezuela, Uruguay). D'autre part, sur le plan social, l'amélioration de l'habitat et l'éducation de la population des zones rurales peuvent renforcer ce processus et aider à l'élimination du vecteur.

I.6.2 Traitement :

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement efficace contre l'infection par *T. cruzi*. De plus, ce parasite présente la caractéristique d'être résistant aux drogues utilisées dans le cas de la trypanosomiase africaine et de certaines formes de leishmaniose. Actuellement, le traitement de la maladie de Chagas est basé sur l'utilisation de deux produits chimiques :

Le nifurtimox, trypanocide utilisé lors de la phase aiguë de la maladie. Il est d'autant plus efficace qu'il est administré précocement après le moment de

l'infection.

Le benznidazole est utilisé comme traitement plutôt lors de la phase chronique de la maladie.

Cependant, ces deux produits sont responsables d'effets secondaires correspondant à des atteintes digestives, insomnies et neuropathies périphériques.

I.7. Symptomatologie :

Chez l'homme, la maladie de Chagas se déroule en deux phases principales : la phase initiale d'infection ou phase aiguë qui dure un à deux mois et ne présente pas toujours des signes apparents. La phase chronique constitue la deuxième phase de la maladie et peut durer toute la vie de l'individu.

I.7.I Phase aiguë :

Cette phase succède presque immédiatement à l'infection. A la suite d'une piqûre par le triatome, apparaît parfois au niveau de la peau un oedème inflammatoire connu sous le nom de chagome. La piqûre peut avoir lieu près de l'oeil, la paupière gonfle et dans ce cas le phénomène porte le nom de signe de Romanà. Dans les jours qui suivent l'infection, la fièvre monte et on assiste à l'apparition de signes généraux tels que asthénie, tachycardie et céphalées. Cependant, lors de cette phase, les symptômes cliniques n'apparaissent que dans 50% des cas. Si les adultes survivent en général après une infection, environ 10%

d'enfants atteints meurent en phase aiguë en raison d'une atteinte cardiaque ou neurologique sévère.

I.7.2 Phase chronique :

La phase aiguë de la maladie est suivie d'une phase de latence pouvant durer quelques années avant que survienne la phase chronique qui peut durer de 10 à 30 ans. Pendant cette phase, il est difficile de détecter dans la circulation de l'hôte des parasites sanguicoles. Ces derniers vont persister sous la forme amastigote dans les cellules histiocytaires et musculaires (striées et/ou myocardiques) et forment ce que l'on appelle des nids d'amastigotes (Fig. 2 A et B). Cette phase s'accompagne parfois de l'apparition de manifestations pathologiques. 10 à 20% de patients présentent des atteintes cardiaques avec modification de l'électrocardiogramme, des lésions et parfois des insuffisances cardiaques graves susceptibles d'entraîner la mort subite. Dans certains cas, des pathologies digestives telles que megaoesophage et megacolon peuvent apparaître également. Il semblerait que ces deux formes de pathologie cardiaque et digestive soient associées à des souches différentes de *T. cruzi* et que leur prévalence diffère d'une région à l'autre.

La phase chronique peut aussi évoluer sans symptômes cliniques. Cette forme asymptomatique est représentée par environ 80% des cas dont le diagnostic nécessite l'utilisation de techniques sérologiques.

Figure 2. Localisation de nids d'amastigotes dans les tissus d'animaux infectés avec des trypomastigotes sanguicoles (souche Y).

- A. Coupe de cœur de souris BALB/c infectée.**
- B. Coupe de muscle squelettique de rat Fischer infecté.**
- Grossissement x100.**



A



B

I.8. Les modèles expérimentaux :

Les études expérimentales, aussi bien sur le plan immunologique que pathologique nécessitent la mise au point de modèles animaux capables après infection de développer les caractéristiques des deux phases aiguë et chronique de l'infection humaine. Le modèle choisi doit permettre une bonne reproductibilité de la maladie, un développement assez court et nécessite une bonne connaissance de son système immunitaire. Ainsi, les principales espèces d'animaux utilisés pour les études expérimentales sont représentées par :

1. **Le singe** : Le singe Rhésus a été décrit comme un bon modèle pour les études expérimentales de la maladie de Chagas au niveau de la phase aiguë et chronique de l'infection (SEAH et coll. 1974). Dans ce modèle, des images électrocardiographiques et histopathologiques comparables à celles observées chez l'homme ont été décrites (MILES et coll. 1979).
2. **Le cobaye** : C'est un animal qui développe l'infection avec des parasitemies basses mais qui apparaît comme un modèle intéressant pour l'étude de la réponse immunologique dans le cas des myocardites chagasiques.
3. **Le lapin** : Les lapins peuvent être considérés comme de bons modèles expérimentaux, en effet il a été montré qu'après une seule infection avec des formes trypomastigotes, ces animaux développent des lésions cardiaques similaires à celles décrites dans une myocardite chez le malade chronique

(TEIXEIRA et coll. 1975).

4. Le chien : A côté des autres hôtes vertébrés tels que le lapin et le tatou , le chien représente un réservoir naturel du parasite. Il est considéré également comme un modèle animal d'expérience convenable pour les études anatopathologiques et électrocardiographiques. Après infection par *T. cruzi*, le chien peut mourir en phase aiguë entre le 20ème et le 30ème jour qui suivent l'infection. Dans certains cas, il peut survivre et développer une cardiopathie semblable à celle observée chez l'homme (ANSELMI et coll. 1966).

5. Le rat : L'étude de la susceptibilité du rat à l'infection par *T. cruzi* a fait l'objet de plusieurs travaux. Selon certains auteurs, il semble que le niveau de parasitémie observé pendant la phase aiguë et la résistance à l'infection dépendent de l'âge des animaux (KOLODNY 1940, PIZZI et coll. 1953). Il a été également montré que certaines lignées de rat telles que le rat Wistar, peuvent développer des myocardites intensives suite à l'infection par la souche Y de *T. cruzi*. De plus, en 1983, RIVERA-VANDERPAS et coll. ont réalisé des expériences d'infection sur différentes souches de rat en suivant la parasitémie et la mortalité, et les ont classées en fonction de leur résistance à l'infection :

- a) les rats August, Louvain et Dark Agouti se sont révélés résistants à l'infection.
- b) les rats Lewis, Brown Norway, Wistar Ag et Hooded Lister sont faiblement résistants.

Enfin, la susceptibilité du rat Fischer mâle à l'infection a clairement été démontrée avec une mortalité en phase aiguë, à la différence du rat Fischer femelle qui développe des niveaux de parasitémie plus faibles pendant la phase aiguë et survit à l'infection. Il semblerait dans ce dernier cas que la résistance à l'infection soit davantage liée au sexe qu'à l'âge des animaux.

6. La souris : La souris représente le modèle animal le plus utilisé pour l'étude de la trypanosomiase expérimentale. Après infection par *T. cruzi*, la souris développe une parasitémie plus ou moins élevée qui dure environ deux mois, suivie d'une phase chronique qui dure toute la vie de l'animal avec persistance à très bas niveau de parasites dans les tissus.

La grande variabilité dans la susceptibilité de cet hôte à l'infection semble être liée à la souche et à la quantité de parasites inoculés , mais dépend également de la lignée, du sexe et de l'âge des animaux utilisés.

En suivant la parasitémie et la mortalité, NOGUEIRA et coll. (1981a) ont démontré la susceptibilité des souris BALB/c, C3H/He et CBA à l'infection par les souches Y et CL de *T. cruzi*. La lignée de souris C57BL/10 s'est révélée plutôt résistante à l'infection, mais plus à la souche Y que CL.

Cependant, la phase chronique chez la souris sensible ou résistante à *T. cruzi* présente une pathologie caractéristique avec de nombreux foyers inflammatoires dans le cœur, les muscles et le système nerveux, très similaires à ceux observés chez les humains en phase chronique.

**II. DIAGNOSTIC DE LA
MALADIE DE CHAGAS**

Il est certain que le dépistage de cette maladie ne peut pas se limiter au diagnostic clinique, en effet les manifestations apparentes de la phase aiguë (signe de Romanà, chagome, fièvre, etc...) et de la phase chronique (atteinte du tissu cardiaque essentiellement et du tube digestif) ne touchent pas la totalité des personnes atteintes. Par conséquent, le recours à d'autres moyens de diagnostic paraît nécessaire. Ceux-ci se traduisent par:

- 1- La recherche du parasite dans la circulation de l'hôte.
- 2- La recherche d'anticorps spécifiques ou d'antigènes circulants dans le sérum et les liquides biologiques.

Ces deux aspects représentent le moyen le plus direct d'affirmer le diagnostic de cette affection. En effet, dans certains cas de phase aiguë de la maladie on assiste à une parasitémie élevée et le diagnostic peut reposer sur des méthodes parasitologiques. Cependant, en phase chronique, les parasites circulants sont très difficilement détectables et le diagnostic immunologique devient indispensable.

Nous développerons ci-dessous les principales techniques de laboratoire utilisées dans le diagnostic de la maladie de Chagas.

II.1. Diagnostic par la recherche du parasite :

II.1.1. L'observation directe au microscope :

L'observation au microscope constitue une méthode directe de recherche des parasites. Elle est simple, rapide mais n'est positive que dans environ 50% des cas de patients en phase aiguë (CHIARI et DIAS 1975). La sensibilité de cette technique peut être améliorée par la lyse des globules rouges avec une solution de chlorure d'ammonium suivie d'une centrifugation ce qui permet de concentrer la suspension en trypomastigotes (Hoff 1974).

Le diagnostic parasitologique peut reposer également sur des méthodes indirectes.

II.1.2. Le xénodiagnostic :

Le xénodiagnostic consiste à provoquer la piqûre d'un patient par un triatome sain (hôte intermédiaire) et à examiner au bout de quelques jours la présence de parasites dans l'intestin postérieur de l'insecte. Cette technique qui paraît efficace pour le diagnostic de la phase aiguë n'est cependant pas très rapide puisque les résultats ne sont obtenus que 20 à 60 jours après le test, de plus elle n'est pas très sensible dans les cas de phase chronique puisqu'elle ne permet le dépistage que de 20 à 40% de patients infectés (MINTER-GOEDBLOED 1978).

II.1.3. L'hémoculture :

L'hémoculture consiste à prélever un aliquote de sang de patient, et à l'incuber dans un milieu de culture approprié afin de suivre la croissance des parasites. Cette technique présente une sensibilité non négligeable. Cependant, sa lourdeur et les risques de contamination bactériennes de la culture la rendent difficilement admise comme un test de routine.

Enfin, très récemment certains auteurs ont décrit une nouvelle technique de diagnostic très sensible basée sur la recherche de parasites dans la circulation par amplification *in vitro* de l'ADN permettant de détecter des quantités infimes d'ADN parasitaire (AVILA et coll. 1991). C'est la technique de réaction en chaîne de la polymérase appelée P.C.R. ("polymerase chain reaction") fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante permettant d'amplifier considérablement des séquences d'ADN en présence d'amorces appropriées.

Cette nouvelle technique actuellement en cours d'évaluation constituera probablement une méthode de choix pour le diagnostic de la maladie de Chagas. Sa sensibilité est tellement élevée que son utilisation pourra être envisagée pour le diagnostic de la phase chronique. Cependant, son utilisation demande beaucoup de précautions et de prudence. Par conséquent, il faut être conscient des limites de cette technique qui en raison de sa grande sensibilité pourra mettre en défaut la spécificité.

II.2 Diagnostic sérologique :

Le diagnostic sérologique repose sur l'utilisation de techniques multiples basées le plus fréquemment sur la recherche d'anticorps spécifiques dans les sérums de patients.

II.2.1. Réaction de fixation du complément :

Cette technique, décrite en 1913 par GUERREIRO et MACHADO a été la première utilisée dans le diagnostic sérologique.

Ce test peut être positif à partir de 20 à 40 jours après infection et présente une sensibilité satisfaisante pour le diagnostic de la phase chronique. Cette réaction peut être améliorée par une technique colorimétrique consistant en l'utilisation d'anticorps anti-composant C3 du complément marqué à la phosphatase alcaline (TANDON et coll. 1979).

En raison de sa faible sensibilité, la technique de fixation du complément tend à être moins utilisée par rapport à d'autres tests sérologiques, puisque dans certains cas, des patients infectés peuvent être révélés comme séronégatifs.

II.2.2. Réaction d'agglutination directe :

Les sérums de patients chagasiques peuvent réagir avec les formes épimastigotes de *T. cruzi* entraînant leur agglutination. Cependant, ce phénomène est observé également lors de l'utilisation de sérums d'individus normaux.

Le traitement des parasites par la trypsine conduit au démasquage de certains déterminants antigéniques membranaires et permet ainsi une meilleure reconnaissance par les sérum chagasiqes. Cependant, les réactions non spécifiques ne sont pas diminuées. Selon certains auteurs, cette non spécificité serait due aux immunoglobulines M présentes dans les sérum (GONZALEZ-CAPPA et coll. 1973). En effet leur traitement au 2-mercaptopéthanol permet une amélioration de la spécificité du test (STORNI et coll. 1975) sans pour autant affecter le pouvoir agglutinant des sérum de patients chagasiqes.

II.2.3. Réaction d'hémagglutination indirecte :

Ce test consiste à fixer de l'antigène parasitaire à la surface des globules rouges de mouton après traitement de ces derniers à l'acide tannique ou à la glutaraldéhyde. Ces globules rouges sensibilisés peuvent s'agglutiner en présence d'anticorps anti-parasite. Les préparations peuvent également être conservées pendant un temps assez long avant leur utilisation.

La réaction d'hémagglutination donne en général des résultats positifs pour des stades plus avancés de l'infection par rapport aux résultats obtenus par la réaction de fixation du complément. D'autre part, elle présente certains inconvenients dûs aux réactions croisées détectées après utilisation de sérum de leishmaniens ou d'individus atteints de toxoplasmose (CAMARGO 1976).

II.2.4. Réaction d'immunofluorescence :

La réaction d'immunofluorescence présente la caractéristique de pouvoir dépister l'infection en phase aiguë précocement par rapport aux autres techniques (CERISOLA et coll. 1970). Elle consiste à fixer des formes parasitaires comme source d'antigènes par différents agents (Glutaraldéhyde, formaldéhyde, etc....) avant de les incuber avec les sérum de patients. Les lames ainsi préparées peuvent être conservées pendant très longtemps. Les problèmes de non spécificité peuvent être réduits considérablement par l'utilisation des sérum à tester à différentes dilutions.

II.2.5. Agglutination des particules de latex après sensibilisation avec de l'antigène parasitaire :

Les particules de latex servent de support inerte sur lequel vont se fixer les antigènes solubles. Après incubation avec les sérum de patients, les anticorps reconnaissent l'antigène parasitaire et vont provoquer ainsi une réaction d'agglutination. Ce test est simple, rapide mais manque cependant de spécificité. La préparation des billes de latex traitées avec de l'antigène d'épimastigotes issu de traitement mécanique a été décrite comme stable. De plus, elle entraîne la réduction des réactions non spécifiques et donne des résultats comparables à ceux obtenus avec les autres techniques (CERISOLA et coll. 1980).

II.2.6. La réaction d'ELISA :

La technique d'ELISA basée sur la détection d'anticorps est considérée comme une technique de routine, et est appliquée au diagnostic de plusieurs infections (SEVER et MADDEN 1977). Elle est simple, rapide et ne consomme pas beaucoup d'antigène. Cependant, sa grande sensibilité demande le choix d'un matériel antigénique spécifique afin d'éviter les réactions faussement positives parfois rencontrées.

Les premiers travaux utilisaient comme source d'antigènes un homogénat total ou un sonicat de parasites épimastigotes. Ces dernières années, beaucoup d'études ont été entreprises dans le but d'évaluer la valeur diagnostique de certaines protéines purifiées de *T. cruzi* afin d'éviter les réactions non spécifiques observées. Celles-ci sont dues aux réactivités antigéniques croisées existant entre *T. cruzi* et d'autres protozoaires parasites présents dans la même zone d'endémie (*Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma rangeli*, différentes espèces de leishmanies etc...).

Ainsi, SCHARFSTEIN et coll. (1983) ont identifié une glycoprotéine de 25 kDa de poids moléculaire, exprimée à la surface de tous les stades de développement du parasite. Cette molécule induit une réponse anticorps spécifique au cours de l'infection. En effet, la technique d'immunoprecipitation des antigènes parasitaires marqués à l'iode 125, permet de déceler des anticorps dirigés vis-à-vis de cette protéine dans plus de 96% de sérums chagasiques. Cette molécule pourrait donc constituer un candidat pour le diagnostic de la maladie de Chagas et son utilisation dans un test ELISA pourrait être envisageable.

Une autre glycoprotéine majeure de 90 kDa exprimée à la surface des formes épimastigotes et trypomastigotes a été décrite pour sa grande spécificité de reconnaissance par les sérum humains chagasiques et révèle 96,6% de positivité. De plus, ce composant ne présente aucune réactivité avec les sérum de patients atteints de leishmaniose (cutanée ou viscérale), de trypanosomiase africaine ou infectés par *T. rangeli* (SCHECHTER et coll. 1983, DRAGON et coll. 1985).

D'autres techniques dérivées de l'ELISA se sont développées par la suite et correspondent essentiellement à des tests mettant en compétition des anticorps de patients et des anticorps monoclonaux produits vis-à-vis d'antigène(s) du parasite. Le CEIA pour "competitive enzyme immunosorbant assay" développé par LEMESRE et coll. (1986) représente un exemple de ce type de réaction. Ces auteurs ont produit un anticorps monoclonal de classe IgG1 chez la souris, dirigé contre un antigène majeur de *T. cruzi* appelé antigène 5. L'anticorps monoclonal a été marqué à la phosphatase alcaline et utilisé dans un test de compétition avec des sérum humains chagasiques vis-à-vis de l'antigène. Ce test se révèle positif dans 96% des cas de patients infectés, mais présente certains inconvénients dans la mesure où il n'est efficace que pour le diagnostic de la phase chronique, et ne permet de déceler qu'un faible pourcentage de cas de phase aiguë.

Tous les tests que nous avons développés à présent reposent sur la détection d'anticorps anti-antigènes parasitaires dans les sérums de patients. Ces techniques manquent parfois de spécificité ou de sensibilité et peuvent donner dans certains cas des réactions faussement négatives qui touchent essentiellement des cas de phase aiguë.

D'autres techniques de diagnostic peuvent être envisagées et sont basées sur la détection des antigènes parasitaires plutôt que des anticorps dans les sérums et les liquides biologiques des patients. Ainsi, des antigènes circulants ont déjà été détectés dans les sérums d'animaux infectés (GOTTLIEB 1977, ARAUJO 1982) et de patients chagasiques (ARAUJO et coll. 1981, MARCIPAR et coll. 1982.). De plus, certains tests ont révélé la présence d'antigènes parasitaires dans les urines de souris et de chiens infectés (BONGERTZ et coll. 1981) ainsi que dans les urines de malades chagasiques (FREILIJ et coll. 1987, KATZIN et coll. 1989a, 1989b).

Le développement de ce type de technique peut avoir un intérêt diagnostique considérable et pourrait permettre dans certains cas l'évaluation des effets d'un traitement chimiothérapeutique.

**III. LES ANTIGENES DE *T. CRUZI* POUVANT
JOUER UN ROLE DANS L'ADHESION DU
PARASITE A LA CELLULE HOTE ET DANS
L'INDUCTION D'UNE IMMUNITE PROTECTRICE**

Le cycle évolutif de *T. cruzi* comprend trois stades principaux de développement. La composition antigénique de ce parasite se caractérise à la fois par des antigènes communs et des composants spécifiques de stade. Il faut également noter que ce parasite est représenté par une importante variété de souches ayant des propriétés de virulence et des affinités variables pour les différents tissus de l'hôte. Ainsi, est-il difficile d'établir une classification bien définie des structures antigéniques de *T. cruzi*. De plus, les premiers travaux qui ont été consacrés à l'étude des antigènes de ce parasite, se sont limités à la caractérisation physicochimique ou à la description du rôle biologique de certaines fractions antigéniques. Cependant, actuellement le développement de nouvelles techniques dotées d'une grande sensibilité (marquage de surface, production d'anticorps monoclonaux, microscopie électronique, clonage moléculaire, etc...) a apporté une meilleure définition des structures parasitaires sur le plan moléculaire, leur localisation ainsi que la détermination de leur rôle biologique éventuel.

Nous essayerons de faire le point principalement sur les antigènes parasitaires qui semblent jouer un rôle dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte et ceux pouvant induire une immunité protectrice.

III.1. Les composants de *T. cruzi* jouant un rôle dans l'adhésion :

L'infection des cellules hôtes par *T. cruzi* se déroule en deux étapes : une première phase d'adhésion ou d'attachement du parasite à la cellule hôte faisant intervenir des antigènes de surface des 2 compartiments cellulaire et parasitaire. Elle est suivie par une phase de pénétration qui ne serait pas forcément liée à l'étape d'adhésion.

Un rôle important de la fibronectine dans l'attachement du trypomastigote au fibroblaste ou au macrophage a déjà été souligné par certains auteurs (OUAISSI et coll. 1984, WIRTH et KIERSZENBAUM 1984). OUAISSI et coll. (1985) ont montré par la suite que l'utilisation de la fibronectine purifiée ou d'anticorps anti-fibronectine inhibe l'attachement des trypomastigotes aux cellules de mammifères. Ces travaux ont été confirmés ultérieurement par d'autres auteurs qui ont constaté d'une part une augmentation de l'attachement des amastigotes aux macrophages de souris ou aux monocytes humains après addition de la fibronectine, d'autre part une inhibition de ce phénomène après traitement préalable des parasites par le tétrapeptide RGDS de la fibronectine (NOISIN et VILLALTA 1989).

Le composant parasitaire jouant le rôle de récepteur de la fibronectine a été identifié. Il présente un poids moléculaire de 85 kDa (OUAISSI et coll. 1986a) et réagirait avec la séquence RGDS de la fibronectine (OUAISSI et coll. 1986b).

D'autres auteurs ont montré par ailleurs que des anticorps monoclonaux dirigés vis-à-vis d'une molécule de surface des trypomastigotes de 85 kDa (Tc85), sont capables d'inhiber de 50 à 70% la pénétration de différentes souches de parasite dans des cellules épithéliales de singe (Alves et coll. 1986).

Enfin, l'utilisation de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle a montré que ce composant représente en fait un complexe de molécules ayant des pH_i différents et dont le poids moléculaire varie légèrement suivant la souche utilisée (ABUIN et coll. 1989, ANDREWS et coll. 1984, OUAISSI et coll. 1990).

Par la suite, le clonage et le séquençage de certains gènes codant pour des composants de 85 kDa a été réalisé par biologie moléculaire (PETERSON et coll. 1986, KAHN et coll. 1990). Il y aurait au moins une centaine de gènes qui codent pour ces molécules de 85 kDa, et que les produits d'au moins 9 d'entre eux sont exprimés au niveau du parasite. Ceci suggère l'existence d'une famille multigénique codant pour des protéines présentant à la fois des séquences protéiques communes et des séquences différentes.

Néanmoins, d'autres molécules parasitaires ont été décrites par la suite pour leur rôle dans l'adhésion. En 1988, VELGE et coll. ont montré que le parasite exprime à sa surface un récepteur pour le collagène et que des anticorps monoclonaux dirigés contre ce dernier inhibent l'infection des fibroblastes par les trypomastigotes. Récemment, une molécule de 60 kDa exprimée à la surface du parasite a été décrite pour sa capacité à se fixer à l'héparine et au collagène. Cette molécule appelée pénétrine jouerait probablement un rôle dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte (ORTEGA-BARRIA et coll. 1991).

Toutes ces observations semblent indiquer que le parasite possède un répertoire très large de molécules de surface lui permettant d'adhérer à la cellule hôte, et soulèvent d'autre part la complexité des phénomènes d'interaction parasite-cellule. Néanmoins, il est nécessaire de connaître les moyens et les mécanismes utilisés par le parasite pour accomplir son cycle lors d'une infection afin de pouvoir établir une bonne stratégie de lutte visant à interrompre le cycle parasitaire et limiter par conséquent la multiplication du parasite.

III.2. Les antigènes à potentialités vaccinantes :

Il est clair que si la mortalité en phase aiguë touche un certain pourcentage de patients, on assiste cependant au développement d'une résistance à la réinfection chez les individus et les animaux ayant survécu à une première infection. L'évaluation du rôle protecteur de parasites entiers fixés, irradiés ou inactivés, utilisés dans des protocoles d'immunisation a fait l'objet de nombreux travaux. Les résultats montrent que les trypomastigotes induisent un degré de protection meilleur par rapport aux épimastigotes et que les anticorps obtenus après immunisation sont capables de lyser les parasites *in vitro* en présence du complément (ZWEERINK et coll. 1984, ANDREWS et coll. 1985).

Nous développerons dans la suite de ce chapitre et suivant leur localisation, les différents antigènes de *T. cruzi* ayant été décrits pour leur rôle protecteur contre l'infection.

III.2.1. Les antigènes membranaires :

Parmi les antigènes membranaires, les protéines accessibles à l'iodation ont été les plus étudiées. Etant donné leur rôle éventuel dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte, ces antigènes ont fait l'objet de nombreux travaux dans le but de développer une stratégie vaccinale.

Une glycoprotéine majeure de surface de 90 kDa de poids moléculaire exprimée à tous les stades de développement du parasite a été identifiée (SNARY et HUDSON 1979). Cette molécule, utilisée dans des protocoles d'immunisation en association avec de l'adjuvant complet de Freund ou de la saponine, est capable d'induire chez la souris une protection significative aussi bien vis-à-vis de trypomastigotes métacycliques que sanguicoles (SCOTT et SNARY 1979, SNARY 1983a). Etant donnés les résultats très encourageants obtenus avec cette molécule, une série de travaux ultérieurs ont été réalisés dans le but de déterminer l'adjuvant adéquat pouvant donner le meilleur résultat et dont l'administration chez l'homme serait sans effet secondaire (SCOTT et coll. 1984). Malheureusement, ces travaux sont restés sans suite jusqu'à présent.

Un autre composant de 90 kDa qui représente une glycoprotéine de surface des trypomastigotes métacycliques (TEIXEIRA et YOSHIDA 1986) a été purifié sur colonne d'affinité à l'aide d'un anticorps monoclonal et testé pour son activité protectrice en association avec divers adjuvants. Le meilleur résultat a été obtenu en utilisant de l'alum comme adjuvant (GONZALEZ et coll. 1990). Cependant, on ignore encore l'importance relative des deux parties glycanique et protéique

dans l'induction de cette immunité protectrice.

La glycoprotéine de 72 kDa, molécule spécifique des deux stades épimastigotes et trypomastigotes métacycliques (SNARY et coll. 1981, NOGUEIRA et coll. 1981c) a également été étudiée pour son rôle dans la protection. Elle a été purifiée par un anticorps monoclonal sur colonne d'affinité (SNARY et coll. 1981). Cette molécule est capable d'induire par immunisation chez la souris un degré de protection significatif après infection par des trypomastigotes métacycliques. Par contre aucune résistance n'est développée après infection par des trypomastigotes sanguicoles (SNARY 1983a).

Récemment, ARAUJO et MOREIN (1991) ont réalisé des expériences de protection en utilisant deux protéines de membrane, purifiées à partir d'épimastigotes à l'aide d'un anticorps monoclonal. Il s'agit de deux glycoprotéines de 45 et 68 kDa de poids moléculaire qui ont été utilisées dans un protocole d'immunisation après leur incorporation dans un complexe appelé ISCOM (Immunostimulating complex). Un degré de protection significatif a été obtenu, associé à une réponse immune anticorps et cellulaire importante. Ces auteurs suggèrent que L'ISCOM permet une meilleure présentation de l'antigène au système immunitaire et en raison de sa non toxicité pour l'homme, ce complexe pourrait être utilisé dans des protocoles de vaccination.

La composant de 85 kDa représente l'un des principaux antigènes de surface ayant été étudiés *in vitro* pour leur rôle dans l'adhésion du parasite à la

cellule hôte (Voir chapitre précédent). Cependant, très peu de travaux ont été consacrés à l'étude de l'activité protectrice *in vivo* de ce composant. Tout récemment, PESTEL et coll. (1992) ont réalisé des expériences de protection chez la souris BALB/c en utilisant un peptide synthétique de 9 acides aminés répétés 5 fois le long de la séquence de la molécule de 85 kDa (PETERSON et coll. 1986). L'immunisation des souris avec ce peptide couplé à une protéine porteuse, en association avec de l'adjuvant complet de Freund, induit une baisse de la parasitémie après infection ainsi qu'un degré significatif de protection en terme de mortalité. Malheureusement, ce peptide serait responsable de l'induction d'une activation polyclonale B et T après immunisation. Ce phénomène est comparable à celui observé lors d'une infection naturelle et qui pourrait expliquer en partie les réactions autoimmunes fréquemment rencontrées pendant la phase chronique de la maladie. Les effets déclenchés par ce peptide limitent donc son utilisation éventuelle dans un but immunoprophylactique, mais permet plutôt d'expliquer certains aspects du désordre immunologique induit à la suite d'une infection.

III.2.2. Les antigènes flagellaires :

Les premiers travaux d'exploration du pouvoir vaccinant de ce type d'antigènes ont été réalisés par SEGURA et coll. (1977). Ils sont basés sur la comparaison du rôle protecteur de trois préparations antigéniques d'épimastigotes de la souche tulahuen correspondant à un homogénat total, une fraction membranaire, et une fraction flagellaire. Ainsi, des résultats

encourageants en terme de protection ont été obtenus avec la fraction flagellaire. La deuxième étape de ce travail a consisté à étudier l'effet de l'immunisation avec cette fraction sur le développement de la pathologie et montre que très peu d'animaux immunisés présentent encore des parasites dans la circulation 120 jours après infection. De plus, le nombre de souris développant une myocardite est beaucoup plus réduit que dans le groupe témoin (RUIZ et coll. 1985). Ces résultats ont été confirmés par la suite après l'utilisation d'une préparation antigénique flagellaire lyophylisée en association avec *Bordetella pertussis* comme adjuvant, qui entraîne une diminution de la parasitémie et de la mortalité des animaux immunisés (RUIZ et coll. 1986). D'autre part, des anticorps monoclonaux anti-fraction flagellaire, présentant ou non une activité lytique en présence du complément, sont capables par transfert passif d'induire un degré de protection significatif (SEGURA et coll. 1986). De plus, une fraction antigénique contenant des composants avec des poids moléculaires variant de 50 à 150 kDa, purifiée à l'aide d'un anticorps monoclonal et utilisée dans des expériences d'immunisation, induit une protection de 50% chez la souris (RUIZ et coll. 1990).

Il a été décrit également que des souris immunisées avec la fraction flagellaire présentent une réponse humorale mais développent aussi une réaction d'hypersensibilité retardée vis-à-vis de l'antigène parasitaire (ROTTENBERG et coll. 1988). Dans ce contexte, des travaux récents de clonage et de séquençage des antigènes de la fraction flagellaire ont permis de caractériser une séquence de 19 acides aminés. Le peptide synthétique correspondant est capable par immunisation chez la souris d'induire les mêmes propriétés immunologiques que

celles obtenues avec la fraction flagellaire à savoir une réponse humorale et une réponse cellulaire (BUA et coll. 1991). Cependant on ignore encore si ce peptide est capable d'induire une protection par immunisation.

Ce travail est considéré comme l'un des aspects les plus avancés dans le domaine de la recherche d'antigènes capables d'induire un bon niveau de protection. Cependant, il reste très limité sur le plan moléculaire puisque toutes les expériences de protection réalisées jusqu'à présent représentent le résultat de l'immunisation avec une fraction antigénique composée de plusieurs molécules.

III.2.3. Les antigènes d'excrétion-sécrétion :

Les antigènes d'excrétion-sécrétion ou ESA ont déjà été décrits dans certaines infections parasitaires naturelles ou expérimentales et correspondent à des produits libérés par le parasite dans le milieu extérieur. Ces antigènes sont généralement très immunogènes et parfois porteurs de certaines activités enzymatiques.

Dans d'autres modèles parasitaires, l'activité biologique de ce type d'antigènes a fait l'objet de plusieurs travaux. Leur rôle dans la modulation des effecteurs immuns de l'hôte a déjà été décrit dans le cas de la schistosomiase où le parasite libère des protéases qui hydrolysent les molécules d'IgG fixées à la surface du schistosomule (AURIAULT et coll. 1981). Les peptides qui en résultent exercent une activité inhibitrice sur les fonctions du macrophage. De plus, un inhibiteur de faible poids moléculaire appelé SDIF

(Schistosome-derived-inhibitory-factor) excrété par le ver adulte inhibe les réponses prolifératives T *in vivo* et *in vitro*, et exerce une activité suppressive sur les réponses IgE. Toutefois, dans ce modèle, il a été démontré que l'immunisation de rats avec les produits d'excrétion-sécrétion du parasite ou SRP (Schistosomula released products), entraîne une augmentation de la cytotoxicité des éosinophiles dépendante des IgG (AURIAULT et coll. 1982) et induit un niveau de protection significatif (83%) vis-à-vis de l'infection par *Schistosoma mansoni* (DAMONNEVILLE et coll. 1986).

D'autre part dans le cas de la toxoplasmose, les antigènes ES ont été également étudiés pour leur rôle dans l'induction d'une immunité protectrice vis-à-vis de *Toxoplasma gondii*. Ainsi, on a montré que le transfert passif d'anticorps anti-ES chez le rat Fischer nude est capable d'induire un bon niveau de protection (DARCY et coll. 1988).

On déduit de ces observations que l'efficacité et l'intensité des mécanismes de défense connaissent des fluctuations durant l'infection. Ces perturbations sont dues à des interférences multiples du parasite ou de ses produits à toutes les étapes de la réponse immunitaire. Ainsi, apparaît-il indispensable d'identifier à l'échelle moléculaire les antigènes à potentialités protectrices afin d'éviter l'induction de désordres immunologiques susceptibles d'avoir des effets néfastes sur l'hôte et ses moyens de défense.

Chez les trypanosomatidés, les antigènes d'excrétion-sécrétion sont appelés aussi exoantigènes (WEITZ 1960). Ils ont été initialement décrits dans les

cultures de *T. cruzi* (TARRANT et coll. 1965, MUNIZ 1967), et dans les infections expérimentales par ce parasite (DE SIQUIERA et coll. 1966). Par la suite, la présence de ces antigènes dans les sérum et les urines de patients chagasiques a été également décrite (KATZIN et coll. 1989a, 1989b). Il faut noter cependant que très peu de travaux ont été consacrés à l'étude du rôle biologique de ces antigènes dans le développement de l'immunité anti-*T. cruzi*. Pour la préparation des antigènes ES, certains auteurs utilisent le plasma de souris infectées (MORETTI et coll. 1985). Le même groupe a montré que des anticorps humains anti-exoantigènes réagissaient avec le tissu cardiaque humain (GRUPPI et coll. 1989), et que deux composants de poids moléculaire 27 et 45 kDa induisent une réponse IgE chez la souris lors d'une infection expérimentale (GRUPPI et coll. 1990). Ces auteurs ont également montré que l'immunisation de souris avec des exoantigènes entraîne une baisse de la parasitémie par rapport aux témoins non immunisés (CERBAN et coll. 1991). Cependant, ces travaux restent préliminaires puisqu'ils ont été limités à l'utilisation d'un seul modèle animal, la souris, et se sont restreints à l'analyse d'un seul paramètre, la parasitémie, pour l'évaluation de la protection.

III.3. Stratégie vaccinale :

Lors d'une infection par *T. cruzi*, nous assistons au développement de différentes manifestations pathologiques représentant la conséquence d'un désordre immunologique. D'autre part, le parasite dispose de divers mécanismes d'échappement lui permettant d'assurer sa survie à l'intérieur de son hôte. Par conséquent, l'utilisation d'un extrait total de *T. cruzi* dans un but de vaccination ne peut être envisageable. Ainsi, l'établissement d'une stratégie vaccinale basée sur l'utilisation de protéines purifiées paraît indispensable.

La gravité de la maladie de Chagas réside dans deux éléments essentiels :

- Une mortalité qui touche environ 10% d'enfants atteints en phase aiguë.
- La pathologie de la phase chronique se traduisant par la destruction des tissus de l'hôte.

Nous avons discuté précédemment une série de travaux visant la recherche de molécules à potentialités vaccinantes. Certains résultats montrent un certain degré de protection en terme de parasitémie et/ou de mortalité en phase aiguë chez les animaux immunisés. Cependant, aucun travail à l'heure actuelle n'a montré une relation entre l'importance du niveau de parasitémie observé en phase aiguë et l'intensité des phénomènes pathologiques de la phase chronique. De plus, même s'il est difficilement détectable dans la circulation, le parasite demeure dans les tissus de son hôte pendant toute la phase chronique.

Par conséquent, une protéine parasitaire permettant une réduction de la parasitémie en phase aiguë, mais qui serait incapable de conférer une immunité

stérilisante ne peut être considérée comme un candidat vaccinal, que si elle est capable de réduire l'incidence ou la sévérité de la phase chronique. De plus, le vaccin doit obéir à certaines conditions (GOLDENBERG et coll. 1983) :

Il ne doit pas induire un état d'immunosuppression, ne doit pas provoquer une agression auto-immune, ne doit pas produire d'infection et doit conférer une protection stérilisante.

Le développement d'une stratégie vaccinale peut être entrepris de différentes manières :

- La caractérisation et l'identification de composants de surface des formes trypomastigotes impliqués dans les phénomènes d'adhésion et de pénétration du parasite dans la cellule hôte.
- L'étude des antigènes de sécrétion ainsi que les molécules porteuses d'une activité enzymatique, pouvant être essentielles à la survie du parasite et/ou jouer un rôle dans l'échappement du parasite à la réponse immunitaire.

Par la suite, le clonage par biologie moléculaire des protéines vaccinantes permettra d'en disposer en quantité importante. Ceci conduira à leur utilisation dans des protocoles d'immunisation d'animaux de laboratoire afin de définir tous les paramètres (adjuvant adéquat, voie d'immunisation, quantité de protéines, nombre de rappels, etc ...) nécessaires à l'obtention d'une protection optimale.

Enfin, étant donné la complexité des structures antigéniques de *T. cruzi*, l'étendue de son répertoire antigénique porteur de diverses fonctions, à savoir l'adhésion et la pénétration du parasite dans la cellule hôte, et son échappement à la réponse immunitaire, la mise au point d'un vaccin multiprotéique est une

alternative tout à fait envisageable.

L'utilisation de vaccin à base de protéine recombinante est actuellement en cours d'évaluation dans le cas de certaines parasitoses humaines telle que la schistosomiase.

Enfin, il est également possible après détermination des épitopes impliqués dans le phénomène de protection, d'envisager éventuellement la production d'un vaccin synthétique.

Il est certain que les premiers travaux concernant l'étude de l'infection par *T. cruzi* ont visé la caractérisation et l'identification de molécules de surface pouvant jouer un rôle dans la pénétration du parasite dans la cellule hôte. Notre stratégie de travail a été choisie en partant du principe suivant : si les antigènes de surface de *T. cruzi* représentent l'ensemble de son répertoire antigénique intervenant dans les interactions parasite-hôte, la situation serait plutôt néfaste pour le parasite. En effet, les antigènes de surface correspondent à des molécules bien exposées et représentent de ce fait la première cible de la réponse immune de l'hôte. Notre intérêt s'est donc porté sur l'étude des antigènes de sécrétion des trypomastigotes, formes infectantes du parasite.

Dans un premier temps, en utilisant des sérum humains chagasiques et des anticorps monoclonaux, nous avons caractérisé les immunogènes majeurs parmi les composants de surface et les antigènes de sécrétion des formes trypomastigotes.

Le deuxième volet de ce travail a concerné le développement d'une technique de diagnostic sérologique simple, rapide, pouvant améliorer la spécificité du diagnostic de la phase aiguë. A l'aide d'un anticorps monoclonal, nous avons pu détecter dans les sérums de patients chagasiques des complexes immuns circulants portant un épitope exprimé par des protéines parasitaires, et pouvant être considéré comme marqueur de la phase aiguë de la maladie.

Enfin, la troisième partie a consisté à identifier parmi les antigènes ES des composants à potentialités protectrices, leur clonage et séquençage par biologie moléculaire ainsi que les premiers résultats de l'évaluation du rôle protecteur de certains peptides synthétiques dérivés de la séquence.

IV. IMMUNITE A *T. CRUZI*

IV.1. Immunité naturelle :

Si de nombreuses espèces de mammifères sauvages et domestiques ont été décrites pour leur susceptibilité à l'infection par *T. cruzi*, l'existence d'une immunité naturelle a été cependant mise en évidence pour certains animaux tels que les amphibiens et les oiseaux (BRENER 1973). Cette résistance serait liée à la lyse directe des formes trypomastigotes par le complément, un phénomène qui n'est pas observé chez d'autres hôtes mammifères puisque dans ce cas, seules les formes épimastigotes et non les trypomastigotes sont sensibles à la lyse par le complément.

IV.2. Immunité associée à l'infection :

Il est important de souligner que très rapidement après l'infection, aussi bien chez l'homme que chez les animaux, se développe une réponse immune se traduisant par la production d'anticorps spécifiques et le développement de réactions d'hypersensibilité. Si dans le cas de certaines protozooses, telle que la leishmaniose cutanée, la réponse effectrice vis-à-vis du parasite semble être plutôt de type cellulaire (ROITT 1985), dans le cas de la maladie de Chagas, des mécanismes faisant intervenir la réponse humorale et la réponse cellulaire ont été montrés comme jouant un rôle important dans la résistance à l'infection (TRISCHMANN et coll. 1978). Ainsi, le niveau de parasitémie observé au cours de la phase aiguë se trouve diminué lors de la phase chronique pendant laquelle il est difficile de détecter des parasites dans la circulation par examen direct du

sang, alors que le parasite persiste chez l'hôte durant toute sa vie et stimule ainsi de façon permanente le système immunitaire de l'hôte.

IV.2.1. Immunité humorale :

Après une infection par *T. cruzi*, nous assistons pendant la phase aiguë au développement d'une réponse anticorps caractérisée d'abord par une prédominance des anticorps de type IgM ensuite des IgG et des IgA (TEIXEIRA et SANTOS-BUCH 1974). Cette réponse anticorps persistera tout au long de la phase chronique.

IV.2.1.1. Implication des anticorps dans la résistance à l'infection :

Le rôle des anticorps dans la résistance à l'infection par *T. cruzi* a été largement démontré. KIERSZENBAUM et HOWARD 1976 ont réalisé des expériences chez deux lignées de souris qui diffèrent par leur niveau de réponse anticorps, et ont montré que la lignée de souris produisant un faible taux d'anticorps est plus susceptible à l'infection que celle produisant des taux importants d'anticorps. D'autre part, les premiers travaux réalisés chez le rat ont montré que le transfert passif de sérum immun de rat en phase aiguë à des rats sains entraîne une protection significative (CULBERSTON et KOLODNY 1938). Le traitement de rats Fischer par un sérum de lapin anti- μ augmente leur susceptibilité à l'infection par rapport aux rats non traités (RODRIGUEZ et coll.

1981). De la même manière, des expériences réalisées chez la souris ont montré que le transfert de cellules spléniques immunes déplétées en lymphocytes B n'induit pas de protection (SCOTT 1981). Par ailleurs, des travaux ont été conduits dans le but de déterminer les isotypes et les sous-classes d'anticorps mis en jeu dans la résistance à l'infection. Une étude réalisée chez la souris par transfert passif de différentes fractions d'anticorps IgM, IgG1, IgG2 et IgG3 isolées à partir d'un sérum de souris d'infection, indique que l'activité protectrice des anticorps serait restreinte à la sous-classe IgG2 (SCOTT et GOSS-SAMPSON 1984b), et plus précisément IgG2b (TAKEHARA et coll. 1981). Cependant, d'autres travaux montrent que des anticorps monoclonaux de classe IgG1 ou IgG3 anti-antigène de la fraction flagellaire d'épimastigotes sont capables par transfert passif de conférer un bon niveau de protection (SEGURA et coll. 1986, RUIZ et coll. 1990).

IV.2.1.2. Mécanisme d'action des anticorps :

Différents mécanismes faisant intervenir les anticorps ont été décrits comme jouant un rôle dans la destruction du parasite. En plus de leur capacité à se fixer à certains composants de surface du parasite et à inhiber ainsi l'adhésion de celui-ci et sa pénétration dans la cellule hôte, les anticorps participent également à la phagocytose du parasite par les macrophages et les monocytes. D'autre part, les anticorps peuvent induire une lyse directe du parasite en présence du complément. Ce mécanisme a fait l'objet de plusieurs travaux dont les premiers ont souligné l'importance de ces anticorps lytiques et ont décrit une association

entre la présence de ces anticorps et la résistance à l'infection, par opposition aux anticorps de type conventionnel qui reconnaissent le parasite sans pour autant induire sa lyse (KRETTLI et BRENER 1976). Cependant, des travaux réalisés par SEGURA et coll. (1986) ont montré chez la souris que le transfert passif d'anticorps monoclonaux anti-fraction flagellaire, présentant ou non une activité lytique sont capables d'induire une protection contre une infection d'épreuve par des trypomastigotes sanguicoles de la souche Tulahuen.

Enfin, les anticorps peuvent participer à l'élimination du parasite suivant un mécanisme d'ADCC (cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps) en collaboration avec diverses populations cellulaires présentant des récepteurs Fc à leur surface. L'existence de ce mécanisme a déjà été confirmée *in vitro* vis-à-vis des formes épimastigotes en utilisant des cellules spléniques de souris ou de rat (ABRAHAMSHON et DA SILVA 1977, SANDERSON et coll. 1978), des éosinophiles et des neutrophiles de rat (LOPEZ et coll. 1978) et des granulocytes humains (MADEIRA et coll. 1979). Des expériences similaires réalisées sur les formes trypomastigotes ont montré l'implication des lymphocytes, des éosinophiles et des neutrophiles humains dans ce type de mécanisme (KIERSZENBAUM et HAYES 1980). De plus, des travaux récents indiquent que les mastocytes avec des anticorps de sous-classe IgG1, IgG2a, et IgG2b pourraient être impliqués dans la destruction de trypomastigotes sanguicoles par un mécanisme d'ADCC (TAMBOURGI et coll. 1989).

Enfin, d'autres cellules telles que les plaquettes ont déjà été décrites dans certains modèles parasitaires pour leur rôle dans la résistance à l'infection. Dans le cas de *T. cruzi*, des travaux récents, ont montré *in vitro* que des plaquettes de souris en présence d'une fraction d'IgG purifiée à partir de sérum de souris en phase chronique, sont capables de lyser des formes trypomastigotes sanguicoles, un phénomène qui paraît dépendant du récepteur plaquettaire pour le composant C3b du complément (UMEKITA et MOTA 1989).

Ainsi, à l'heure actuelle est-il clairement admis que la réponse humorale joue un rôle déterminant dans la résistance à l'infection. Les anticorps spécifiques interviennent dans l'élimination du parasite selon divers mécanismes. Il reste cependant à démontrer la validité *in vivo* de ces phénomènes et leur importance relative dans la résistance à l'infection.

IV.2.2. Immunité cellulaire :

IV.2.2.1. Rôle des lymphocytes T :

Le contrôle de l'infection par *T. cruzi* a longtemps été attribué à la réponse humorale et en particulier aux anticorps lytiques (KRETTLI et BRENER 1976, MARTINS et coll. 1985). Cependant, il apparaît à l'heure actuelle que la réponse cellulaire participe activement dans la résistance à l'infection.

L'étude de l'importance de l'immunité cellulaire au cours de l'infection nécessite l'utilisation d'un modèle animal bien défini avec une bonne connaissance

des différentes composantes de son système immunitaire. Ainsi, des expériences réalisées chez le rat et la souris ont montré que ces animaux deviennent plus susceptibles à l'infection après thymectomie ou traitement par des anticorps anti-thymocytes que les témoins non traités (ROBERSON et coll. 1973). Des résultats comparables ont été obtenus chez le rat nude. Celui-ci est très susceptible à l'infection, développe une forte parasitémie et meurt en phase aiguë (RODRIGUEZ et coll. 1983). Par ailleurs certains auteurs suggèrent que la protection contre l'infection serait médiée plutôt par les lymphocytes T que par les lymphocytes B (REED 1980). A ce niveau, la part de participation des différentes populations lymphocytaires B et T mais aussi des sous-populations T (CD4 et CD8) dans la résistance à l'infection est très controversée.

En 1980, POWELL et KUHN n'ont pu détecter aucune différence au niveau du titre anticorps spécifiques de *T. cruzi* dans les sérum de souris susceptibles (C3H) en comparaison avec des souris résistantes (C57BL/6). Par ailleurs, les travaux de TRISCHMANN (1983) suggèrent qu'au début de la phase aiguë, le contrôle de l'infection serait assuré par les lymphocytes T et non lié aux anticorps. Ces derniers seraient responsables par la suite de l'élimination du parasite de la circulation de l'hôte et du maintien de l'immunité pendant la phase chronique. De plus, le même auteur montre que le transfert de cellules T immunes à des souris déplétées en cellules B entraîne un retard dans l'apparition de la parasitémie et de la mortalité après infection. D'autre part une meilleure protection est obtenue après infection lorsque les cellules T de souris infectées sont transférées à des souris normales (TRISCHMANN 1984). Récemment, ARAUJO (1989) a montré que le traitement de souris par un anticorps

anti-glycoproteine de surface des lymphocytes T L3T4 (CD4⁺) augmente la susceptibilité des animaux à l'infection par rapport aux souris non traitées.

Ces résultats sont en faveur d'un rôle direct de la réponse cellulaire dans l'élimination du parasite indépendamment des anticorps, mais suggèrent également un effet "helper" non négligeable des lymphocytes T.

Les cellules T seraient impliquées dans la production d'anticorps et représentent une source de cytokines y compris celles capables d'activer les macrophages pour la destruction des parasites intracellulaires (REED et coll. 1987, 1989, PLATA et coll. 1987).

Si les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle dans le développement de la résistance à l'infection, il n'en est pas moins pour les lymphocytes T CD8⁺. En effet, TARLETON (1990), par une série d'expériences indique que des souris résistantes C57BL/6, dépletées en lymphocytes T CD8⁺ pendant les premières phases de l'infection, deviennent très susceptibles à l'infection par rapport à des souris non dépletées. Cependant, le contrôle de l'infection observé pendant la phase chronique ne serait pas assuré par les lymphocytes T CD8⁺ (TARLETON 1990). Par ailleurs, il faut noter que cette sous-population lymphocytaire a déjà été décrite pour son activité cytotoxique pour d'autres parasites protozoaires tels que *Toxoplasma gondii* (KHAN et coll. 1988).

S'il est clair à présent que lors de l'infection par *T. cruzi*, les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle capital dans l'élimination du parasite, le mécanisme d'action de ces cellules n'est pas encore bien défini. Toutefois, certains auteurs, leur

attribuent un rôle dans la cytotoxicité des cellules infectées présentant de l'antigène parasitaire à leur surface (KUHN et MURNANE 1977). Elles seraient également capables de lyser des cellules saines de l'hôte présentant des antigènes parasitaires à leur surface (RIBEIRO DOS SANTOS et HUDSON 1980).

En conséquence, les lymphocytes T regroupent alors deux sous-populations cellulaires : les lymphocytes T CD4⁺ dont le rôle dans la résistance à l'infection est important, mais qui seraient responsables également comme nous le verrons plus loin, de certains phénomènes pathologiques observés pendant la phase chronique de la maladie. D'autre part les lymphocytes T CD8⁺ qui n'ont été décrits que pour leur activité effectrice dans l'élimination du parasite et constituent de ce fait un élément essentiel à étudier. Dans ce contexte, il serait capital de déterminer et de développer les antigènes cibles de ce type de réponse et de favoriser celle-ci, afin d'améliorer l'efficacité de la réponse immune effectrice de l'hôte dans le contrôle de l'infection.

En conclusion, nous pouvons dire que plusieurs populations cellulaires interviennent dans l'immunité vis-à-vis de l'infection par *T. cruzi*. Cependant, beaucoup de résultats sont contradictoires concernant la part de participation des différentes composantes de la réponse effectrice de l'hôte dans cette immunité.

TARLETON (1991), propose un schéma global montrant l'importance des populations cellulaires suivant la phase de l'infection et suggère que les lymphocytes T seraient responsables du contrôle de l'infection pendant ses premières phases. Leur rôle décroît progressivement pour laisser la place aux

cellules B productrices d'anticorps qui vont maintenir la résistance observée pendant la phase chronique. Une autre population cellulaire T à l'origine de certaines manifestations pathologiques est fortement activée lors de la phase aiguë et persiste à un niveau moyen pendant la phase chronique.

IV.2.2.2. Rôle du macrophage :

L'activation du macrophage peut être induite suite à son interaction avec des microorganismes. Ceci se traduit par la production des métabolites de l'oxygène (supéroxyde, peroxyde) qui sont impliqués dans la destruction de divers parasites (HUGHES 1988).

Le macrophage représente une cellule hôte pour *T. cruzi*, cependant, une fois activé, il joue un rôle dans l'immunité vis-à-vis du parasite (TALIAFERRO et PIZZI 1955).

Certains auteurs ont montré que dans le cas de *T. cruzi*, l'activation du macrophage serait sous la dépendance de certains facteurs produits par les lymphocytes T (NOGUIERA et coll. 1981b) et que l'interferon γ jouerait probablement un rôle dans ce processus (PLATA et coll. 1984). D'autre part, il a été montré que le traitement de souris avec de l'interferon γ entraîne une baisse très significative de la parasitémie et de la mortalité après infection (REED 1988).

Cependant, si le macrophage est capable de détruire des parasites intracellulaires, ce phénomène serait médié par un mécanisme indépendant du métabolisme de l'oxygène (McCABE et MULLINS 1990, VRAY et coll. 1991) puisqu'aucun accroissement de l'activité respiratoire du macrophage n'est mise en évidence après incubation de celui-ci avec des parasites opsonisés ou non opsonisés (McCABE et MULLINS 1990). D'autres auteurs ont montré que contrairement aux souris résistantes (B6, B10), les macrophages de souris susceptibles (C3H) infectées avec des souches myotropes (CL ou la souche colombienne) présentent un degré d'activation plus significatif avec une libération importante de peroxyde d'hydrogène (RUSSO et coll. 1989).

Toutes ces observations rendent compte de la diversité des mécanismes immunitaires de l'hôte impliqués dans la destruction du parasite. Cependant celui-ci, pour assurer sa survie, va développer des mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immune de son hôte en diminuant son efficacité.

**V. MECANISMES D'EVASION
ET IMMUNOPATHOLOGIE**

V.1. Mécanismes d'évasion :

Nous avons vu précédemment que la phase aiguë correspond à une période où la parasitémie est généralement élevée, alors que pendant la phase chronique se développe une réponse immune spécifique et efficace. Toutefois, durant cette dernière phase, bien que difficilement détectable dans la circulation, le parasite persiste pendant toute la vie de l'hôte. Pour son adaptation, le parasite va donc développer des moyens d'échappement lui permettant de faire face aux différentes composantes du système immunitaire. Ainsi, s'installera un équilibre entre les mécanismes effecteurs de l'hôte et les mécanismes de défense développés par le parasite.

Si l'on considère certains mécanismes d'échappement des parasites à la réponse immune, tels que le processus de variation antigénique caractéristique des trypanosomes africains ou le mimétisme moléculaire dans le cas du schistosome, il est clair que *T. cruzi* est constitué d'une grande diversité de souches qui peuvent présenter des différences au niveau de la morphologie, du tropisme et de l'évolution de l'infection chez l'hôte. D'autre part, ce parasite peut utiliser également un mécanisme d'évasion à la réponse immune qui se traduit par l'acquisition des antigènes de l'hôte. CHESS et coll. (1983) ont montré que les formes trypomastigotes issues de cellules après éclatement, possèdent à leur surface des antigènes cellulaires. De plus, les épimastigotes sont capables d'exprimer à leur surface des protéines du milieu de culture. Par conséquent, le parasite pourrait ainsi se mettre à l'abri de toute attaque par le système immun de

l'hôte.

T. cruzi possède la capacité d'infester plusieurs types de cellules dont le macrophage. Son développement intracellulaire lui permet ainsi d'être à l'abri de toute attaque par les anticorps ou autres éléments du système immunitaire de l'hôte. Cependant, sa destruction à l'intérieur de la cellule est possible après fusion du lysosome macrophagique et de la vacuole parasitophore. Le parasite peut également sécréter une protéase active à pH acide appelée hémolysine qui serait capable de détruire le phagolysosome, permettant ainsi au parasite de gagner le cytoplasme et s'y multiplier (ANDREWS et WHITLOW 1989b).

Le phénomène d'immunosuppression représente une caractéristique universelle des infections parasitaires. En effet, dans certaines affections parasitaires telles que la schistosomiase, le schistosome libère un facteur appelé SDIF (Schistosome-derived-inhibitory-factor) capable d'inhiber *in vivo* et *in vitro* les réponses prolifératives T, un effet qui pourrait expliquer l'inefficacité des cellules T cytotoxiques dans la destruction du parasite (MAZINGUE et coll. 1987).

D'autre part, dans le modèle *Leishmania tropica*, l'infection peut induire une immunosuppression des réactions d'hypersensibilité retardée à médiation cellulaire qui représentent le principal mécanisme effecteur dans la destruction du parasite. Cet état d'immunosuppression s'accompagne de l'exacerbation de la maladie chez les souris sensibles, alors que dans le cas des souris résistantes, la réponse cellulaire augmente au fur et à mesure que les souris guérissent.

L'immunosuppression représente également l'un des problèmes majeurs observés dans le cas d'une infection aiguë par *T. cruzi* aussi bien chez l'homme que chez la souris. Certains travaux ont montré que des trypomastigotes sanguicoles sont capables d'inhiber la capacité de prolifération des lymphocytes B et T à un traitement par des mitogènes tels que la conA ou le LPS (MALECKAR et KIERSZENBAUM 1983, 1984). De plus, l'incubation de cellules spléniques de souris infectées avec des cellules spléniques normales entraîne l'inhibition de ces dernières à proliférer suite à l'addition de conA ou de LPS (RAMOS et coll. 1979).

Certains auteurs s'appuient sur le processus de prolifération polyclonale déclenché après infection pour expliquer le phénomène d'immunosuppression. En effet, les cellules seraient dans état d'activation maximale si bien qu'elles ne peuvent répondre à d'autres stimuli. D'autres auteurs parlent plutôt de l'implication de cellules T suppressives (RAMOS et coll. 1979), de macrophages suppresseurs (REED et coll. 1983), ou encore de cellules NK (HATCHER et coll. 1981). Par ailleurs, des altérations au niveau de l'expression de certains marqueurs lymphocytaires ont été également mises en évidence. SZTEIN et coll. (1990) ont montré que l'incubation de trypomastigotes sanguicoles avec des lymphocytes Th et T cytotoxiques humains stimulés par de la PHA ou un anti-CD3 entraîne une inhibition de 30 à 65% de l'expression du récepteur à l'IL2, mais aussi de toute une série de marqueurs lymphocytaires dont le CD3, CD4, et le CD8. Ces mêmes auteurs, indiquent par la suite que les produits de sécrétion du parasite seraient impliqués dans ce phénomène (KIERSZENBAUM

et coll. 1990).

A la différence de la situation décrite chez l'homme, on assiste chez la souris à une diminution de l'expression de l'IL2. La prolifération lymphocytaire est de ce fait restaurée après addition de l'IL2 exogène (BELTZ et coll. 1988).

En dépit des autres mécanismes développés par le parasite pour échapper à la réponse immune, il est évident que le phénomène d'immunosuppression est lié à l'infection et qu'il pourrait faciliter la dissémination du parasite à l'intérieur de l'organisme de son hôte. Néanmoins, l'origine et la nature des composants mis en jeu dans le déclenchement de ce phénomène restent à déterminer. Leur identification permettra de comprendre certains aspects de l'interaction hôte-parasite, et de mieux cerner certains éléments responsables du désordre immunologique observé en phase aiguë de la maladie.

V.2. Immunopathologie :

Lors d'une infection, *T. cruzi* est capable de pénétrer dans diverses populations cellulaires. La première réaction chez l'hôte se traduit par une inflammation suite à l'éclatement des cellules infectées conduisant à la libération de médiateurs de l'hôte et de composants d'origine parasitaire. Ainsi, l'activation du système immunitaire va s'étendre à d'autres cellules telles que les éosinophiles et les neutrophiles, et le phénomène inflammatoire gagnera d'autres organes de l'hôte, principalement le cœur et le muscle. Certains auteurs indiquent que les phénomènes d'hypersensibilité seraient responsables du développement des myocardites observées en phase aiguë. Cependant, cet aspect est toujours en étude actuellement afin de mieux comprendre la relation entre la réponse immune engendrée par l'hôte et certaines formes de pathologie.

Néanmoins, certains travaux réalisés *in vitro* indiquent que des cellules infestées peuvent présenter des composants parasites à leur surface, d'autre part après leur éclatement elles vont libérer de l'antigène parasite qui va se fixer sur d'autres cellules non infectées. Ces dernières deviendraient alors des cibles de la réponse anticorps et/ou cellulaire effectrice de l'hôte (RIBEIRO-DOS-SANTOS et HUDSON 1980). TAFURI et coll. (1983) ont montré par ailleurs que des éosinophiles pourraient être impliqués dans la destruction des fibres cardiaques chez l'homme pendant la phase aiguë. D'autre part, des travaux réalisés *in vivo* (MOLINA et KIERSZENBAUM 1989a) et *in vitro* (MOLINA et KIERSZENEBAUM 1989b) montrent la présence de

granules de la protéine majeure basique à la surface de cellules mortes.

Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans l'immunité vis-à-vis du parasite et/ou leur implication dans le développement de la pathologie au cours de l'infection reste également très controversé. Par ailleurs, l'un des problèmes majeurs de la maladie de Chagas est l'apparition chez l'hôte d'un phénomène d'autoimmunité se traduisant par des lésions au niveau de certains organes tels que le cœur, le muscle et le nerf périphérique. En raison de la complexité d'étude de cet aspect de la pathologie, jusqu'à présent beaucoup de résultats restent contradictoires et parfois divergents. Quant aux facteurs pouvant être à l'origine de ces manifestations pathologiques, à l'heure actuelle sont émises deux hypothèses :

- Une réactivité croisée entre des antigènes parasitaires et ceux de l'hôte.
- Le phénomène d'activation polyclonale.

V.2.1. Existe-t-il une réactivité croisée entre des antigènes parasitaires et des composants de l'hôte ?:

Dans ce contexte, les premiers travaux se sont basés sur la recherche d'anticorps pouvant réagir avec le parasite et des antigènes de l'hôte. Les anticorps anti-EVI furent parmi les premiers décrits comme réagissant avec les cellules endothéliales et la membrane plasmique du muscle strié de l'hôte (COSSIO et coll. 1974), et l'on a montré leur présence dans 95% des sérums de patients cardiopathiques et 45% de malades asymptomatiques. Le rôle possible de ces anticorps a été pendant un certain temps sujet à débat jusqu'au moment où l'on

a montré l'existence de ce type d'anticorps également dans les sérums de patients atteints d'autres parasitoses (paludisme, leishmaniose, et trypanosomiase africaine), ce qui suggère que la présence de ces anticorps ne serait pas associée spécifiquement à la pathologie de la maladie de Chagas.

WOOD et coll. (1982) ont montré qu'un anticorps monoclonal de classe IgM appelé CE5 produit vis-à-vis de neurones de rat, testé vis-à-vis d'un extrait total d'amastigotes ou d'épimastigotes, reconnaît des composants de 50 à 100 kDa. D'autre part cet anticorps est capable d'induire une lyse des neurones de rat en présence du complément. Ce travail est resté cependant sans suite concernant la caractérisation et l'identification de l'épitope mis en jeu dans cette réactivité croisée.

Récemment, VAN VOORHIS et EISEN (1989) ont caractérisé une protéine de surface de *T. cruzi* associée au flagelle, de poids moléculaire 160 kDa. Les anticorps dirigés vis-à-vis de cette protéine sont capables de réagir également avec le tissu nerveux humain, de rat et de souris et reconnaissent ainsi un composant de 48 kDa. Une partie de la molécule de 160 kDa a été clonée et séquencée. L'épitope mis en jeu dans cette réactivité croisée paraît être limité à une région de 7 à 9 acides aminés. Par conséquent, certains auteurs n'excluent pas l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire consistant en l'expression à la surface du parasite d'antigènes présentant des homologies avec ceux de l'hôte; ce phénomène permettrait de détourner la réponse immune de l'hôte induisant ainsi une réponse de type autoimmun (PETRY et EISEN 1989).

Récemment, l'hypothèse de l'existence d'un mimétisme fonctionnel a été également émise (EISEN et KAHN 1991). Ce phénomène se traduirait par l'expression par le parasite de protéines portant des activités biologiques analogues à celles de certains composants de l'hôte. Cette hypothèse trouve son appui dans certains travaux réalisés sur des protéines parasitaires exprimant des activités enzymatiques. Ainsi, une molécule à activité hémolytique sécrétée par le parasite a déjà été décrite (ANDREWS et WITHLOW 1989). Elle possède un poids moléculaire de 75 kDa et présente des réactivités croisées avec le composant C9 du complément humain (ANDREWS et coll. 1990). Cette molécule montre une activité hémolytique vis-à-vis de cellules de diverses espèces de mammifères. De plus, elle est exprimée par la forme amastigote et présente un maximum d'activité à pH 5,5, ce qui suggère que ce composant joue un rôle dans l'échappement du parasite des vacuoles à milieu acide vers le cytoplasme de la cellule hôte.

JOINER et coll. (1988) ont identifié une glycoprotéine de 87 kDa possédant une activité analogue au DAF (decay-accelerating-factor) qui correspond à une protéine de mammifères jouant un rôle dans l'inhibition de la lyse cellulaire par le complément homologue. Ce composant parasitaire jouerait probablement un rôle dans la résistance des formes trypomastigotes à la lyse directe par le complément.

Enfin une activité sialidase portée par des antigènes de *T. cruzi* a également été décrite (PEREIRA 1983). Cette activité est exprimée par la famille de composants de 85 kDa présentant des homologies de séquence avec des sialidases

de bactéries (KAHN 1990, 1991).

Toutefois, il faut remarquer que les quelques exemples que nous avons discutés sont basés sur les réactivités antigéniques croisées éventuelles entre le parasite et son hôte faisant intervenir une réponse immune de type anticorps. Cependant, bien que certains travaux aient abouti jusqu'à la caractérisation moléculaire de ces composants, ils restent cependant limités quant à l'identification des épitopes impliqués dans ce phénomène. De plus, la plupart des études réalisées dans ce domaine ont bénéficié de l'utilisation d'anticorps monoclonaux et apportent de ce fait des preuves indirectes. Par conséquent, faut-il encore montrer l'implication des molécules décrites dans la pathologie associée à l'infection.

V.2.2. Activation polyclonale :

Il est certain que peu après l'infection, on assiste à l'activation de différentes populations cellulaires du système immunitaire. Néanmoins, certains auteurs ont observé le développement d'une activation polyclonale B et T accompagnée d'une hypergammaglobulinémie (MINOPRIO et coll. 1986a). Cette prolifération polyclonale apparaît très tôt en phase aiguë et persiste pendant toute la phase chronique (MINOPRIO et coll. 1986b, D'IMPERIO LIMA et coll. 1985, 1986). La régulation de la réponse immune se trouve alors perturbée, ce qui conduit à la perte du contrôle de la tolérance des antigènes du soi, ainsi se déclenche un phénomène d'autoimmunité.

Plusieurs auteurs s'accordent pour penser que les lymphocytes T helper sont responsables des lésions inflammatoires observées au niveau du cœur et du tissu nerveux. Ils montrent que le transfert de lymphocytes T L3T4⁺ de souris en phase chronique à des souris saines provoque une destruction du tissu nerveux avec une pathologie comparable à celle observée chez des souris en phase chronique (HONTEBEYRIE et coll. 1987). De plus, le traitement des souris infectées avec un anticorps monoclonal anti-CD4 entraîne une diminution de l'infiltrat de cellules inflammatoires au niveau du cœur (RUSSO et coll. 1988) et une réduction de l'activation polyclonale B (MINOPRIO et coll. 1987).

Certains auteurs évoquent même la présence d'une population lymphocytaire T appelée Th2, et montrent qu'une sous-population T CD4⁺ isolée à partir de souris en phase chronique et transférée à des souris normales, induit une activation polyclonale B. Cette activation est comparable à celle observée chez les animaux en phase chronique avec une augmentation du taux des anticorps de type IgG2a et IgG2b (SPINELLA et coll. 1990).

Il semblerait donc à travers ces observations que les lymphocytes T et plus particulièrement les T helper soient responsables lors de l'infection, de certaines réactions inflammatoires ainsi que de l'activation polyclonale B conduisant à une hypergammaglobulinémie.

Le phénomène d'autoimmunité serait alors la conséquence du dérèglement de certains composants du système immunitaire de l'hôte. Néanmoins, beaucoup

reste à faire sur le plan moléculaire pour la détermination et l'identification des composants parasitaires responsables du déclenchement de ce processus.

TRAVAUX PERSONNELS

La maladie de Chagas représente une parasitose endémique régnant en Amérique du Sud et Centrale. Cependant, cette affection connaît actuellement une extension non négligeable vers des zones de non endémie. De plus, jusqu'à présent aucun traitement chimiothérapeutique ne permet l'élimination radicale du parasite de son hôte vértébré en phase aiguë ou chronique de l'infection. Par conséquent, il devient indispensable de développer des moyens efficaces permettant de limiter les incidences de la maladie et de pouvoir contrôler sa propagation.

A côté des mesures entreprises dans le cadre de la lutte anti-vectorielle avec l'utilisation d'insecticides et de pesticides, il importe de développer des techniques de diagnostic à l'échelle moléculaire, sensibles et spécifiques de cette maladie permettant ainsi de défier les réactivités croisées existant entre *T. cruzi* et d'autres parasites régnant dans la même zone d'endémie. L'établissement de méthodes de dépistage précoce de la maladie permettra de traiter à temps les individus atteints et limiter les contaminations par voie sanguine. D'autre part, le développement d'une stratégie vaccinale basée sur l'utilisation de molécules parasitaires produites par génie génétique, ou de séquences peptidiques correspondantes par voie chimique, devient nécessaire pour le contrôle prophylactique à long terme de la maladie.

Ces aspects constituent les bases sur lesquelles ont été entrepris nos travaux sur les antigènes de sécrétion des formes infectantes de *T. cruzi* : les trypomastigotes.

ARTICLE 1

**Caractérisation des immunogènes majeurs présents à
la surface et dans les produits d'excrétion-sécrétion des
formes trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.**

Dans un premier temps, à l'aide de sérum humains chagasiques et par la technique d'électrophorèse monodimensionnelle, nous avons pu caractériser les antigènes majeurs de surface et d'excrétion-sécrétion des trypomastigotes et qui correspondent à des composants de poids moléculaire :

- 130, 80-110, et 64-68 kDa pour les antigènes de surface
- 160, 130, et 80-110 kDa pour les antigènes ES

L'immunoprécipitation des ESA (6h après la chasse métabolique) par des sérum humains chagasiques suivie d'une électrophorèse bidimensionnelle montre que le complexe de 80-110 kDa regroupe en fait une série de composants (9 à 10 molécules) avec des pH allant de 5,4 à 6,7. La même expérience réalisée sur des ESA 12 h après la chasse métabolique, montre une réduction du nombre de polypeptides dans la région de pH acide.

Dans un deuxième temps, la similarité au niveau poids moléculaire observée entre les antigènes de surface et dans les ESA, nous a amené à réaliser des

expériences d'inhibition de l'immunoprecipitation qui consiste à incuber les sérums chagasiqes avec une fraction d'ESA non marquée avant de les faire réagir avec les antigènes de surface marqués à l'iode 125. Les résultats obtenus suggèrent que parmi les antigènes de surface des trypomastigotes, certains composants sont également excrétés-sécrétés.

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'un anticorps monoclonal (155 D3) anti-85 kDa récepteur de la fibronectine. Cet anticorps, testé vis-à-vis des antigènes de surface marqués à l'iode 125 et libérés dans le milieu de culture, montre une réactivité importante vis-à-vis de trois composants de 85 kDa ayant des pH_i de 5,7 à 6,6. Une autre protéine de 58 kDa avec un pH_i de 6,5-6,6 est également reconnue.

Enfin, dans le but d'étudier la présence possible de l'antigène 85 kDa circulant dans une infection naturelle, une fraction d'IgG purifiée à partir de sérum de rat anti-85 KDa ESA a été utilisée dans un test ELISA sur des sérums humains chagasiqes provenant de la zone d'endémie. Ce test s'est révélé positif dans 98% et 81% des sérums provenant respectivement de Bolivie et d'Argentine.

Dans une expérience préliminaire, le transfert de sérum de rat anti-85 kDa à des rats Fischer mâles suivie de leur infestation avec des trypomastigotes sanguicoles de la souche Tulahuen montre une protection partielle en terme de mortalité.

En conclusion, les résultats de ce travail indiquent que :

- Les composants de surface et les ESA des formes trypomastigotes de *T. cruzi* présentent certaines structures antigéniques communes.
- Le complexe de 85 kDa est représenté en fait par une dizaine de molécules ayant des pHi différents.
- Le polypeptide de 85 kDa peut être détecté dans les sérum de patients chagasiques. L'amélioration de la technique utilisée permettra de contribuer à la mise au point d'un test de diagnostic spécifique de la maladie de Chagas.
- Le composant de 85 kDa pourrait jouer un rôle dans l'immunité contre *T. cruzi* au cours de l'infection.

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

M. A. OUAISI¹*, A. TAIBI¹, J. CORNETTE¹, P. VELGE¹, B. MARTY¹, M. LOYENS¹, M. ESTEVA², F. S. RIZVI¹ and A. CAPRON¹

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

²Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación 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 (Brener, 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. Ouassi

The analysis of the nature and the dynamics of antigenic excretions or secretions, the relationship between such released components and the parasite surface may help in understanding *T. cruzi* infection and immunity. In order to identify the putative immunogenic *T. cruzi* trypomastigote exoantigens, we used serum antibodies from infected patients to immunoprecipitate the products released in the culture medium by [³⁵S]methionine labelled parasites at different times of culture. Both soluble ES and surface-iodinated antigens were compared. The results demonstrated the similarity between the major surface and ES immunogens. The 85 kDa polypeptide which is the fibronectin/collagen receptor protein (Ouaissi, Cornette & Capron, 1986; Velge *et al.* 1988), was also identified in the ES antigens and in the blood of infected patients. Passive transfer of immune serum against the 85 kDa protein to naive rats induced a certain degree of protection against acute lethal *T. cruzi* infection. This component seems to be of interest for defining the immunity developed by the host against *T. cruzi*.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

The Y strain of *T. cruzi* was used throughout the study. Trypomastigotes were maintained in tissue-culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as described elsewhere (Ouaissi *et al.* 1986). The extracellular amastigotes of *T. cruzi* were obtained by using the procedure previously described (Santiago *et al.* 1981). *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and *Leishmania infantum* promastigotes were cultured in Glucose Lactalbumin Serum Haemoglobin medium (GLSH).

Antibodies

The monoclonal antibody (mAb) 155 D3 is directed against *T. cruzi* surface protein (85 kDa) which is part of the parasite fibronectin/collagen receptor proteins (Ouaissi *et al.* 1986). It was produced after fusion of cells from BALB/c mice immunized with *T. cruzi* purified proteins and the non-secretory SP2/O myeloma cell line as described by (Velge *et al.* 1988). Polyclonal immune serum to the 85 kDa polypeptide was raised in rats by multiple intraperitoneal injection of 150 µg of 85 kDa-enriched preparation (ES antigens collected after incubation for 24 h at 37 °C in RPMI) in Freund's Complete Adjuvant (FCA). The animals were boosted intravenously 3 times at weekly intervals with 25 µg of antigen preparation in saline solution. These immune sera were designated as anti-85 kDa ES antigen (anti-85 kDa EEA). The IgG fraction of the polyclonal rat antibody to the 85 kDa antigen was isolated according to the method described by Heide

& Schwick (1978), dialysed against PBS and stored at -70 °C.

Immune rat sera to the 85 kDa protein were also prepared by intraperitoneal injection of rats with the protein electro-eluted from 7.5% SDS-PAGE gels following the procedure described by Mendel-Hartvig (1982). The immune sera were designated as anti-85 kDa EE antigen (anti-85 kDa EEA). Sera from rats immunized with FCA alone and challenged with IFA and serum from rats immunized with *Toxoplasma gondii* antigens (kindly given by Dr P. Ridel) were also used as controls.

Human immune sera

Immune sera from *T. cruzi*-infected Bolivian patients presenting the asymptomatic or cardiac form of the disease, were generously provided by Dr Y. Carlier (Université libre, Bruxelles, Belgium). Sera from *T. cruzi*-infected Argentinian patients were taken from the serum bank of the Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires. Sera from normal European subjects were also used.

Surface radio-isotope labelling with ¹²⁵Iodine

Parasites were surface labelled with ¹²⁵I by the Iodogen procedure (Kasper, Crabb & Pfefferkorn, 1983). Briefly, 1 mg of Iodogen (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill) was dissolved in 1 ml of chloroform, and 625 µl of this solution was transferred to 5 ml glass tubes. The solvent was evaporated under a stream of N₂, leaving a coating of Iodogen bound to the tube.

About 2 × 10⁸ trypomastigotes were washed in PBS, resuspended in 0.5 ml of PBS and incubated in the glass tube containing dried Iodogen in the presence of 300 µCi of Na ¹²⁵I for 15 min at 0 °C. Labelled parasites were washed 3 times in PBS and pelleted by centrifugation at 2000 g for 15 min. Trypomastigote lysates (TL) were prepared by resuspending the parasites in 0.5 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 6.8 containing 1% NP-40, 100 µg/ml aprotinin and 2 mM PMSF (phenylmethylsulphonyl-fluoride). The lysate was incubated overnight at 4 °C. The insoluble material was removed by centrifugation at 7000 g for 15 min at 4 °C. In some experiments, labelled parasites were incubated in 0.5 ml of Hanks' balanced salt solution (HBSS) for 1 h at 37 °C. The supernatant fraction containing the ES was removed by centrifugation. Immunoprecipitation using 155D3 mAb was performed using the above preparation and following the procedure as previously described (Velge *et al.* 1988).

[³⁵S]methionine labelling

Trypomastigotes were resuspended at a concen-

tration of 10^8 parasites/ml in methionine-free minimum essential medium (GIBCO, Grand Island, NY) containing 2% (v/v) dialysed, heat-inactivated foetal calf serum and 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ [^{35}S]methionine (800 Ci/mmol, Amersham). The trypomastigotes were labelled for 1 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. At the end of the labelling period, the parasites were washed in serum-free tissue-culture medium (RPMI 1640) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 1 mg/ml of cold methionine. Different aliquots of labelled trypomastigotes (2×10^6) were incubated in 5 ml of RPMI 1640 containing 2% heat-inactivated foetal calf serum, penicillin and streptomycin at 37 °C for the following periods: 3, 6 and 12 h. The supernatant fraction and the pellet of each sample were recovered. The pellets were lysed with 0.2 ml of 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% NP-40, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of aprotinin and 2 mM PMSF, TL were obtained after centrifugation at 7000 g for 15 min at 4 °C. All supernatant fractions were sterilized by Millipore filtration (Swinnex 0.22 μm). An aliquot of each fraction (ES and TL antigens) was taken and its radioactivity measured as described by Pelham & Jackson (1976). The remaining antigen preparation was stored at -70 °C. At each time, the viability of the parasites was assessed using a dye-exclusion test (Jaffe, Grimaldi & McMahon Pratt, 1984). More than 96% of the parasites remained viable during the 24 h incubation period, as assessed by direct haemocytometer counts. Similar results were obtained using the dye test.

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was carried out in 1.5 ml vol. microfuge tubes. Aliquots of labelled parasite surface antigens (10^6 cpm) or ES products (5×10^5 cpm) were diluted with 500 μl of 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 2 mM PMSF and 0.3% sodium dodecyl sulphate (SDS), and incubated overnight at 4 °C with 20 μl of immune or normal human serum. Immune complexes were adsorbed with 10 mg (dry weight) of Protein A-Sepharose 4B (Pharmacia, Uppsala, Sweden) by rocking for 4 h at 4 °C. Adsorbed antigens were eluted by suspending washed Sepharose pellets in 40 μl of 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 3% SDS, 10% sucrose and 0.1 M dithiotreitol and boiling for 4 min in a water bath. In some experiments, immune sera were first incubated with unlabelled ES for 4 h at 4 °C, then with iodine-labelled parasite surface antigens overnight. Samples were then processed following the procedure as described above. Preparations of surface-labelled ES antigens (10^6 cpm) or [^{35}S]methionine-labelled ES products (5×10^5 cpm) were immunoprecipitated with 155D3 mAb (20 μl of ascitic fluid) or SP20 ascites.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

This procedure was performed as described by Garrels (1979). Isoelectric focusing was performed in 1.3 mm diameter capillary tubes using 3.5–10 carrier ampholines (LKB, Bromma, Sweden). In our studies, limit values of the resulting pH gradient were respectively 8.3 and 3.8. Immune complexes were solubilized in 9.95 M urea, 4% NP 40, 2% ampholines and 100 mM dithiothreitol.

Dissociation of antigen-antibody complexes of serum and antigen detection by the ELISA

Possible complexed antigens in serum were dissociated by the method described by Sadigursky, von Reuter & Santos-Buch (1988) with some modifications. In brief, 25 μl of patient or control serum was mixed with an equal volume of 1 mM glycine-HCl buffer, pH 2.8, containing 16 mM NaCl in order to dissociate the complexes. Just prior to transfer to a 96-well polyvinylchloride microtitration plates (Dynatech Laboratories, Inc.), the sera were serially diluted 2-fold in 160 mM PBS, pH 7.4. The final pH of the sera was 7.0. The plates were incubated overnight at 4 °C, and then washed 3 times in PBS, pH 7.4, containing 0.1% Tween. After saturating with 1% BSA in PBS for 3 h at room temperature, the wells were reacted with 100 μl of PBS-BSA containing 3 μg of anti-85 kDa ESA rat IgG antibodies and incubated overnight at 4 °C. After 2 washings with PBS-Tween 0.1%, 100 μl of peroxidase-labelled antibodies against rat IgG (Pasteur Institute, Lyon, France) were added at a 1:10000 dilution in PBS-BSA to each well, followed by incubation at 37 °C for 1 h. After 2 washings with PBS-BSA and 1 wash with distilled water, 100 μl of the enzyme substrate (O-phenylenediamine) was incubated for 30 min at room temperature, and the enzyme reaction was stopped with 100 μl of 2M sulphuric acid. The intensity of the colour reaction was read at 492 nm using a Titertek Multiscan reader (Flow Laboratories, Baar, Switzerland). A standard curve was generated on each plate using serial dilutions of ES antigens (initial concentration of 1 mg/ml) in normal human serum. The ES antigens and serum mixtures were treated with 1 mM glycine-HCl buffer, neutralized and then treated for antigen detection as above.

Protective immunity assay

The Tulahuen strain was maintained by serial passage in male Fischer rats as reported elsewhere (Rivera-Vanderpas *et al.* 1983). Three groups of 4 adult male rats were injected intravenously with either 2 ml of rat anti-85 kDa immune serum, or normal rat serum. Another control group was used as inoculum control. All of the rats were inoculated

intraperitoneally with 2×10^5 trypomastigotes 3 h after receiving normal and immune sera.

RESULTS

Excretory-secretory and surface components

SDS-PAGE and fluorography of the ES demonstrated a large number of labelled proteins. In contrast, analysis of the immunoprecipitated products produced much simpler patterns, with a limited number of major components (Fig. 1). In the trypomastigote lysates, 3 major bands with apparent molecular weights of 160, 130 and 80–110 kDa were detected after 3, 6 and 12 h of pulse-chase experiment (Fig. 1, Lanes A, B and C). Other minor antigens were also found. In the supernatant fractions, the ES antigens contained 3 major polypeptides of 160, 130 and 80–110 kDa (Fig. 1, Lanes D and E). Less

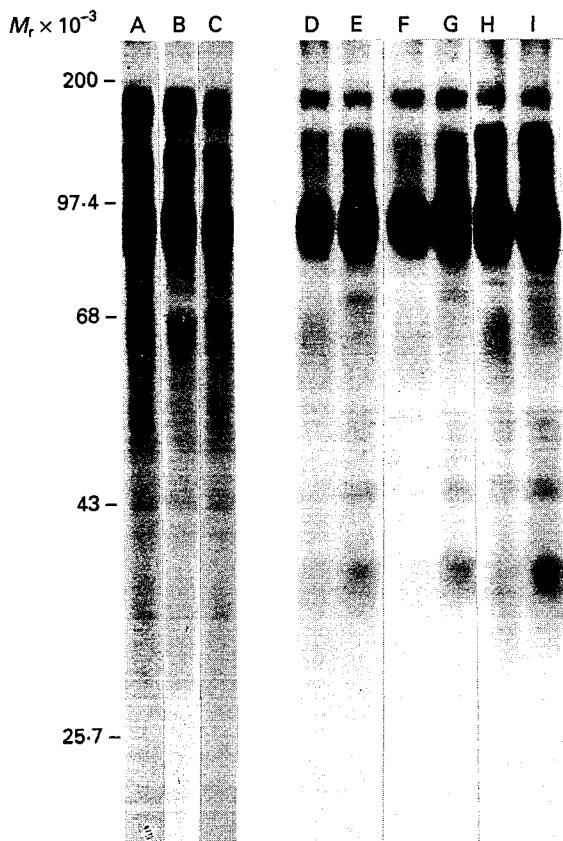


Fig. 1. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from [^{35}S]methionine-labelled trypomastigote lysate (TL) and excretory-secretory antigens (ES) using *Trypanosoma cruzi*-infected human sera. The lanes represent as follows: A, B and C; TL preparations after 3, 6 and 12 h of chase experiment respectively, immunoprecipitated by Chagasic human serum; D, F and H; ES preparations after 3, 6 and 12 h of chase experiment respectively, immunoprecipitated by serum from a patient with chronic asymptomatic form of the disease; E, G and I; same as above using serum from a patient with chronic cardiac form of the disease.

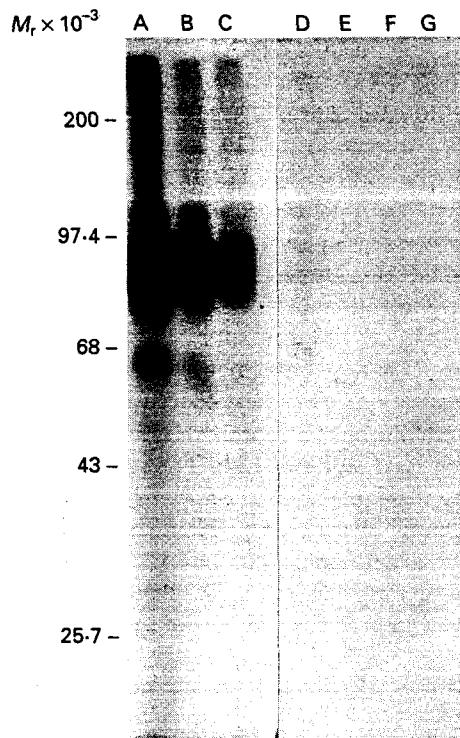


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from ^{125}I -labelled trypanomastigote surface antigens using three *Trypanosoma cruzi*-infected human sera (A, B and C). In D, E and F, the immune sera were previously incubated with ES antigens before contact with aliquots of parasite labelled surface material. G, eluted product from normal human serum.

prominent polypeptides could also be distinguished on the gels.

Trypomastigote culture forms were then labelled by the Iodogen procedure, extracted in NP-40 and immunoprecipitated by human Chagasic patients' sera. Several antigenic polypeptides (130, 80–110 and 64–68 kDa) were consistently immunoprecipitated (Fig. 2, Lanes A, B and C). Some minor bands of 44, 52, 180 and 190 kDa were also observed. There was no variation in the pattern of antigens precipitated by sera from patients presenting the cardiac form of the disease, as compared to that observed with sera from asymptomatic form. Control precipitations with normal human sera were all negative (Fig. 2, Lane G).

Two-dimensional analysis of ES antigens (ES preparation of 6 h after chase experiment) immunoprecipitated by human Chagasic serum revealed several spots with a wide range of isoelectric points (pI): (protein 1: 160 kDa, pI 6.9; protein 2: 130 kDa, pI 6.8; protein 3: 80–110 kDa, pI in the region between 5.4 and 6.7) (Fig. 3A). This pattern could reflect a charge heterogeneity of the polypeptides in the 80–110 kDa zone. Other minor polypeptides were identified on the gels (protein 4: 33 kDa, pI 6.7–6.9; protein 5: 68 kDa, pI 6.4–6.5).

When ES antigens (preparation of 12 h after chase experiment) were immunoprecipitated by human

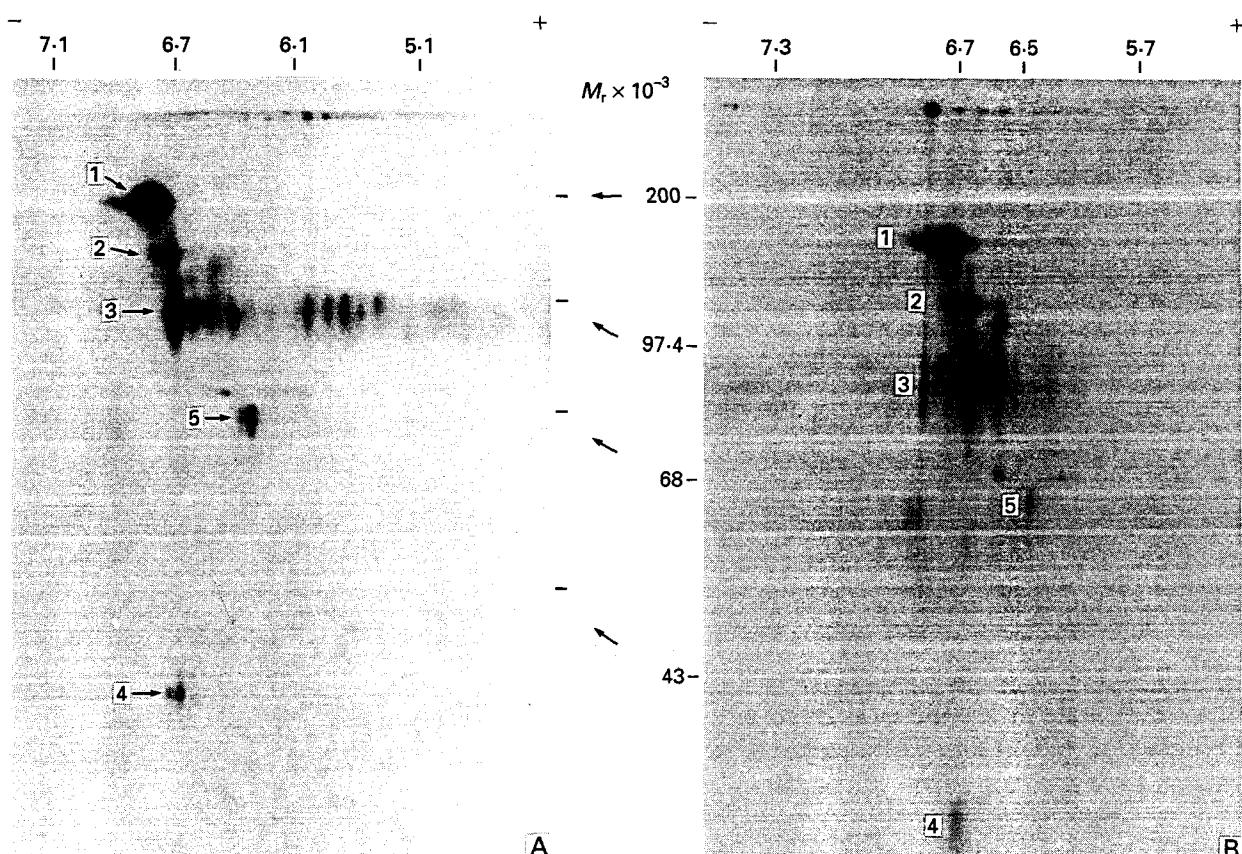


Fig. 3. 2D-autoradiograph maps of [^{35}S]methionine-labelled ES antigens immunoprecipitated by human Chagasic serum. (A) ES preparation of 6 h after chase experiment. (B) ES preparation of 12 h after chase experiment. (—) and (+) represent, respectively, the basic and acidic poles of the gel. Numbers indicate the determined pH gradient values.

Chagasic serum and analysed by the same technique, a reduction in the number of polypeptides identified in the acidic pH region was observed (Fig. 3B). Nevertheless, it is noteworthy that new spots appeared in the basic pH region.

Common antigenic structure of excretory-secretory and surface antigens

The immunoprecipitation of ES and surface antigens suggested the similarity between the molecular weights of these polypeptides. The following complementary investigations were done in order to examine this possibility. Infected human immune serum was first incubated with aliquots of tryptomastigote ES antigens, then transferred onto Protein A-Sepharose. After adsorption, Protein A-Sepharose beads were washed, then allowed to react with a detergent extract of surface-labelled tryptomastigotes. Products eluted from the immunoadsorbent were analysed by SDS-PAGE. Results presented in Fig. 2 (Lanes D, E and F), show that the incubation of infected human serum with ES antigens substantially inhibited further binding of tryptomastigote surface antigens to specific antibodies.

Identification of the 85 kDa polypeptide released in the culture medium

As shown in Fig. 4, the mAb 155D3 immunoprecipitated an 85 kDa polypeptide from methionine-labelled tryptomastigote antigens (Y strain). With the Tulahuen strain, the immunoprecipitated polypeptide had an apparent molecular weight of 82 kDa indicating that these proteins expressed cross-reactive antigenic determinants.

The presence of the 85 kDa protein in iodine labelled tryptomastigote surface antigens which are released in the culture medium was studied by immunoprecipitation and 2D-gel analysis using the 155 D3 mAb. As shown in Fig. 5 a striking feature concerned the localization of the 85 kDa polypeptide, which all focused at two different pH values. The major part of the 85 kDa antigen was found at pH 6.5–6.6, whereas a substantial amount of the antigen stabilized at pH 5.7. An additional band of 58 kDa with pI 6.5–6.6 was also visualized.

Detection of the 85 kDa polypeptide in serum samples by ELISA

We first examined the specificity of rat antibodies to the parasite 85 kDa polypeptide by using immuno-

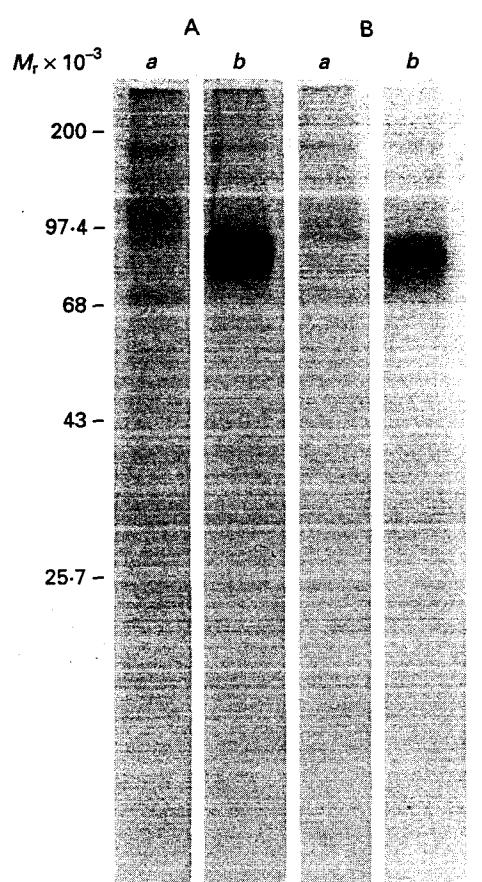


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from [^{35}S]methionine-labelled trypomastigote antigens using 155D3 mAb and ascitic fluid from SP₂O cells. (A) Y strain; a: SP20 ascite, b: 155D3 mAb. (B) Tulahuen strain; a: SP20 ascite, b: 155D3 mAb.

precipitation technique and [^{35}S]methionine-labelled trypomastigote antigens and epimastigote and *L. infantum* promastigote NP-40-soluble antigens. As shown in Fig. 6, *T. cruzi*-infected rat serum reacted against a large set of proteins in trypomastigote antigens. In contrast, polyclonal rat sera to 85 kDa polypeptide (anti-85 kDa ESA and EEA) revealed a component of molecular weight 85 kDa. No radioactive bands were revealed in the case of epimastigote and promastigote NP-40-soluble antigens (Fig. 7). Moreover, rat antiserum to FCA or serum from rats immunized with *Toxoplasma gondii* antigens did not react against trypomastigote antigens.

The above observations allowed us to investigate the presence of the 85 kDa antigen in *T. cruzi*-infected patients' sera. Standard *T. cruzi* soluble antigens, diluted in normal serum and treated as described in the Materials and Methods section for the immune complex dissociation in the ELISA test, yielded net absorbance values exceeding the cut-off level of assay. In addition, there was a concentration-dependent binding of antibodies to the antigen diluted in normal human serum coated on plates (Fig. 8).

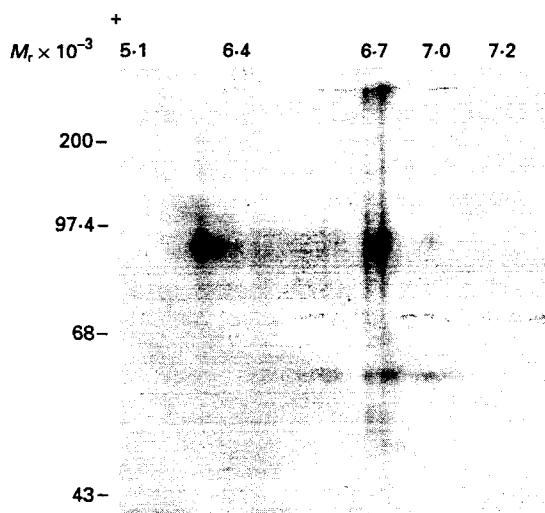


Fig. 5. 2D-PAGE of iodine-labelled trypomastigote surface antigens released in the culture medium and immunoprecipitated by 155 D3 mAb.

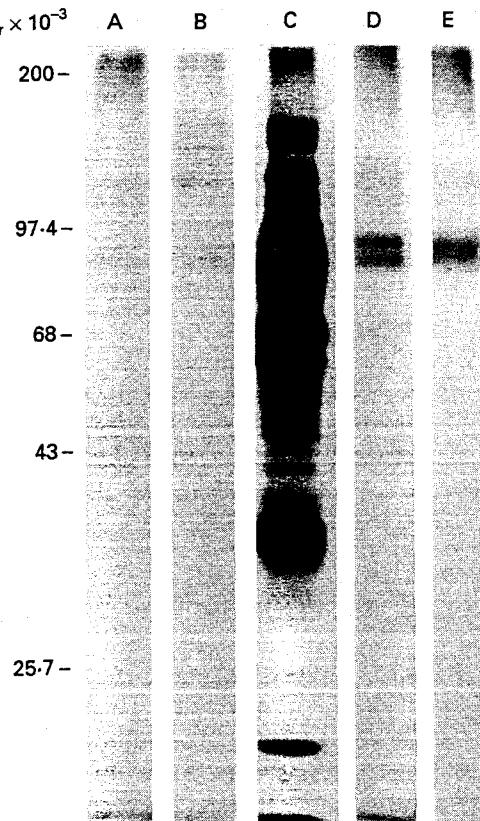


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from [^{35}S]methionine-labelled trypomastigote antigens using normal rat serum (A), serum from rat immunized with *Toxoplasma gondii* soluble antigens (B), *T. cruzi*-infected rat serum (C), anti-85 KDa RA (D) and anti-85 kDa EEA (E).

The presence of *T. cruzi* antigens was investigated by the ELISA test in the serum of 58 patients from Bolivia and 22 patients from Argentina. Both populations were living in regions highly endemic for *T. cruzi*. Fig. 9 shows the individual level of the parasite antigen in these sera expressed as optical

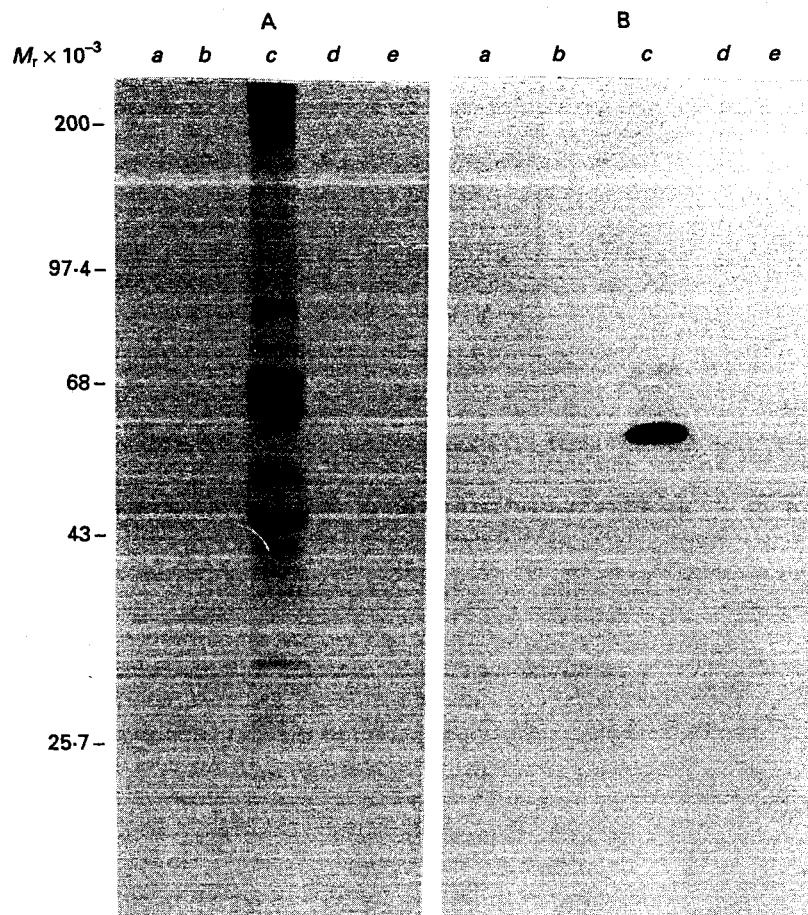


Fig. 7. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from [³⁵S]methionine-labelled *Trypanosoma cruzi* epimastigote (A) and *Leishmania infantum* promastigote antigens (B). Normal rat serum (a); serum from rat immunized with *Toxoplasma gondii* soluble antigens (b); *T. cruzi*-infected rat serum (c); anti-85 kDa RA (d) and anti-85 kDa EEA (e).

density. There is a statistically significant difference ($P < 0.001$) between the *T. cruzi*-infected patients from Bolivia (0.52 ± 0.15) or Argentina (0.36 ± 0.08 , chronic phase) and the controls (0.22 ± 0.03) or *T. gondii* (0.20 ± 0.03) infected patients. Considering the upper limit of normal values as two standard deviations above the mean of the control group, the 85 kDa antigen could be detected in 98% of the Bolivian sera and in 81% of the sera from Argentina. Two sera from the acute phase of the disease were positive.

Protective effect of in vivo transfer of polyclonal antiserum to 85 kDa polypeptide on infected rat survival

Rat serum to *T. cruzi* 85 kDa protein was tested for its ability to protect a naive rat from death during the acute phase of the disease when the immune serum was given before inoculation of the parasite. As shown in Fig. 10, all the animals in the group receiving normal rat serum and the non-treated rats died between the 21st and the 31st day of infection. In contrast, the *in vivo* transfer of 1 ml of polyclonal antiserum to 85 kDa protein induced a partial

protection. Indeed, two rats in this group survived the acute phase of the disease.

DISCUSSION

The biological significance of the *in vitro* excreted-secreted products of *Plasmodium falciparum* or *Leishmania* species has been well documented (Gabrielsen, Jensen & Boland, 1983; Delplace, 1985; Rodriguez, Hernandez & Merino, 1983). Little is known about the ES antigens of *T. cruzi*. In the present study, we have analysed trypomastigote ES antigens, and examined those components located also on the surface of the parasites. By using the immunoprecipitation technique with human immune sera, we have defined a series of major immunogenic components in the ES material with apparent molecular weights of 160, 130 and 80–110 kDa. The trypomastigote surface also bears the 130 kDa band, the 80–110 kDa complex and other minor components. Two-dimensional analysis of [³⁵S]methionine-labelled ES antigens, showed a certain degree of complexity probably due to the charge heterogeneity. The most striking feature concerned the distribution of the 80–110 kDa poly-

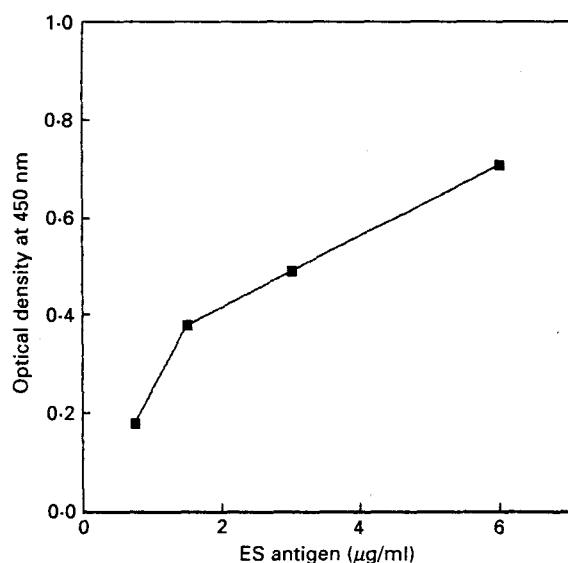


Fig. 8. Concentration-dependent binding of anti-85 kDa IgG antibodies to *Trypanosoma cruzi* ES antigens dissolved in control serum.

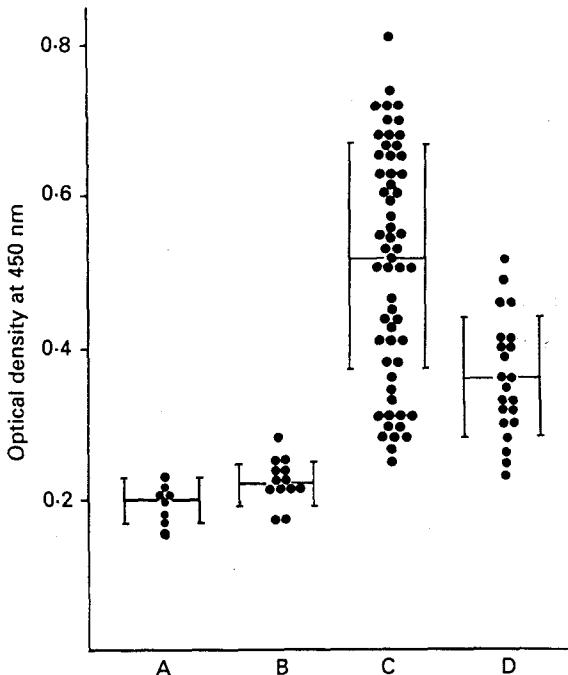


Fig. 9. Circulating 85 kDa protein in sera from patients infected with *Trypanosoma cruzi* measured by the ELISA test with anti-85 kDa IgG antibodies. (A) Sera from patients infected with *Toxoplasma gondii* ($n = 8$); (B) normal human sera ($n = 13$); (C) sera from Bolivian patients ($n = 58$); (D) sera from Argentinian *T. cruzi*-infected patients ($n = 22$).

peptides which showed a wide distribution in the region between pH 5.4 and 6.7. The immunoprecipitation of iodine-labelled trypomastigote surface antigens released in the culture medium by 155 D3 mAb followed by 2D-gel analysis, revealed the 85 kDa polypeptides with an approximate pI of 6.5–6.6 and 5.7, and the 58 kDa component with

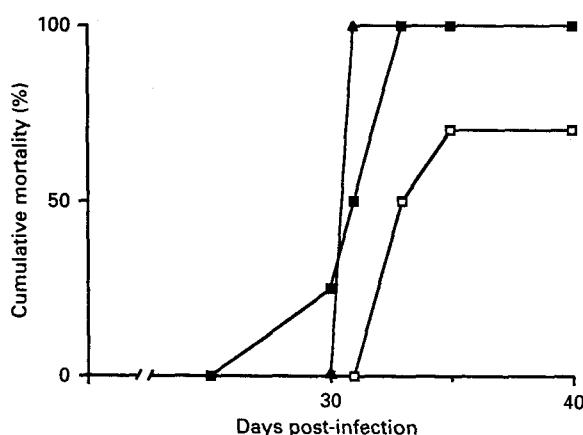


Fig. 10. The effect of the passive transfer of rat anti-85 kDa immune serum (□) compared with that of control normal rat serum (■) on the infection of Fischer rats with *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. The untreated group was used as inoculum control (▲).

pI 6.5–6.6. These polypeptides correspond to the antigens previously detected by monodimensional electrophoresis (Ouaissi *et al.* 1986; Velge *et al.* 1988). The localization of the 85 kDa polypeptide at two different pH values in 2D-gel analysis could correspond to a variable glycosylation of the molecules. These observations could be related to those reported by Andrews *et al.* (1984). Indeed, 2D-gel analysis of iodine-labelled trypomastigote surface antigens revealed several components exhibiting similar molecular weight (85 kDa) with a wide range of isoelectric points.

To further study the expression of the 85 kDa polypeptide in relation to the parasite developmental stages, we have prepared polyclonal antibodies to these polypeptides using the 85 kDa enriched ES preparations or the 85 kDa polypeptide electro-eluted from SDS-PAGE as immunogens. The results obtained demonstrated that the antigen is absent from *T. cruzi* epimastigote and *Leishmania* promastigote.

The larger sets of antigens are most prominent both on the surface of *T. cruzi* trypomastigotes and among the molecules released into tissue-culture medium. Although these similarities in molecular weights do not demonstrate homology between ES and surface molecules, the competition experiments demonstrated the common antigenic structure of the ES and the surface antigens.

The glycoprotein with molecular weight of approximately 85 kDa was identified in both ES material and at the parasite surface. Our antibody to the 85 kDa proteins reacted against Tehuantepec, Y and Tulahuen strains (demonstrated for the first time in the present study). Some variations were observed in the apparent molecular weights of the antigens (82 kDa in the case of the Tulahuen strain). Similar variation in size was reported by Abuin *et al.* (1986) in the case of *T. cruzi* Tc-85 glycoprotein. Indeed,

the authors have shown that a monoclonal antibody H1A10 which defined an 85 kDa glycoprotein on the surface of culture-derived trypomastigotes form of *T. cruzi* Y strain, reacted against proteins of molecular weights 85, 89, 82, 78 and 72 kDa depending upon the strains and clones, and also metacyclic forms of the parasite used. The polymorphic nature of *T. cruzi* antigens and the large degree of genetic variability among different parasite stocks might explain the apparent difference in molecular weight of the 85 kDa proteins.

If the parasite produces this group of antigenic proteins *in vitro*, it is possible that these antigens could be detected within the serum of infected patients. Accordingly, the test for circulating antigen that is described here was designed to detect these parasite polypeptides. When sera were pre-treated with glycine buffer to dissociate immune complexes, the antigen concentration could be measured at relatively high levels in *T. cruzi*-infected human sera from populations living in regions highly endemic for *T. cruzi* despite the fact that the individuals could be infected by different strains of the parasite. The 85 kDa proteins circulating in the serum can be free or complexed.

The immune recognition of parasites is extremely complex. Recent studies on *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum* have demonstrated that culture-derived exoantigens might be a source of parasite material participating in the induction of immune response of the host (Smith *et al.* 1981; Jepsen, 1983). Studies accumulated during the past few years have shown the importance of the immune response in host defence against the infection with *T. cruzi*. The passive transfer of specific anti-*T. cruzi* antibodies (Krettli & Brener, 1976; McHardy, 1977) or monoclonal antibodies (Segura *et al.* 1986) and spleen cells from *T. cruzi*-infected mice (Trischmann & Bloom, 1980) can protect normal recipients against the infection.

The immune sera from *T. cruzi*-infected hosts recognized a large number of parasite proteins when analysed by SDS-PAGE and immuno-blotting technique. The immunoprecipitation of the ES and surface antigens showed a reduced number of major immunogens including the 85 kDa trypomastigote surface antigen which is part of the trypomastigote fibronectin/collagen receptor proteins. The involvement of these proteins in the interaction between *T. cruzi* and vertebrate cells has been previously reported (Ouaissi *et al.* 1984, 1986; Velge *et al.* 1988). An interesting observation is that rat antibodies to 85 kDa protein diminished the invasion of cells by the parasite *in vitro*. These results allowed us to investigate the eventual protective effect of antibodies to the 85 kDa polypeptide *in vivo*. The data presented here demonstrated that passive transfer of the immune serum could induce a partial protection against the lethal infection with *T. cruzi*.

In conclusion, our study demonstrated for the first time the common antigenic structure of *T. cruzi* trypomastigote ES and surface antigens. Among these components, the 85 kDa polypeptide was found circulating in the blood of infected patients. This may provide a means of the chemotherapeutic follow up by detecting circulating antigen of *T. cruzi* in the absence of parasites in the blood. On the other hand, the *in vivo* experiments showed that antibodies to the 85 kDa protein may induce protective immunity. Studies are in progress in our laboratory to test the eventual protective effect of immunization with purified antigen, and to determine the best adjuvant and the route of immunization which could induce the optimal protection.

This work received financial support from INSERM U167-CNRS 624 the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases and the European Economic Community (EEC). We are indebted to Professor Y. Carlier who generously provided the sera from *T. cruzi*-infected patients. Dr M. Esteve is a recipient of a French Government Post-Doctoral fellowship (Ministry of Foreign Affairs).

REFERENCES

- ABUIN, G., GONCALVES, M. F., ALVES, M. J. M. & COLLI, W. (1986). Variations in Tc-85 molecular size. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **81**, 88 (Abstract).
- AFFRANCHINO, J. L., IBANEZ, C. F., LUQUETTI, A. O., RASSI, A., REYES, M. B., MACINA, R. A., ASLUND, L., PETTERSSON, U. & FRASCH, A. C. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **34**, 221-8.
- ANDREWS, N. W., KATZIN, A. M. & COLLI, W. (1984). Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two-dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *European Journal of Biochemistry* **140**, 599-604.
- ARAUJO, F. G. (1986). Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies to related trypanosomatids. *Infection and Immunity* **53**, 179-85.
- BEARD, C. A., WRIGHTSMAN, R. A. & MANNING, J. E. (1985). Identification of monoclonal antibodies against the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* by use of iminobiotinylated surface polypeptides. *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**, 199-212.
- BRENER, Z. (1982). Recent developments in the field of Chagas' disease. *Bulletin of the World Health Organization* **60**, 463.
- DELPLACE, P., DUBREMETZ, J. F., FORTIER, B. & VERNES, A. (1985). A 50 Kilodalton exoantigen specific to the merozoite release-reinvasion stage of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **17**, 239-51.
- DRAGON, I. A., BROTHERS, V. M., WRIGHTSMAN, R. A. & MANNING, J. (1985). A Mr 90 000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**, 213-29.

- FISCHER, E., OUAISSI, M. A., VELGE, P., CORNETTE, J. & KAZATCHKINE, M. D. (1988). gp 58/68 a parasite component which contributes to the escape of the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology* **65**, 299–303.
- GABRIELSEN, A. A., JENSEN, J. B. & BOLAND, M. T. (1983). Identification and partial characterization of exoantigens derived from medium used to culture *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **32**, 671–67.
- GARRELS, J. I. Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 7961–77.
- JAFFE, C. L., GRIMALDI, G. & MCMAHON PRATT (1984). The cultivation and cloning of *Leishmania*. In *Genes and Antigens of Parasites: a Laboratory Manual*, (ed. Møser, C. M.) p. 47 Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- JEPSEN, S. (1983). Inhibition of *in vitro* growth of *Plasmodium falciparum* by purified antimalarial human IgG antibodies. Isolation of target antigens from culture supernatants. *Scandinavian Journal of Immunology* **18**, 567–71.
- JOINER, K., RIMOLDI, M. T., KIPNIS, T., DA SILVA, W. D., HAMMER, C. H. & SHER, A. (1987). Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* produce molecules which accelerate the decay of complement C3 convertases. *Complement* **4**, 175 (Abstract).
- KASPER, L. H., CRABB, J. H. & PFEFFERKORN, E. F. (1983). Purification of major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with monoclonal antibody. *Journal of Immunology* **130**, 2407–12.
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology* **116**, 755–60.
- MCHARDY, N. (1977). Passive immunization of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. *Tropenmedizin und Parasitologie* **28**, 195–201.
- MENDEL-HARTIG, I. (1982). A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* **121**, 215–17.
- NUSSENZWEIG, V., DEANE, L. M. & KLOETZEL, H. (1963). Differences in antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* **14**, 221–4.
- OROZCO, O., AFCHAIN, D., DISSOUS, C., RODRIGUEZ, C., OVLAQUE, G., LEMESRE, J. L., LOYENS, M. & CAPRON, A. (1984). Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **33**, 560–8.
- OUAISSE, M. A., AFCHAIN, D., CAPRON, A. & GRIMAUD, J. A. (1984). Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* and their biological function. *Nature, London* **308**, 380–2.
- OUAISSE, M. A., CORNETTE, J. & CAPRON, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* **19**, 201–11.
- PELHAM, H. R. B. & JACKSON, R. J. (1976). An efficient mRNA dependent translation system from reticulocyte lysates. *European Journal of Biochemistry* **67**, 247–56.
- PLATA, F., GARCIA-PONS, F. & EISEN, H. (1984). Antigenic polymorphism of *Trypanosoma cruzi*: clonal analysis of trypomastigote surface antigens. *European Journal of Immunology* **14**, 392–9.
- RIVERA-VANDERPAS, M. T., RODRIGUEZ, A. M., AFCHAIN, D., BAXIN, H. & CAPRON, A. (1983). *Trypanosoma cruzi*: variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Tropica* **40**, 5–10.
- RODRIGUEZ, N., HERNANDEZ, A. G. & MERINO, F. (1983). Effect of purified excreted factor from *Leishmania brasiliensis* on macrophage activity. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **72**, 206–10.
- SADIGURSKY, M., VON KREUTER, B. F. & SANTOS-BUCH, C. A. (1988). Development of chagasic autoimmune myocarditis associated with anti-idiotype reaction. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **83**, 363–6.
- SANTIAGO, A. R., AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1981). Specific antigens of *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes. *Annales Société Belge de Médecine Tropicale* **61**, 369–78.
- SCHARFSTEIN, J., RODRIGUES, M. M., ALVES, C. A., SOUZA, W., PREVIATO, J. O. & MENDONCA-PREVIATO, L. (1983). *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *Journal of Immunology* **131**, 972–6.
- SCHECHER, M., VOLLMER, A., MARINKELLE, C. J., FLING, J. E., GUHL, F. & MILES, M. A. (1983). Purified *Trypanosoma cruzi*-specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet* **ii**, 939–41.
- SEGURA, E. L., BUA, J., ROSENSTEIN DE CAMPANINI, A., SUBIAS, E., ESTEVA, M., MORENO, M. & RUIZ, A. M. (1986). Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lysis activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunology Letters* **13**, 165–71.
- SMITH, R. D., JAMES, M. A., RISTIC, M., AIKAWA, M. & VEGAYMURGUIA, C. A. (1981). Bovine babesiosis: Protection of cattle with culture derived soluble *Babesia bovis* antigen. *Science* **212**, 335–8.
- TRISCHMANN, T. M. & BLOOM, B. R. (1980). *Trypanosoma cruzi*: ability of T cell-enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Experimental Parasitology* **49**, 225–32.
- VELGE, P., OUAISSE, M. A., CORNETTE, J., AFCHAIN, D. & CAPRON, A. (1988). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen-binding protein: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* **97**, 1–14.



ARTICLE 2

***Trypanosoma cruzi : un épitope glycanique défini par
un anticorps monoclonal comme marqueur possible
de la phase aiguë de la maladie de Chagas***

Etant donné que la molécule de 85 kDa représente un composant majeur parmi les antigènes ESA de *T. cruzi*, dans ce travail, nous avons essayé d'étudier la possibilité d'utilisation de ce polypeptide comme marqueur de l'infection.

Nous avons d'abord produit un anticorps monoclonal de classe IgM appelé VG3/G11. Cet anticorps, testé en immunofluorescence indirecte montre une réactivité vis-à-vis de tous les stades de développement de *T. cruzi* (épimastigotes, trypomastigotes et amastigotes). Il reconnaît un épitope d'un complexe de 82-86 kDa à la fois en immunoprécipitation vis-à-vis des antigènes de surface des trypomastigotes marqués à l'iode 125, et en immunotransfert vis-à-vis des ESA et des antigènes solubles des trypomastigotes après lyse par le Nonidet P40.

L'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal VG3/G11 est de nature glycanique puisque la réactivité de reconnaissance est totalement abolie après traitement de l'antigène parasitaire par le périodate ou la N-glycanase.

Le deuxième volet de ce travail a consisté en l'utilisation de l'anticorps VG3/G11 dans un test de capture de complexes immuns circulants dans les sérum s de malades chagasiq ues. Différents isotypes spécifiques ont été recherchés: IgM, IgG, IgA.

La technique consiste à fixer l'anticorps monoclonal sur un support solide, d'incuber les sérum s humains chagasiq ues avant de faire réagir des anticorps anti-immunoglobulines humaines (IgG, IgM, ou IgA) marqués à la phosphatase alcaline. Dans ce test, ont été utilisés des sérum s de patients en phase aiguë et en phase chronique de la maladie, ainsi que des sérum s d'individus atteints d'autres parasitoses (toxoplasmose, leishmaniose, filariose) pris comme contrôles.

Dans les sérum s de phase aiguë étudiés, les complexes immuns circulants contenant des anticorps IgG, IgM, et IgA spécifiques ont été détectés dans respectivement 69%, 84%, et 76% de cas, alors que des pourcentages beaucoup plus faibles ont été obtenus dans le cas de patients en phase chronique et correspondent respectivement à 16%, 8%, et 10%.

Les résultats obtenus indiquent que la détection de complexes immuns circulants serait liée à la présence de parasites dans la circulation.

Par conséquent, la technique de capture de complexes immuns circulants essentiellement IgM dans les sérum s de patients chagasiq ues pourrait être considérée comme un test de diagnostic spécifique de la phase aiguë.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 45(2), 1991, pp. 214-225
 Copyright © 1991 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

TRYPANOSOMA CRUZI: A CARBOHYDRATE EPITOPE DEFINED BY A MONOCLONAL ANTIBODY AS A POSSIBLE MARKER OF THE ACUTE PHASE OF HUMAN CHAGAS' DISEASE

M. ALI OUAISSE, A. TAIBI, M. LOYENS, U. MARTIN, D. AFCHAIN, C.
 MAIDANA, C. CAUDIOTI, J. CORNETTE, A. MARTELLEUR, P. VELGE, B.
 MARTY, AND A. CAPRON

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, Lille, France; CAMIECH Programa Control de la Enfermedad de Chagas, Ministerio de Salud y Medio Ambiente, Provincia de Santa Fe, Argentina; Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie, Lille, France; Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

Abstract. An IgM monoclonal antibody (MAb) against a carbohydrate epitope present in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote excretory-secretory antigens and expressed by different developmental stages of the parasite (epimastigote, trypomastigote and intracellular amastigote) was linked to a solid phase matrix and used as an antigen-capture antibody. Human serum complexes containing the epitope were then detected by using specific secondary antibodies against human immunoglobulin isotypes. Results of detection of IgM, IgG, and IgA serum complexes (SC) containing a *T. cruzi* polypeptide epitope showed that SC could be detected in 69% of the 13 Chagasic acute phase sera studied with IgG, in 84% with IgM, and in 75% with IgA. Only 16% (IgG-SC), 8% (IgM-SC), and 10% (IgA-SC) of chronic sera from 50 patients were positive. No patients with toxoplasmosis or rheumatoid factor were positive. Of the 11 leishmaniasis sera studied, four had IgG-SC, two had IgA-SC, and five had IgM-SC. Of the eight Yanomamo Indians infected by *Onchocerca volvulus*, three were found to have IgG-SC, two had IgM-SC, and two had IgA-SC. Thirteen sera from healthy individuals living in an endemic area were also studied. One subject had IgG IgM and IgA-SC. The results presented in this study show for the first time, the specific detection of IgM, IgG, and IgA immune complexes using a MAb against *T. cruzi*. The presence of the epitope in association with IgM antibodies in sera from patients with the acute phase of the disease suggests that this antigen(s) carrying the epitope that reacts with the MAb could be a marker(s) of active infection. In addition, the specificity of the serum complex capture assay allowed the detection of Chagas' disease in two different endemic areas (Argentina and Venezuela).

Chagas' disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, and is estimated to affect at least 24 million people in Central and South America.¹ In the initial acute phase of the disease, which is lethal in approximately 10% of the cases, the classic parasitologic diagnostic methods are limited by delays in getting results. Serodiagnostic tests based on the detection of antibodies revealed that a proportion of the acute phase sera were negative.^{2,3} Also, in large areas of Central and South America, cutaneous, mucocutaneous,^{4,5} or visceral leishmaniasis,⁶ as well as *Trypanosoma rangeli* infections^{7,8} are associated with *T. cruzi* infection.

Due to a variable degree of cross-reactivity among these parasites, the serologic diagnosis of *T. cruzi* infection inspires little confidence in areas where these parasites coexist. Nevertheless, a competitive antibody enzyme immunoassay,

using a *T. cruzi* species-specific monoclonal antibody (MAb) has recently been developed in our laboratory.⁹ However, this test is useful only in the case of chronic infections. Consequently, new emphasis has been placed on the detection of circulating free and/or complexed parasite antigens in the patient's blood and urine. Indeed, circulating antigens have been demonstrated in the sera from *T. cruzi*-infected laboratory animals and human patients.^{10,11} In contrast, the presence of circulating antigens in urine has been a subject of debate.^{12,13} Nevertheless, a more recent report showed the presence of circulating antigens in sera and urine of patients with acute and congenital Chagas' disease.³

It seems probable that the detection of parasite antigens circulating in the blood or excreted in the urine may determine the parasite etiology at the species level, and could indicate the presence

of active infection. The advent of hybridoma technology has added a new dimension to the development of a specific and sensitive immunoassay to detect circulating free and/or complexed antigens in parasitic diseases.¹⁴

In the present study, an MAb against trypomastigote excretory-secretory antigens was used as an antigen-capture antibody linked to a solid phase matrix. The attached complexes were then detected by using specific secondary antibodies against human immunoglobulin isotypes. The data obtained indicate that the presence of the epitope defined by the MAb VG3/G11 in serum complexes (SC) could differentiate the acute phase from the chronic phase of Chagas' disease, particularly if one considers the IgM-SC, a fact that is consistent with the hypothesis that the complexes are associated with an active infection.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and antigen preparations

The Y strain (a reticulotropic strain) of *T. cruzi* was used throughout the study. Trypomastigotes were maintained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts, as described previously.¹⁵ Blood trypomastigote forms were obtained from infected BALB/c mice.¹⁶ The extracellular amastigotes of *T. cruzi* were obtained following the method described previously.¹⁷ *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, *Leishmania braziliensis* promastigotes (logarithmic and stationary phase parasites), and *T. rangeli* epimastigotes were cultured in glucose-lactalbumin serum hemoglobin medium. *Leishmania* intracellular amastigotes were obtained by *in vitro* infection of human monocytes-derived macrophages, according to a previously described method.¹⁸ Preparations of trypomastigotes, epimastigotes, and amastigotes of Tulahuen, Miranda clone 78, MEN and EP strains were kindly provided by Drs. R. Piras (CMDLT, Caracas, Venezuela) and E. Segura (INDIECH, Buenos Aires, Argentina). Epimastigotes and tissue culture-derived trypomastigotes of the CL strain (myotropic strain) were also used in this study.

Preparations of trypomastigote excretory-secretory antigens (ESA) were obtained by incubating the parasites in serum-free tissue culture medium (RPMI 1640) for 24 hr at 37°C.¹⁹ The supernatant containing the antigens released by

the parasites was removed by centrifugation, dialyzed for 48 hr against distilled water, and lyophilized.

Hybridoma production

Mice of the BALB/c strain were injected intraperitoneally with 50 µg of ESA in saline solution emulsified with 0.1 ml of Freund's complete adjuvant. After two weeks, a booster injection of the same preparation was given. The antibody response of the animals was tested one month later. The same dose of antigen was injected intravenously three days before the hybridization experiment.

The fusion procedure was carried out as previously described.²⁰ Briefly, SP2/O myeloma cells and spleen cells were mixed in a 1:10 ratio. Hybrid cell populations were cloned twice by the limiting dilution method. Ascitic fluids were produced in BALB/c mice that had been pristane-primed one week prior to injection with 10⁷ hybrid cells. The class of MAb was determined by agarose double-diffusion of supernatants against rabbit antisera specific for mouse immunoglobulin subclasses (Cappel, Cochranville, PA).

Indirect fluorescent antibody test (IFA)

This was performed according to the procedure described previously.¹⁷

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

This assay was carried out in disposable, flexible, polyvinylchloride microtitration plates (Dynatech, Alexandria, VA). Optimal dilutions of all reagents were predetermined by block titrations. For the detection of MAb, plate wells were coated with soluble trypomastigote ESA at a concentration of 5 µg/ml and incubated overnight at 4°C. After being saturated with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 3 hr at room temperature, the wells were treated with 100 µl of supernatant or ascitic fluid diluted 1:100 in PBS, and incubated for 3 hr at 37°C. After the wells were washed three times with PBS plus 0.1% Tween 20 (PBS-Tween), 100 µl of alkaline phosphatase-labeled antibodies against mouse immunoglobulins (Miles Laboratories, Elkhart, IN) (1:1,000 dilution in PBS) was added to each well, and the samples were incubated at 37°C for 1 hr. After the wells were washed twice with

PBS-Tween and once with distilled water, 100 μ l (1 mg/ml) of enzyme substrate (4-nitrophenylphosphate in 0.5 M Na₂CO₃, 0.001 M MgCl₂ buffer, pH 10.4) was added, and the samples were incubated for 1 hr at 37°C. The enzyme reaction was stopped by the addition of 100 μ l of 2 N sodium hydroxide. The intensity of the color reaction was read at 405 nm using a Titertek Multiscan reader (Flow Laboratories, Baar, Switzerland).

Immunoblotting

This technique was performed following the procedure previously described.²¹ Briefly, trypanomastigotes (10^8) were washed in RPMI 1640, resuspended in 200 μ l of 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% NP-40, 100 U/ml of aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, and incubated overnight at 4°C. The insoluble material was removed by centrifugation at 7,000 \times g for 15 min at 4°C. The supernatant fraction was diluted with a concentrated sample buffer so that the final concentration of the buffer was 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% sucrose, and 0.1 M dithiotreitol. The samples were boiled in a water bath, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (the proteins were revealed by the silver staining method,²² when required), and transferred to nitrocellulose sheets. Strips were incubated with supernatants or ascitic fluids, and bound antibodies were revealed using biotinylated sheep antibodies to mouse immunoglobulins and a streptavidin-biotinylated peroxidase complex system (Amersham, Buckinghamshire, UK). Trypanomastigote excretory-secretory products were also treated as above.

In some experiments, the parasite antigens were first subjected to periodate treatment, according to the procedure previously described,²³ or extracted three times with an equal volume of petroleum ether,²⁴ and exhaustively dialyzed against distilled water at 4°C. They were then concentrated, lyophilized, resuspended in sample buffer, boiled, and treated as above.

Glycosidase treatment of *T. cruzi* NP-40 soluble antigens and ESA was accomplished by treating aliquots with *N*-glycanase (Genzyme, Boston, MA), which selectively removes *N*-linked oligosaccharides. Assay conditions were identical to those described by the manufacturer. Briefly, samples (20 μ g of protein in a volume of 10

μ l) were incubated in 0.2 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 1.25% NP-40, 10 mM 1, 10-phenanthroline hydrate, and 0.3 units of *N*-glycanase for 16 hr at 37°C. The reaction was stopped by the addition of SDS sample buffer, and the samples were boiled for 5 min, and analyzed by SDS-PAGE. The resulting gel was transferred to a nitrocellulose sheet. The reactivity of the MAb was performed as described above.

Immunoprecipitation

Trypanomastigotes were surface labeled with ¹²⁵I by the iodogen procedure.²⁵ Soluble, labeled surface antigens were extracted with NP-40 and immunoprecipitated with the supernatant or ascitic fluids, following the procedure previously described.¹⁵ In the case of VG3/G11 IgM MAb, a second antibody (sheep anti-mouse immunoglobulins; Nordic, Tilberg, The Netherlands) was used to immunoprecipitate the antigen-antibody complexes before incubation with protein A.

Competitive radioimmunoassay

This assay was carried out following the procedure previously described, with minor modifications.²⁴ Briefly, microtiter plates were coated with 10 μ g of ESA in PBS at room temperature for 2 hr. After the plates were washed and saturated with 1% BSA in PBS, the wells were treated with 0.1 μ g of ¹²⁵I-labeled VG3/G11 MAb (specific activity 10⁶ cpm/ μ g), and with different concentrations of 155D3 MAb or unlabeled VG3/G11 MAb for 2 hr, washed again with PBS, and counted in a gamma counter (Packard, Downers Grove, IL). The results were normalized to the counts bound in the absence of inhibitors.

Serum complex capture assay (SCCA)

Polypropylene beads (6.5-mm diameter; Seroa, Monaco) were incubated overnight at room temperature with gentle agitation in 0.015 M carbonate-0.035 M bicarbonate buffer (pH 9.6) containing 5 μ g/ml of VG3/G11 MAb isolated from ascitic fluid, following the procedure previously described.¹⁴ The beads were washed three times in PBS, incubated with gentle agitation in PBS containing 2% BSA for 2 hr at room temperature, and washed three times in PBS.

The SCCA was performed in disposable polystyrene tubes. Coated beads were incubated for

3 hr at 37°C in 300 μ l of human serum diluted 1:1, 500 in PBS. The tubes were washed three times with PBS-Tween. The beads were then transferred to other tubes and incubated with 0.3 ml of goat antibodies to either human IgG or IgM (Biosys, Campiegne, France) or to human IgA (α -chain; Cappel) that was labeled with alkaline phosphatase, and diluted 1:2,000 in PBS, for 1 hr at 37°C, then washed three times in PBS-Tween. The beads were transferred to another tube, and the amount of enzyme fixed to the beads was determined by adding 300 μ l (1 mg/ml) of substrate (4-nitrophenylphosphate in 0.5 M Na₂CO₃, 0.001 M MgCl₂ buffer, pH 10.4). After incubation at 37°C for 1 hr, the reaction was stopped by the addition of 50 μ l of 2 N NaOH. Yellow color development was measured with a spectrophotometer at 405 nm.

In some experiments, attempts were made to adapt the SCCA to 96-well plates (Dynatech). The assay was accomplished by treating the wells (instead of beads) and sera as described above, except that the final reaction volume was 200 μ l.

Study population

Serum samples were obtained from 13 patients (age range three months to 17 years) with acute *T. cruzi* infections. The patients presented with clinical signs of the disease, principally unilateral chagoma of the eye and general edema.²⁶ We attempted to confirm the clinical diagnosis through parasitemia detection, using direct microscopic examination of fresh blood samples. When this was negative, concentration for hemoflagellates was performed prior to microscopy.²⁷ Serum samples were also obtained from 50 patients (20–47 years old) with chronic *T. cruzi* infections, and the presence of the disease was demonstrated in all 50 by using immunologic tests such as immunofluorescence, hemagglutination, and ELISA. Control sera were obtained from 13 healthy individuals (1–66 years old) who were inhabitants of rural areas of Santa Fe and Santiago del Estero.

To study specificity, sera were obtained from a group of 27 patients with other parasitic infections: 11 patients who were clinically and serologically confirmed as being infected with *Leishmania* parasites (five with *L. braziliensis*; age range 1–10 years and six with *L. braziliensis guyanensis*; age range 1–7 years), eight European patients infected with *Toxoplas-*

ma gondii and having high levels of IgM antibodies against *T. gondii*, and eight Yanomamo Indians (age range 1–70 years) living in the Amazonian forest of Venezuela, and known to be infected by *O. volvulus*.¹⁴ Eight serum samples from European patients with rheumatoid factor were also used in this study.

RESULTS

*Screening of MAb against *T. cruzi* excretory-secretory antigens (anti-ESA MAb)*

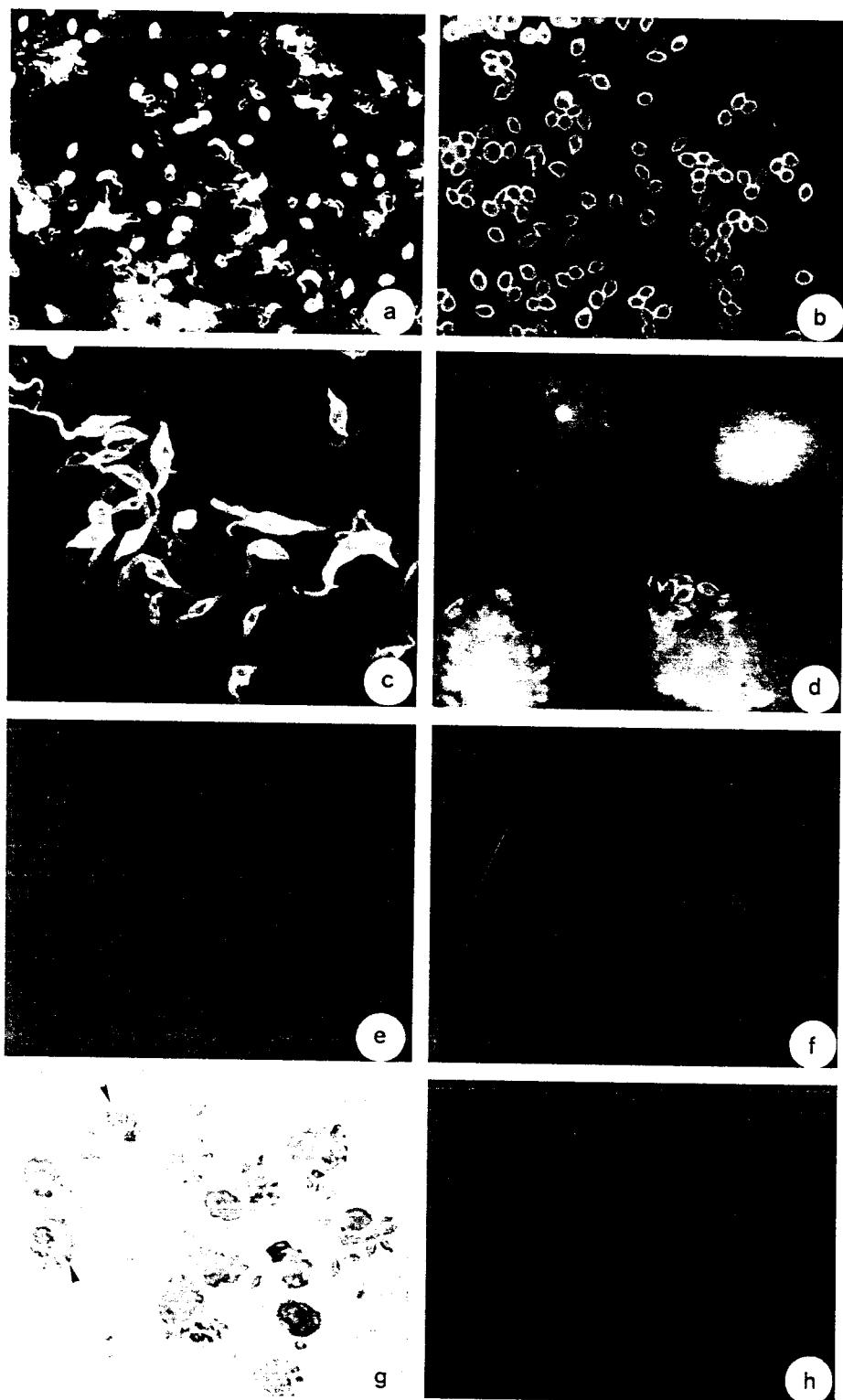
From the various experiments carried out, eight MAb with *T. cruzi* ESA activity were obtained. These gave positive results in either IFA or the ELISA, or both. Only one MAb, VG3/G11, recognized the parasite ESA in the immunoblotting technique. The gel double-diffusion test against antisera to the mouse immunoglobulin classes revealed that this mAb was of the IgM class.

Antigen characterization

In the IFA, the MAb VG3/G11 gave a punctate labeling on the cell surface of both tissue culture-derived (Figure 1a) and blood trypomastigote forms (unpublished data). Amastigote forms were derived from trypomastigotes incubated in a culture medium for several hours after being released from infected fibroblasts, and were also stained (Figure 1b). Positive reactions were also observed on epimastigote and intracellular amastigote forms (Figures 1c and d).

The epitope reacting with VG3/G11 MAb appeared to be highly conserved. Indeed, positive immunofluorescence reactions were seen against *T. cruzi* strains from different endemic areas: EP, MEN, Tulahuen, and Miranda clone 78. In addition, the positive reactions observed against epimastigotes, trypomastigotes, and amastigotes of the CL strain clearly indicate that the reactivity of MAb VG3/G11 did not relate to tissue tropism (unpublished data).

We further explored the presence of the epitope reacting with VG3/G11 MAb in *L. brasiliensis* developmental stages by IFA. The MAb did not react against promastigotes from the active dividing phase (logarithmic, Figure 1e) or the non-dividing phase (stationary, Figure 1f), nor did it react against the intracellular amastigotes (Figure 1g). Moreover, no positive reaction



was seen against *T. rangeli* epimastigotes (unpublished data).

The identification of the antigen reacting with VG3/G11 MAb was made using immunoblotting and immunoprecipitation techniques. We also studied the nature of the epitope by either chemical cleavage of carbohydrate moieties of *T. cruzi* antigens by oxidation with sodium periodate or treatment with *N*-glycanase. Petroleum ether was also used in order to extract the lipid fraction.

Soluble NP-40 antigens from trypomastigotes labeled with ^{125}I were incubated with ascitic fluids containing either VG3/G11 MAb or irrelevant MAb (anti-*O. volvulus*) of the same isotype. As a positive control, we used a previously described MAb (155D3) of the IgG1 class, which reacted against an 85 kD surface epitope.¹⁷ Immune complexes were isolated on protein A-Sepharose, then dissociated and analyzed by SDS-PAGE. In the case of IgM MAb, immune complexes were precipitated with a second antibody against mouse immunoglobulins before the isolation with protein A-Sepharose (Figure 2).

The use of VG3/G11 MAb allowed the characterization of a major radioactive band with an apparent molecular weight of approximately 85 kD in the total extract (Figure 2, lanes A and B). Other minor bands were also visualized. By comparison, MAb 155D3 weakly recognized an 85 kD surface antigen (Figure 2, lane D). A control test using irrelevant MAb (Figure 2, lane C) gave a negative result, demonstrating the specificity of VG3/G11 MAb to *T. cruzi* antigens.

Complementary investigations were done in order to examine the possible identity of the epitopes reacting with VG3/G11 and 155D3 MAb. As shown in Figure 3, 155D3 MAb was inhibitory only at high concentrations. The relatively poor inhibition shown by MAb 155D3 suggests that the two MAb are directed against different epitopes. Another possible explanation is that the 155D3 MAb may have a lower affinity for the reactive epitope. We cannot rule out, however, that the two MAb could recognize different epitopes on the same antigen. Indeed, the posi-

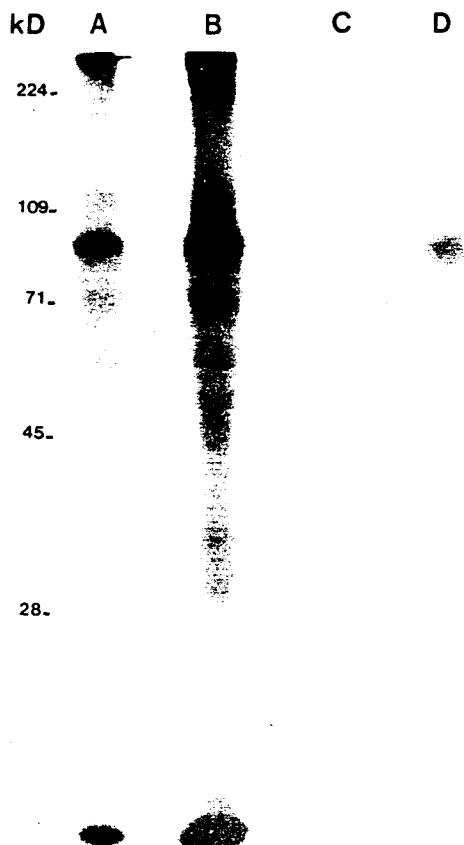


FIGURE 2. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from ^{125}I -labeled tryomastigote surface antigens, using MAb VG3/G11. Lane A, clone culture supernatant; lane B, VG3/G11 ascite; lane C, anti-*Onchocerca volvulus*; lane D, MAb 155D3. Apparent molecular masses were estimated with reference to standard marker proteins, and are given in kD.

tions of migration of the immunoreactive components revealed by the two MAb (Figures 2A and D) are extremely similar. Further investigations are necessary to resolve this question.

We further explored the presence of the parasite polypeptide epitope reacting with the MAb VG3/G11 in *T. cruzi* total soluble extract and ESA by immunoblotting. Figure 4 shows the profiles of NP-40 soluble extract of tryomastigotes

FIGURE 1. Immunofluorescence staining of *Trypanosoma cruzi* developmental stages with VG3/G11 MAb. a, mixed preparation of tissue culture derived trypomastigotes and extracellular amastigotes. b, extracellular amastigotes. c, epimastigotes. d, intracellular amastigotes. Negative reactions were seen against e, *Leishmania braziliensis* promastigotes (log-phase parasites), f, stationary-phase parasites, and g, intracellular amastigotes. h, intracellular amastigotes (arrowheads), as seen by light microscopy.

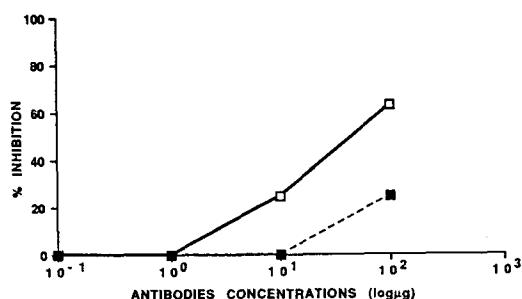


FIGURE 3. Inhibition of ^{125}I -labeled VG3/G11 MAb binding to excretory-secretory antigens. ■ = 155D3 MAb; □ = unlabeled VG3/G11 MAb. The binding assay was performed as described in the Materials and Methods. The results were normalized to the counts bound in the absence of inhibitors. Each point represents the average of three determinations.

(lane 2), and different ESA preparations (lanes 3–6). Silver staining revealed a large number of polypeptides in the NP-40 soluble antigens. In contrast, analysis of ESA preparations showed much simpler patterns with a limited number of components. A major band, with an apparent molecular weight of 80–96 kD, was identified in a reproducible manner. As shown in Figure 5A, VG3/G11 ascitic fluid revealed several bands carrying the epitope in the total extract (230, 82–86, 65, 60, and 54 kD). Some of these bands were only marginally visible. In contrast, the use of ESA enabled us to localize the epitope mainly on an 82–86 kD polypeptide(s) (Figure 5C). Indeed, a weak reactivity of the MAb was observed on other components.

The nature of the epitope that reacts with VG3/G11 MAb was also examined. Results presented in Figure 5B show that pretreatment of trypomastigote NP-40 soluble antigens with periodate before immunoblotting inhibited further binding to the MAb. Moreover, petroleum ether extraction of *T. cruzi*-soluble antigens did not affect the binding of VG3/G11 MAb to the 82–86 kD polypeptide(s) (Figure 5D).

These results also suggest a possible glycoconjugate nature of the epitope reacting with VG3/G11 MAb. In order to determine the nature of the reacting epitope, we treated the parasite total antigens and ESA with *N*-glycanase. As shown in Figure 6, the reactivity of VG3/G11 MAb was abolished after *N*-glycanase treatment, therefore confirming the carbohydrate nature of the epitope reacting with the MAb.

kD 1 2 3 4 5 6

224 .
109 .
71 .
45 .

FIGURE 4. Silver-stained SDS-polyacrylamide gel containing trypomastigote NP-40-soluble antigens (lane 2), and different preparations of parasite excretory-secretory antigens (lanes 3–6). The arrowhead indicates the 80–96 kD antigen complex. Lane 1 contains standard protein markers.

Detection of the parasite antigenic epitope in complexes present in serum samples

The presence of IgM, IgG, and IgA serum complexes containing the epitope reacting with VG3/G11 MAb was investigated in serum samples by using an SCCA. The test utilizes the binding ability of specific MAb to ESA to detect antigenic moieties in complexes. This MAb was linked to a solid phase matrix in the SCCA, and bound serum complexes were revealed by using specific antibodies to human immunoglobulin isotypes. Results of the detection of IgM, IgG, and IgA serum complexes containing the carbohydrate epitope are shown in Figures 7, 8, and 9. Considering the upper limit of normal values as two standard deviations above the mean optical density of the endemic control group, SC containing specific IgG, IgM, and IgA antibodies could be detected in 9 (69%), 11 (84%), and 10 (76%), respectively, of the 13 chagasic acute phase sera studied. Only 16% (IgG-SC), 8% (IgM-SC), and 10% (IgA-SC) of the chronic sera tested positive. None of patients with toxoplasmosis or rheumatoid factor tested positive. Of the 11 leishmaniasis sera studied, four had IgG-SC, five had IgM-SC, and two had IgA-SC. When the sera of Yanomamo Indians were tested, three had IgG-SC, two had IgM-SC, and two had IgA-SC. Thirteen sera from healthy individuals living in en-

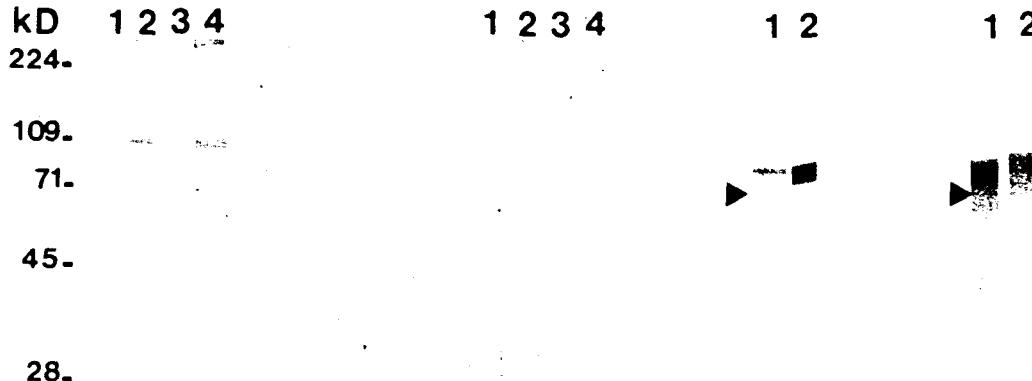


FIGURE 5. Reactivity of MAb with *Trypanosoma cruzi* antigens, revealed by SDS-PAGE and immunoblotting. A, tryptomastigote NP-40 soluble antigens revealed by myeloma cell (SP2O) culture supernatant (lane 1), VG3/G11 clone culture supernatant (lane 2), control ascitic fluid anti-*Onchocerca volvulus* (lane 3), and VG3/G11 ascitic fluid (lane 4). B, tryptomastigite NP-40-soluble antigens treated with periodate, as described in the Materials and Methods, and revealed by the same antibodies as in A. C, trypomastigote excretory-secretory antigens revealed by VG3/G11 clone culture supernatant (lane 1) or VG3/G11 ascitic fluid (lane 2). D, reactivity of VG3/G11 MAb ascitic fluid with trypomastigote NP-40-soluble antigens before (lane 1) and after (lane 2) petroleum ether extraction. Arrowheads indicate the 82-86 kD antigen.

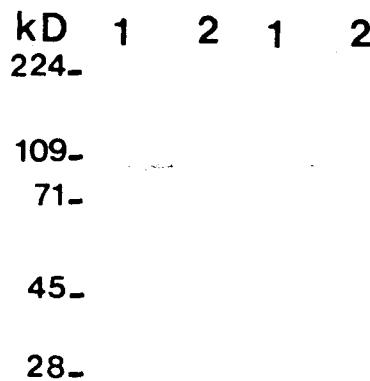


FIGURE 6. Effect of *N*-glycanase on the reactivity of VG3/G11 MAb against *Trypanosoma cruzi* antigens. A, NP-40-soluble antigens and B, excretory-secretory antigens were revealed by VG3/G11 MAb before (lane 1) and after (lane 2) treatment with *N*-glycanase.

DISCUSSION

An important focus of *T. cruzi* serology has been on the detection of antibodies. The nature and source of antigens used can contribute sig-

demic areas were also studied. One subject had both IgM-SC and IgA-SC.

Sera from five acute phase patients were tested two months after chemotherapy by SCCA. The levels of SC containing the epitope reacting with VG3/G11 MAb were substantially greater than those observed before treatment (mean absorbance values for IgG-SC, IgM-SC, and IgA-SC, respectively, before treatment: 0.92 ± 0.41 , 0.84 ± 0.32 , and 0.75 ± 0.35 ; after treatment: 1.91 ± 0.64 , 1.53 ± 0.45 , and 1.34 ± 0.52).

Using microtiter wells and considering the upper limit of normal as two standard deviation above the mean optical density of the endemic control group, IgM-SC containing the VG3/G11 epitope could be detected in 12 of 13 acute phase sera previously found to be positive using MAb-coated beads (unpublished data). This suggests that the SCCA could be efficiently applied using microtiter wells.

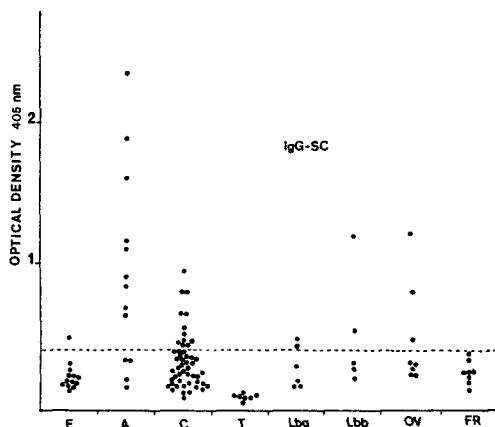


FIGURE 7. Detection of *Trypanosoma cruzi*-specific IgG serum complexes by the serum complex capture assay. Values are the optical density \pm standard deviation. E = endemic controls (0.23 ± 0.09); A = acute phase Chagasic human sera (0.94 ± 0.65); C = chronic phase Chagasic human sera (0.34 ± 0.19); T = serum from European patients infected with *Toxoplasma gondii* (acute phase) (0.08 ± 0.01); Lbg = sera from patients infected with *Leishmania braziliensis guyanensis* (0.30 ± 0.13); Lbb = sera from patients infected with *L. braziliensis braziliensis* (0.52 ± 0.41); OV = sera from Yanomamo Indians infected with *Onchocerca volvulus* (0.50 ± 0.33); FR = sera from patients with rheumatoid factor (0.26 ± 0.08).

nificantly to the sensitivity and specificity of immunodiagnostic procedures. Indeed, the use of a monoclonal antibody specific for a *T. cruzi* antigen²⁸ has enabled the development of a competitive antibody enzyme immunoassay for a specific diagnosis of Chagas' disease.⁹ While this test is able to differentiate Chagas' disease from other cross-reacting parasitic infections, it did not, however, reach a maximum level for the detection of acute *T. cruzi* infections. More recently, antigens that are shed from the parasite seem to be useful for performing a serologic test for the detection of antibodies against *T. cruzi*.^{29, 30} Using an antigen shed by the parasite, approximately 92% of acute phase sera were found positive.²⁹ The development of such a reagent in sufficient quantities to be used in large-scale application will depend on the identification of an efficient expression vector, and in developing the best construct to be inserted in the vector.

An alternative approach for the detection of Chagas' disease by serologic analysis would be the detection of circulating free and/or complexed antigens and the corresponding immu-

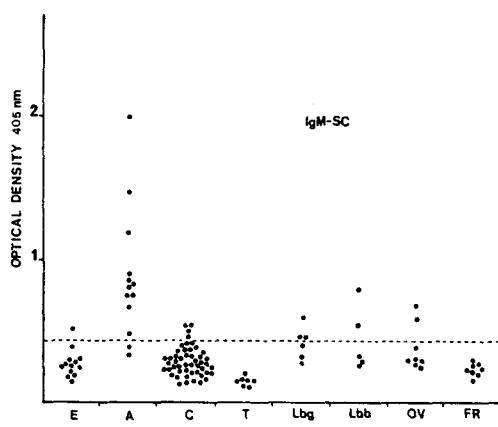


FIGURE 8. Detection of *Trypanosoma cruzi*-specific IgM serum complexes by the serum complex capture assay. For a definition of the values and abbreviations, see Figure 7. E (0.28 ± 0.08), A (0.88 ± 0.44), C (0.29 ± 0.10), T (0.16 ± 0.02), Lbg (0.42 ± 0.10), Lbb (0.45 ± 0.20), OV (0.39 ± 0.15), FR (0.25 ± 0.04).

noglobulin isotypes. In the case of chagasic infection, the presence of circulating antigens (CAg) and immune complexes has been demonstrated in the sera of experimental animals and human

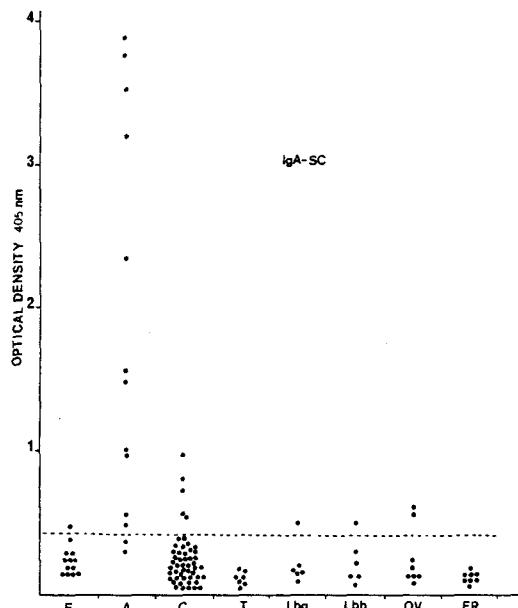


FIGURE 9. Detection of *Trypanosoma cruzi*-specific IgA serum complexes by the serum complex capture assay. For a definition of the values and abbreviations, see Figure 7. E (0.21 ± 0.11), A (1.87 ± 1.27), C (0.27 ± 0.18), T (0.23 ± 0.10), Lbg (0.22 ± 0.12), Lbb (0.27 ± 0.17), OV (0.25 ± 0.15), FR (0.18 ± 0.09).

patients.^{10, 11, 31} Moreover, CAg were also found in the urine of patients with acute and congenital Chagas' disease.³ However, little has been reported concerning the nature of the parasite antigens circulating in the blood.³ In most reports, the detection of CAg is based on the use of polyclonal antisera against *T. cruzi* antigens. It seems probable that hybridoma-derived antibody of defined specificity be a powerful tool for serologic detection of CAg. Virtually unlimited quantities of homogenous, highly specific antibodies can be produced, even if the immunizing antigen is not pure.

Furthermore, an MAb defining an epitope carried by *T. cruzi* trypomastigote-released products was produced by fusion of mouse myeloma cells SP20 with splenic lymphocytes obtained from BALB/c mice immunized with *T. cruzi* excretory-secretory antigens. The MAb studied here recognizes a determinant present in the antigen combined with the host IgM, IgG, and IgA antibodies and circulating in the blood of patients infected with *T. cruzi*. The results obtained in this study using IFA, immunoprecipitation, and immunoblotting techniques showed that the VG3/G11 epitope is present on the surface of blood and culture-derived trypomastigotes and also in the excretory-secretory antigens. Moreover, it is noteworthy that the VG3/G11 epitope appeared to be highly conserved. Indeed, VG3/G11 MAb reacted with all strains of *T. cruzi* tested.

The epitope seems to be carried by several parasite proteins. However, major 82–86 kD polypeptide(s) present in the excretory-secretory antigens were revealed by the MAb. When mouse MAb of the IgM class without *T. cruzi* specificity was used in IFA, immunoprecipitation, or immunoblotting, no positive reaction was observed against *T. cruzi* antigens. The results obtained also indicated that VG3/G11 MAb did not recognize any protein in normal human serum used as controls. Furthermore, if the protein recognized was of human origin, it would be detected more often in serum from patients with other parasitic infections.

Using the SCCA, the VG3/G11 epitope could be detected in IgM complexes in 84% of sera from patients with the acute phase of Chagas' disease. In addition, the SCCA allowed us to identify specific IgA immune complexes in a high percentage of the acute phase sera studied. These results are in agreement with the observations

reported by other investigators.^{3, 32} It is interesting to note that the two patients who tested negative for IgM-SC and IgA-SC had no detectable parasites circulating in their blood.

The reason for parasite antigens carrying the epitope in IgM complexes in 8% of chronic phase sera awaits further consideration. It might be that these individuals had a contact with the vector resulting in new infections, or that they correspond to late acute phase infections. Another possibility is that in some chronic infections, the complex may never have been cleared from the acute phase, or that sequestered organisms continue to synthesize and secrete antigen. In either case, one has to reexamine in the field those patients having the VG3/G11 epitope circulating in the serum IgM complexes.

The degree of specificity achieved by the VG3/G11 MAb is satisfactory. Indeed, the VG3/G11 epitope was not found in sera from patients with acute toxoplasmosis or rheumatoid factor. The MAb did not react against *Leishmania* antigens. We have shown that VG3/G11 MAb did not bind to promastigotes (logarithmic and stationary phase parasites) and to intracellular amastigotes. The fact that a proportion of sera from endemic areas with possible mixed infections tested positive suggests that the SCCA detected the VG3/G11 epitope in those sera with evidence of associated Chagas' disease.

The production and use of hybridoma directed against immunodominant antigens specific for a parasite may be useful in the development of new immunodiagnostic tests.³³ Enzyme assays using MAb have been used to detect CAg in sera from *O. volvulus*-infected persons.¹⁴ A simplified sandwich ELISA has been developed to detect α -fetoprotein (AFP).³⁴ In this case, two MAb that reacted against different epitopes on AFP were used. One MAb was immobilized on a solid phase matrix and the other labeled with an enzyme, making it possible to complete the two antigen-antibody reactions. Our SCCA differs from the above procedure in that the MAb linked to the solid phase matrix detects antigenic moieties in protein complexes. This could be due to the fact that the same epitope is repeated several times on the same molecule or is present on different parasite proteins. This hypothesis is in agreement with the results obtained using the immunoblotting technique and the trypomastigotes total extract. An alternative possibility could be that the molecule(s) carrying the VG3/G11 ep-

itope form dimers and eventually multimers. Further studies are needed to examine these possibilities.

Circulating immune complexes are present in many diseases, but in most instances, the antigenic constituents of the complex remain unidentified. The antigen could have a direct significance as an etiologic agent, or could appear as an immediate outcome of the underlying disease. In both instances, identification of the antigen could have both diagnostic and therapeutic significance. The increased level of immune complex containing the VG3/G11 epitope after chemotherapy suggests that the SCCA may provide a means for chemotherapeutic followup by detecting specific SC in the absence of parasites in the blood.

The results presented in this study demonstrate for the first time the specific detection of IgM and IgG immune complexes using a MAb against *T. cruzi* excretory-secretory antigens. More interestingly, the identification of IgM immune complexes carrying the epitope defined by the MAb seems to be related to active infection, and thus, could be particularly useful in the diagnosis of acute cases, where conflicting serologic results are frequently encountered. Studies for the detection of this new infection marker will be conducted in field conditions in order to assess its validity in large scale applications.

Acknowledgments: The authors thank M. F. Massard and C. Colson for secretarial assistance, and C. Drolez for collaborative efforts.

Financial support: These investigations received financial support from INSERM U167-CNRS 624, the INSERM North-South Network (Convention no. 489 NSS), the European Economic Community (EEC contract no. TS2 0218-F), the French Ministry of Foreign Affairs, and the CONICET (Argentina).

Authors' addresses: M. Ali Ouaissi, A. Taibi, M. Loyens, J. Cornette, B. Marty, and A. Capron, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019, Lille, France. U. Martin, C. Maidana, C. Candioti, and A. Martelleur, Camiech Programa Control de la Enfermedad de Chagas', Ministerio de Salud y Medio Ambiente, Provincia de Santa Fe, Argentina. D. Afchain, Laboratoire de Parasitologie, Faculte de Pharmacie, Lille, France. P. Velge, Laboratoire de Pathologie Infectieuse et Immunologie, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherche de Nouzilly, France.

Reprint requests: Dr. M. Ali Ouaissi, INSERM 167-

CNRS 624, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur Calmette, 59019, Lille, France.

REFERENCES

1. World Health Organization Report, 1982. *Newsletter* 18: 7.
2. Martin UO, Maidana CG, Fernandez H, Martelleur A, Subias E, 1986. Anticuerpos específicos anti-Trypanosoma cruzi en niños con enfermedad de Chagas' aguda. *Medicina (B Aires)* 46: 167-169.
3. Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein A, 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 25: 133-137.
4. Walton BC, Chinel LV, Equia OE, 1973. Onset of espundia after many years of occult infection with Leishmania braziliensis. *Am J Trop Med Hyg* 22: 696-698.
5. Desjeux P, Quilici M, Lapierre J, 1974. A propos de 113 cas de leishmaniose cutanée et cutaneo-muqueuse observées en Bolivie: étude séro-immunologique de 71 cas. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 67: 387-395.
6. Desjeux P, Aranda E, Aliaga O, Mollinedo S, 1983. Human visceral leishmaniasis in Bolivia: first proven case from "Los Jungas." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 851-852.
7. Sousa OE, Johnson CM, 1971. Frequency and distribution of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli in the republic of Panama. *Am J Trop Med Hyg* 20: 405-410.
8. Anthony RL, Johnson CM, Sousa, OE, 1979. Use of micro-ELISA for quantitating antibody to Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli. *Am J Trop Med Hyg* 28: 969-973.
9. Lemesre JL, Afchain D, Orozco O, Loyens M, Breniere FS, Desjeux P, Carlier Y, Martin U, Nogueira-Queiroz JA, Le Ray D, Capron A, 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a Trypanosoma cruzi specific monoclonal antibody. *Am J Trop Med Hyg* 35: 86-93.
10. De Siqueira AF, Ferrioli Filho F, Domingues Ribeiro R, 1979. Aspectos imunitários iniciais observados em ratos infectados por Trypanosoma cruzi. II. A circulação de抗原s solubles e as modificações do complemento sérico dos animais em dias sucessivos da infecção. *Rev Bras Pesqui Med Biol* 12 (suppl 1): 75-79.
11. Marcipar A, Barnes S, Lentwojt E, Brown G, 1982. Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of Trypanosoma cruzi. *Appl Biochem Biotechnol* 7: 459-462.
12. Bongertz V, Huneger K, Galvao-Castro B, 1981. Trypanosoma cruzi: circulating antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76 (suppl 1): 71-82.
13. Corral R, Freilij H, Montemayo A, Grindstein S, 1984. Trypanosoma cruzi antigens in urine from patients with Chagas' disease. *Int Res Commun Syst Med Sci Libr Compend* 12: 1034-1035.

14. Des Moutis I, Ouaissi A, Grzych JM, Yarzabal L, Haque A, Capron A, 1983. Onchocerca volvulus: detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am J Trop Med Hyg* 32: 533-542.
15. Ouaissi MA, Cornette J, Capron A, 1986. Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol Biochem Parasitol* 19: 201-211.
16. Ouaissi MA, Cornette J, Afchain D, Capron A, Gras-Masse H, Tartar A, 1986. Trypanosoma cruzi infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science* 234: 603-607.
17. Ouaissi MA, Dubremetz JF, Kusniez JP, Cornette J, Loyens M, Taibi A, Marty B, Velge P, Rizvi F, Capron A, 1990. Trypanosoma cruzi: differential expression and distribution of an 85 kDa polypeptide epitope by in vitro developmental stages. *Exp Parasitol* 71: 207-217.
18. Rizvi FS, Afchain D, Sherlock I, Sadigursky M, Capron A, Santoro F, 1985. Infectivity of Leishmania promastigotes is associated with surface antigenic expression. *Immunol Lett* 11: 317-323.
19. Ouaissi MA, Taibi A, Cornette J, Velge P, Marty B, Loyens M, Esteva M, Rizvi FS, Capron A, 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of Trypanosoma cruzi trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* 100: 115-124.
20. Velge P, Ouaissi MA, Cornette J, Afchain D, Capron A, 1988. Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigote collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology* 97: 1-14.
21. Ouaissi MA, Dutoit E, Vernes A, Guerret-Stocker S, Capron A, 1985. In vitro inhibition of Plasmodium falciparum merozoite invasion by human plasma fibronectin. *Parasitology* 90: 227-236.
22. Morrissey JH, 1981. Silver stain for protein in polyacrylamide gels: modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307-310.
23. Ouaissi A, Cornette J, Velge P, Capron A, 1988. Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotype antibodies in human and experimental Chagas' disease: pathological implications. *Eur J Immunol* 18: 1889-1894.
24. Martin UO, Afchain D, Loyens M, Maidana C, Capron A, 1989. Trypanosoma cruzi: circulating polysaccharide factors excreted in vitro and in vivo. *Medicina (B Aires)* 49: 33-36.
25. Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkorn EF, 1983. Purification of major membrane protein of Toxoplasma gondii by immunoabsorption with monoclonal antibody. *J Immunol* 130: 2407-2412.
26. Romana C, 1935. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de la forma aguda de la enfermedad de Chagas', la conjuntivitis esquizotripanoíde unilateral. *Mis Est Pat Reg Arg* 22: 16-19.
27. Strout RG, 1962. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 48: 100-103.
28. Orozco O, Afchain D, Dissous C, Rodriguez C, Ovalque G, Lemesre JL, Loyens M, Capron A, 1984. Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for Trypanosoma cruzi. *Am J Trop Med Hyg* 33: 560-568.
29. Affranchino JL, Ibanez CF, Luquetto AO, Rassi A, Reyes MB, Macina RA, Aslund L, Pettersson U, Frach ACC, 1989. Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 34: 221-228.
30. Andrews NW, Einstein M, Nussenzweig N, 1989. Presence of antibodies to the major surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi amastigotes in sera from chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 40: 46-49.
31. Araujo FG, Chiari E, Dias JCP, 1981. Demonstration of Trypanosoma cruzi antigen in serum from patients with Chagas' disease. *Lancet* i: 246-249.
32. Kahn T, Corral R, Freilij H, Grinstein S, 1983. Detection of circulating immune complexes, antigens and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in human Trypanosoma cruzi infection. *Int Res Commun Syst Med Sci Libr Compend* 11: 670-671.
33. Mitchell GF, 1981. Hybridoma antibodies in immunodiagnosis of parasitic infection. *Immunol Today* 2: 140-142.
34. Uotila M, Ruoslahti E, Engvall E, 1981. Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *J Immunol Methods* 42: 11-15.

ARTICLE 3

***Trypanosoma cruzi : immunité induite chez la souris et le rat
par les antigènes excrétés-sécrétés et identification
d'une séquence peptidique ayant une activité protectrice***

Le but de ce travail était d'évaluer le pouvoir protecteur des ESA, d'identifier des composants ou des déterminants potentiellement vaccinants et d'analyser la réponse humorale induite par immunisation à la fois chez la souris BALB/c et le rat Fisher.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences d'immunisation de souris et de rats avec les ESA en association avec BpAl comme adjuvant. Tous les animaux ont ensuite reçu une infection avec des trypomastigotes sanguicoles. Deux paramètres ont été suivis : la parasitémie et la mortalité.

Ainsi dans le cas de la souris, une réduction très sensible a été observée au niveau de la charge parasitaire et de la mortalité en phase aiguë , avec un taux de protection de plus de 60%. De la même manière, les expériences réalisées chez le rat montrent que tous les animaux immunisés avec les ESA-BpAl survivent après infection.

Il faut souligner par ailleurs que tous les animaux protégés ont été conservés plus de 150 jours après infection avant d'être sacrifiés.

L'étude de la réponse anticorps a été réalisée d'abord par la technique d'immunoempreinte ou d'immunoprecipitation des antigènes totaux de *T. cruzi*, marqués à la méthionine ^{35}S . Elle montre une réactivité des anticorps vis-à-vis de deux composants parasitaires de 85 et 24 kDa aussi bien dans le cas de la souris que du rat. L'analyse du profil isotypique révèle chez la souris la présence d'anticorps de classe IgG1, IgG2a et IgG2b, alors que chez le rat, nous assistons à la production d'anticorps de classe IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG2c. Une faible réponse IgE a également été mise en évidence chez les rats immunisés avec les ESA et infectés.

L'étude du pouvoir lytique des anticorps *in vitro* en présence du complément a été réalisée vis-à-vis des formes trypomastigotes. Elle montre que effectivement, aussi bien dans le cas de la souris que du rat, les sérums d'immunisation présentent une activité lytique vis-à-vis des formes infectantes qui est de 70,9% et 32,83% respectivement.

Devant les résultats de protection très encourageants obtenus avec les antigènes natifs, il nous a paru essentiel d'envisager le clonage par biologie moléculaire de ces composants. Ainsi à l'aide des sérums de rats anti-ESA, le criblage de la banque d'expression cDNA du stade trypomastigote, nous a permis d'identifier trente clones positifs à partir de 9×10^4 recombinants testés. Après

analyse des inserts, cinq clones ont été sélectionnés pour le séquençage. Ils présentent tous la même séquence, par conséquent nous avons choisi l'insert le plus long et l'avons séquencé entièrement. Les cDNA de ces clones codent pour une protéine parasitaire de 24 kDa qui a déjà été décrite pour sa capacité à fixer le calcium.

La protéine recombinante est reconnue par des pools de sérums d'infection de souris ou de patients chagasiques, ce qui rend compte de l'immunogénicité de la molécule native correspondante au cours de l'infection chagrasique. Dans le but de tester le pouvoir protecteur de la protéine de fusion, celle-ci a été purifiée à l'aide un anticorps monoclinal (Tcr7) par colonne d'affinité. Malheureusement, la quantité de protéines obtenue n'était pas assez suffisante pour pouvoir conduire des expériences de protection. Néanmoins, un sérum anti-protéine recombinante a été produit, et nous a permis d'étudier la localisation de la molécule suivant les différents stades de développement du parasite.

En revanche, nous avons adopté une stratégie peptidique qui consistait à choisir des séquences peptidiques suivant des critères de sélection d'épitopes capables d'induire une réponse lymphocytaire B ou T. Ainsi, dans le laboratoire du Professeur A. Tartar, H. Gras-Masse et M. Bossus ont synthétisé deux peptides synthétiques dérivant de la séquence de la p24 :

- le peptide 20-40 qui représenterait un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal Tcr7.
- le peptide 109-124 qui serait inducteur d'une réponse lymphocytaire T.

Les expériences de protection réalisées chez la souris avec ces deux peptides, montrent clairement que par rapport aux groupes de souris témoins,

seul le peptide 109-124 est capable d'induire une protection significative de la mortalité en phase aiguë.

En conclusion, ce travail montre à travers les expériences réalisées à la fois chez la souris BALB/c et le rat Fischer, que certains composants parasitaires sécrétés peuvent induire un degré de protection significatif contre une infection léthale. Le peptide 109-124 dérivé de la séquence de la p24 est capable par immunisation chez la souris d'induire un niveau de protection très satisfaisant. Ce peptide représenterait probablement un épitope T et induirait donc une réponse lymphocytaire T. Dans des études ultérieures, il importe d'étudier plus en détail cette réponse immune, de caractériser le type de population cellulaire mise en jeu, et d'analyser l'immunogénicité de ce peptide au cours de l'infection chagasique.

FULL TITLE

Trypanosoma cruzi : immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of peptide sequence with protective activity

AUTHORS

Ali Taibi*, Béatrice Plumas-Marty*, Heleosina Pessoa§, Ralf Schöneck*, Marc Loyens*, Romano Piras\$, Tania Aguirre\$, Hélène Gras-Masse°, Marc Bossus°, André Tartar°, André Capron*, and Ali Ouaissi*.

* Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité INSERM 167- CNRS 624

Institut Pasteur, 59019, LILLE cédex (FRANCE).

° Laboratoire de Chimie de Biomolécules

CNRS- URA 1309

Institut Pasteur, 59019, LILLE cédex (FRANCE).

§ Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia

Rio de Janeiro

\$ Unidad de Investigaciones Centro Medico Docente

la Trinidad, Caracas, Venezuela.

RUNNING TITLE

T. cruzi excretory-secretory antigens induced immune protection.

FOOTNOTES

1 This work was supported by INSERM 167, CNRS 624 and received financial assistance from the European Economic Community (EEC contract no. TS2 0218-F).

2 Address correspondance to : Ali Taibi, centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 Rue du Professeur A. Calmette, 59019, Lille cédex (France).

3 Abbreviations : ADCC, Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity; BpAl, *Bordetella pertussis* and Alum; ESA, Excretory-Secretory Antigens; IPTG, Isopropylthiogalactoside.

ABSTRACT

In the present study, we investigate the immunoprotective properties of trypomastigote ESA in experimental models. In the case of BALB/c mice, the immunization with ESA resulted in the reduction of parasitemia during acute infection, and a significant level of protection in terms of mortality with more than 60% survival. The same experiments performed in Fischer rats showed a high degree of protection against acute lethal infection with 100% survival. Mouse and rat immune sera presented trypanolytic activity against *Trypanosoma cruzi* infective forms, and recognized two major parasite components of 85 and 24 kDa. The analysis of specific isotype profiles showed a predominance of IgG1, IgG2a and IgG2b antibody responses. Rat antisera to ESA were then used to screen a trypomastigote cDNA library. Several clones were identified, all of which encoded for the 24 kDa protein. Using a monoclonal antibody (Tcr7) produced against the native protein, the 31 kDa recombinant fusion protein was purified by affinity chromatography. The antisera to the recombinant protein used in IFA and immunoelectron microscopy showed that the localization of the 24 kDa protein differs among *T. cruzi* developmental stages. Protection experiments were performed in BALB/c mice using two synthetic peptides (20-40 and 109-124) derived from the primary sequence of the 24 kDa polypeptide. The results obtained clearly indicated that the peptide 109-124 containing a putative T cell epitope represents the most protective epitope which induced more than 50% of protection in terms of mortality against lethal infection.

INTRODUCTION

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is estimated to affect 16-18 million people in Central and South America (1). Treatment of patients is based on the use of drugs such as nifurtimox and benznidazole. However, these products exhibit some toxic effects on man and have resulted in the cure of few chronic chagasic patients (2). Thus, the search of an effective vaccine against the disease is still needed.

Different strategies were developed in order to identify parasite components which could be used as a vaccine candidate. The use of inactivated parasites (3), fractionated parasite material (4), and irradiated non infectious *T. cruzi* trypomastigotes (5), have been shown to induce partial protection of mice against a lethal *T. cruzi* challenge. Due to the cross reactivity between some parasite and host components (6), and toxicity of some parasite molecules, identification and isolation of antigens that induce protective immune mechanisms is needed for the development of an effective convenient vaccine. In this way, the use of defined parasite surface antigens have already been shown to induce partial protection against lethal infection with reduced parasite levels (7, 8).

Moreover, several experiments performed using the mouse model, such as passive transfer of specific anti-*T. cruzi* polyclonal antibodies (9), different anti-*T. cruzi* antibody classes (10), or monoclonal antibodies against *T. cruzi* flagellar fraction (11), have already demonstrated the importance of the humoral response in host defense against *T. cruzi* challenge. Fischer rats have also been shown to be susceptible to *T. cruzi* infection (12), and could be considered as an experimental model for studies of the immune response which could be involved in resistance against *T. cruzi* infection. Using this model, Rodriguez et al. (13) showed that the neonatally initiated injections of anti- μ antibodies in rats resulted in a loss of antibody production and an increase of the rats susceptibility to the acute infection.

The biological significance of excretory-secretory antigens (ESA) has been well documented in some parasitic diseases such as Schistosomiasis (14). Moreover, in the case of *Toxoplasma gondii* it has been demonstrated that passive transfer of anti-ESA antibodies to nude rats could induce protection against lethal infection (15).

However, in the case of *T. cruzi* little is known about the parasite released products and their biological role. In our laboratory, we have described trypomastigote ESA and characterized different immunogens among them using sera from chagasic patients (16). Other studies indicated that the shedding of these polypeptides is independent of the presence of proteins or serum in the medium (17). Moreover, electron microscopy studies have revealed that these products are released in association with membrane vesicles (17, 18). More recently, Cerban et al. (19) demonstrated that *T. cruzi* released antigens could be used to induce a significant decrease of parasitemia levels during the acute phase of experimental Chagas disease. Nevertheless, this study was restricted to mouse model and the mortality parameter was not investigated. Our preliminary results showed that passive transfer of polyclonal antibody against an ES component induced partial protection in rats against lethal *T. cruzi* infection (16). In the present study, we have investigated the protective role of immunization with ESA in two models : BALB/c mice and Fischer rats, and analysed the isotype immune profiles of immunized and protected animals as well as the ability of these antibodies to destroy live parasites *in vitro*. In addition, antibodies against ESA were used to screen a *T. cruzi* trypomastigote cDNA library. cDNA clones corresponding to the 24 kDa released antigen were identified. The protective effect of synthetic peptide derived from the primary sequence of the 24 kDa polypeptide was also established in BALB/c mice.

MATERIALS AND METHODS

Parasites.

Parasites from the Y strain of *T. cruzi* were used throughout the study. Epimastigotes were cultured for 6 days at 28°C in a GLSH (Glucose Lactalbumin Serum Hemoglobin) as previously described (20). Trypomastigotes were maintained in tissue-culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as reported elsewhere (21). Extracellular amastigotes were prepared following the procedure previously described (22).

Preparation of trypomastigotes ESA.

Trypomastigotes were recovered from the supernatants of infected 3T3 fibroblasts as described (20). Parasites were washed three times with RPMI-1640 medium, counted in a hemocytometer and then resuspended in Ringer (NaCl 0.1M, CaCl₂ 8.8 10⁻⁴M, Kcl 1.3 10⁻³M, Na HCO₃ 1.2 10⁻³M) containing 1% glucose and incubated for 5 hours at 37°C. The suspension was then centrifuged (3000 xg) and the supernatants were passed through millipore filters 0,22 µm, dialysed against distilled water and concentrated using multiple Micro-ProDiCon system (Bio-Molecular Dynamics Beaverton, U.S.A.). Protein concentrations were determined using the method of Lowry (23). ESA aliquots of 50 ml were stored at -70°C until used.

Peptide synthesis.

20-40 and 109-124 synthetic peptides.

Peptides were synthesized by a stepwise solid-phase method (24) in a automated peptide synthesizer (model 430A, Applied Biosystems, Inc.), according to the butylxycarbonyl/trifluoroacetic acid (TFA) protocol, on a Phenylacetamidomethyl-resin (PAM-resin) (Applied Biosystems, Inc.). Trifunctional amino acids were protected as follows : Arg (*p*-toluenesulfonyl (Tos), Asp (O-cyclohexyl (OChx)), Cys (*p*-methylbenzyl (pMeBzl)), Glu (OChx), Lys (2-chlorobenzyloxycarbonyl (2-Clz), Met (sulfoxide (O), Ser (O-benzyl (Obzl), Trp (frrmyl). Amino acids were introduced using the dicyclohexylcarbodiimide/hydroxybenzotriazole

activation protocol in N-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP). At the end of the synthesis, the peptides were cleaved and deprotected by low and high hydrogen fluoride (HF) procedure. The cleaved deprotected peptide was precipitated with cold diethylether and then dissolved in 5% acetic acid and lyophilized. Crude peptide was purified by reversed-phase HPLC on a 5 µm, 300 Å Nucleosil C18 column (Macherey Nagel, Düren, FRG).

20-40 synthetic peptide :

**NH₂-ASP-GLY-LYS-ASN-ALA-LYS-ASP-ARG-LYS-GLU-ALA-TRP-GLU-
ARG-ILE-ARG-GLN-ALA-ILE-PRO-ARG-COOH.**

109-124 synthetic peptide :

**NH₂-GLY-SER-GLU-ASP-VAL-GLU-PHE-LEU-GLU-PHE-ARG-LEU-MET
-LEU-CYS-COOH**

Conjugation of the synthetic peptides with carrier protein.

Peptides were conjugated to OVA (Miles Research, Elkhart, IN.) using glutaraldehyde (Fluka, Buchs, Switzerland). The peptides (8 mmoles) were dissolved in 0.1 M sodium phosphate pH8 (2 ml) and introduced in a solution of OVA (10 mg) in 0.1 M sodium phosphate pH 8 (8 ml). A 2.5% glutaraldehyde solution (100 µl) was progressively added with continuous stirring. After 2 days the resulting mixture was exhaustively dialysed against 0.1 M sodium phosphate pH 7. Mass ratio of peptide to carrier protein was determined from amino acid composition.

Immunization and infection.

Five week old male BALB/c mice were inoculated three times intraperitoneally at two week intervals with three doses of 50 µg of ESA or synthetic peptides (pep20-40, and pep109-124), in association with 30 µl of Bordetella pertussis and Alum (BpAl) as adjuvant (VAXICOQ, Institut Merieux, Lyon, France : 4 U.I. of Bordetella pertussis and 1.25 mg of aluminum hydroxide/500

μl). Control groups corresponded to untreated mice, mice immunized with the carrier protein Ovalbumin (OVA) mixed with BpAl or BpAl alone. Two weeks after the last immunization, mice were infected intraperitoneally with 2×10^3 bloodstream trypomastigotes (Y strain).

Groups (five animals per group) of 3 week-old Fischer rats were also used. Immunization was carried out intraperitoneally with 50 μg of ESA in combination with 60 μl of BpAl. The second injection was performed as above two weeks later. Control groups corresponded to non-immunized rats, rats which were inoculated with OVA and BpAl or adjuvant alone. Before infection, all animals were bled from the orbital sinus and their sera were stored at -20°C until used. Two weeks after the last immunization dose, control and immunized rats were challenged intraperitoneally with 8×10^5 blood trypomastigotes per 500 μl per rat.

In these experiments, two parameters were followed : parasitemia and mortality. Survival was recorded for 150 days after infection.

Immunoblot analysis.

This was performed following the procedure described previously (25). Briefly, electrophoresis was carried out in 13% SDS polyacrylamide gels using total trypomastigote extracts, 31 kDa recombinant protein or isopropylthiogalactoside (IPTG)-induced bacterial lysates. Proteins were transferred to nitrocellulose paper. Strips were saturated with 5% milk and then incubated with mouse immune sera or TcR7 monoclonal antibody. After washing, the strips were incubated with peroxidase conjugated anti-mouse IgG (H+L) antibodies (Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France). The reaction was revealed with freshly prepared 0.06% (w/v) 4-chloro-1-naphtol (Sigma Chemical Co., USA) and 0.01% hydrogen peroxide in PBS pH 7.2.

Metabolic labelling.

This was performed following the procedure described elsewhere (16). Briefly, a total of 10^8 live motile trypomastigotes were washed twice in methionine-free Eagle's minimal Essential medium (GIBCO, Grand Island NY) and incubated for 1 hr at 37°C in 1 ml of the same medium

containing 5% (v/v) dialysed heat-inactivated foetal calf serum and 100 mci of (³⁵S) methionine (800 ci/mmol. Amersham). The parasites were then washed with RPMI-1640 medium and processed for immunoprecipitation.

Immunoprecipitation.

The immunoprecipitation technique was carried out following the procedure reported elsewhere (21).

Complement mediated lysis assay.

Complement mediated lysis was performed as previously described (26).

Determination of specific IgG subclasses by ELISA technic.

For this assay, flexible polyvinylchloride microtitration plates (Dynatech Alexandria, VA) were used. Plate wells were coated with trypomastigote ESA at concentration of 1 mg/ml and incubated overnight at 4°C. After being saturated with 2% bovine serum albumin (BSA) in 10 mM PBS pH 7.4 for 2 hr at room temperature, the wells were reacted with 100 µl of the appropriate sera diluted 1:100 in PBS and incubated overnight at 4°C. The wells were then washed three times with 0.1% PBS-Tween 20 and treated with appropriate anti-immunoglobulin isotypes or subclasses, as described in Table 1.

After the last incubation (one or two, depending on the isotype studied), the wells were washed twice with PBS-Tween. The enzyme substrate (*O*-phenyldiamine) was added and the plates were incubated for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 1N hydrochloric acid. The intensity of the color was read at 492 nm using a titertek multiskan reader (Flow Laboratories, Baar, Switzerland).

Detection of specific IgE antibodies.

The specific IgE antibodies were detected using a radioimmunoassay technique (RIA). Tubes (NUNC, Roskilde, Denmark.) were coated overnight at 4°C with 250 µl of trypomastigote ESA antigens (10 µg/ml) in 0.015 M Na₂CO₃/0.035 M Na HCO₃ buffer pH 9.6. Tubes were

Table 1.

| Antibody specificity ^a | Species ^b | Source | Dilution |
|---|----------------------|---|----------|
| Anti-rat IgM (μ chain specific) peroxidase labeled | Mouse Mab | Biosys (Compiègne, France) | 1/5000 |
| Anti-rat IgA (α chain specific) | Mouse Mab | Gift from H. Bazin (Brussels, Belgium) | 1/1000 |
| Anti-rat IgG (γ_1 , γ_2a , γ_2b , or γ_2c chain specific) | Rabbit | Biosys | 1/5000 |
| Anti-rat IgE (ϵ chain specific) | Mouse Mab | Biosys | c |
| Anti-mouse IgG1 (γ_1 chain specific) peroxidase labeled | Rat Mab | Biosys | 1/2000 |
| Anti-mouse IgG2a (γ_2a chain specific) peroxidase labeled | Rat Mab | Biosys | 1/500 |
| Anti-mouse IgG2b (γ_2b chain specific) peroxidase labeled | Rat Mab | Biosys | 1/1000 |
| Anti-mouse IgG3 (γ_3 chain specific) peroxidase labeled | Rat Mab | Biosys | 1/500 |
| Anti-mouse IgM (μ chain specific) peroxidase labeled | Rat Mab | Biosys | 1/200 |
| Anti-mouse IgA (α) : peroxidase labeled purified antibody | Goat | KPL | 1/500 |
| Anti-mouse IgG (H+L): peroxidase labeled affinity purified antibody | Sheep | Diagnostics Pasteur (Marnes la Coquette, France) | 1/500 |
| Anti-human IgG (H+L): peroxidase labeled affinity purified antibody | Goat | Diagnostics Pasteur | 1/500 |
| Anti-rabbit IgG (H+L): peroxidase labeled affinity purified antibody | Goat | Diagnostics Pasteur | 1/5000 |

^a H+L, Heavy plus light chains.^b Mab, Monoclonal antibody.^c See materials and methods.

then saturated for 2 hr at room temperature with PBS containing 2% BSA, and incubated overnight at 4°C with 250 µl of diluted (1/5) rat immune sera. After washing with 0.1% PBS-Tween 20, tubes were reacted with 20 ng of ¹²⁵I labelled monoclonal anti-rat IgE (spec. act. 10⁷ cpm/mg) overnight at 4°C. The tubes were then washed three times with PBS-Tween and counted in a Packard (Downers Grove, IL) gamma counter.

cDNA library and sequencing.

Total RNA from the trypomastigote stage was purified from guanidium-lysed parasites by cesium chloride centrifugation. Poly (A⁺) RNA was purified from trypomastigote total RNA as previously described (27) and used for the construction of the cDNA library using a λZap II cDNA cloning kit and Gigapack Gold (Stratagene). For the immunoscreening of recombinant phages, the replicate filters were incubated overnight at 4°C with rat antiserum to ESA diluted 1:100 in PBS buffer. After washing, filters were reacted with peroxidase conjugated-rabbit anti-rat IgG (H+L) for 2h at room temperature. The positive recombinants were revealed as described above.

The sequencing of the positive clones was performed according to the method described elsewhere (27).

Isolation of the 31 kDa recombinant fusion protein.

The IgG1 monoclonal antibody (Tcr7) was isolated from ascitic fluid using a DEAE agarose column. The IPTG-induced bacterial lysates were applied to a column (1ml) of Sepharose 4B previously conjugated to 1 mg of IgG1 monoclonal antibody. The column was extensively washed with PBS buffer (0.01M pH 7) containing 0.3M NaCl and 0.5% NP40. After a final wash with PBS, the protein was eluted with 50 mM diethylamine pH 11.5 and the solution immediately neutralized with 1M NaH₂PO₄. The concentration of the eluted proteins was then determined using the method of Lowry (23) and the material was kept at -70°C until used.

Antisera to the 31 kDa recombinant protein.

BALB/c mice were immunized three times intraperitoneally at two week intervals with three doses of 4 µg of affinity-purified antigen in the presence of 30 µl of BpAl. An additional group was injected with 4 µg of β-galactosidase mixed with 30 µl of BpAl.

All mice were bled two weeks after the last injection and the sera were stored at -70°C until used.

Indirect immunofluorescent antibody test (IFA).

The IFA was performed using formaldehyde-fixed parasites. *T. cruzi* developmental stages were washed twice with PBS and fixed for 30 min with PBS containing 2% formaldehyde. After washing, parasites were allowed to air dry on microscope slides. Mouse antiserum to the 31 kDa recombinant protein was used in this experiment and the reaction was performed as reported elsewhere (18).

Immunoelectron microscopy.

The immunoelectron microscopy was performed according to Webster et al. (28) with minor modifications. Briefly, *T. cruzi* epimastigotes were fixed 30 min at room temperature then 1 h at 4°C in PIPES buffer 0.2 M containing 0.05% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde. They were then centrifuged and resuspended in phosphate buffer 0.2 M pH 7.4 containing 10% Foetal Calf Serum (PBS-FCS). Parasites were centrifuged and the pellet transferred to solution of 2.3 M sucrose, 20% PVP in phosphate buffer 0.1 M pH 7.4 and incubated overnight at 4°C. They were then mounted onto metal specimen holders, frozen by immersion in liquid nitrogen and sectioned at -100°C with an ultramicrotome with cryoattachment (Reichert-Jung, Vienna/Austria). For the immunodetection, thawed cryosections mounted on formvar-coated grids, were incubated with the following reagents : (a) mouse immune serum to 24 kDa recombinant protein diluted 1/50 in PBS-FCS for 30 min at room temperature followed by three washes in PBS; (b) rabbit anti mouse immunoglobulins (Miles) diluted 1/500 in PBS-FCS for 30 min at room temperature and then three washes in PBS; (c) colloidal gold coupled to protein A (PAG, 8 nm) for 30 min at room temperature and then three washes in PBS followed by two washes in distilled water. Grids were finally dried in the presence of methyl cellulose and uranyl acetate.

RESULTS

In vivo protection induced by immunization with trypomastigote ESA.

The capacity of ESA to induce protection in mouse and rat models was tested using BpAl as adjuvant. The results obtained indicated that mice immunized with ESA-BpAl and challenged with bloodstream trypomastigotes presented a significant reduction in parasitemia and mortality when compared to control mice (Fig. 1A, 1B). Indeed, none of the animals in this group died up to 26 days after infection. 63% of ESA-BpAl immunized mice survived and were maintained until 150 days post-infection. In contrast, control groups showed high parasitemia levels and all mice died between the 19th and 39th day after infection.

In immunization experiments performed using the Fischer rat model, 100% of ESA-BpAl immunized rats were protected against acute lethal infection whereas, 60 to 80% of control rats died 36 days after infection (Fig. 2). In this experiment, the parasitemia was not investigated because the rats died just after the appearance of bloodstream trypomastigotes.

Characterization of antigens recognized by sera of immunized mice and rats.

Mouse antisera obtained after immunization with ESA mixed with BpAl were tested using western blot carried out on total trypomastigote extracts. The results obtained showed that the immune sera contained antibodies which recognized two major bands of 85 and 24 kDa (Fig. 3, Lane 3). Moreover, sera of immunized and protected mice were highly reactive against a large set of parasite antigens including the 24 kDa complex (Fig. 3, Lane 4). Three non specific bands were also revealed by immune and control sera.

In the case of rats, the immune sera were tested using a more sensitive technique. Immunoprecipitation of methionine labelled trypomastigote lysate with sera from rats immunized with ESA-BpAl revealed two polypeptides of 85 and 24 kDa (Fig. 4, Lane 3). These bands were also immunoprecipitated by sera from immunized and protected rats (Fig. 4, Lane 4). Control precipitations with normal rat sera and sera from rats immunized with BpAl alone were all negative (Fig. 4, Lane 1 and 2).

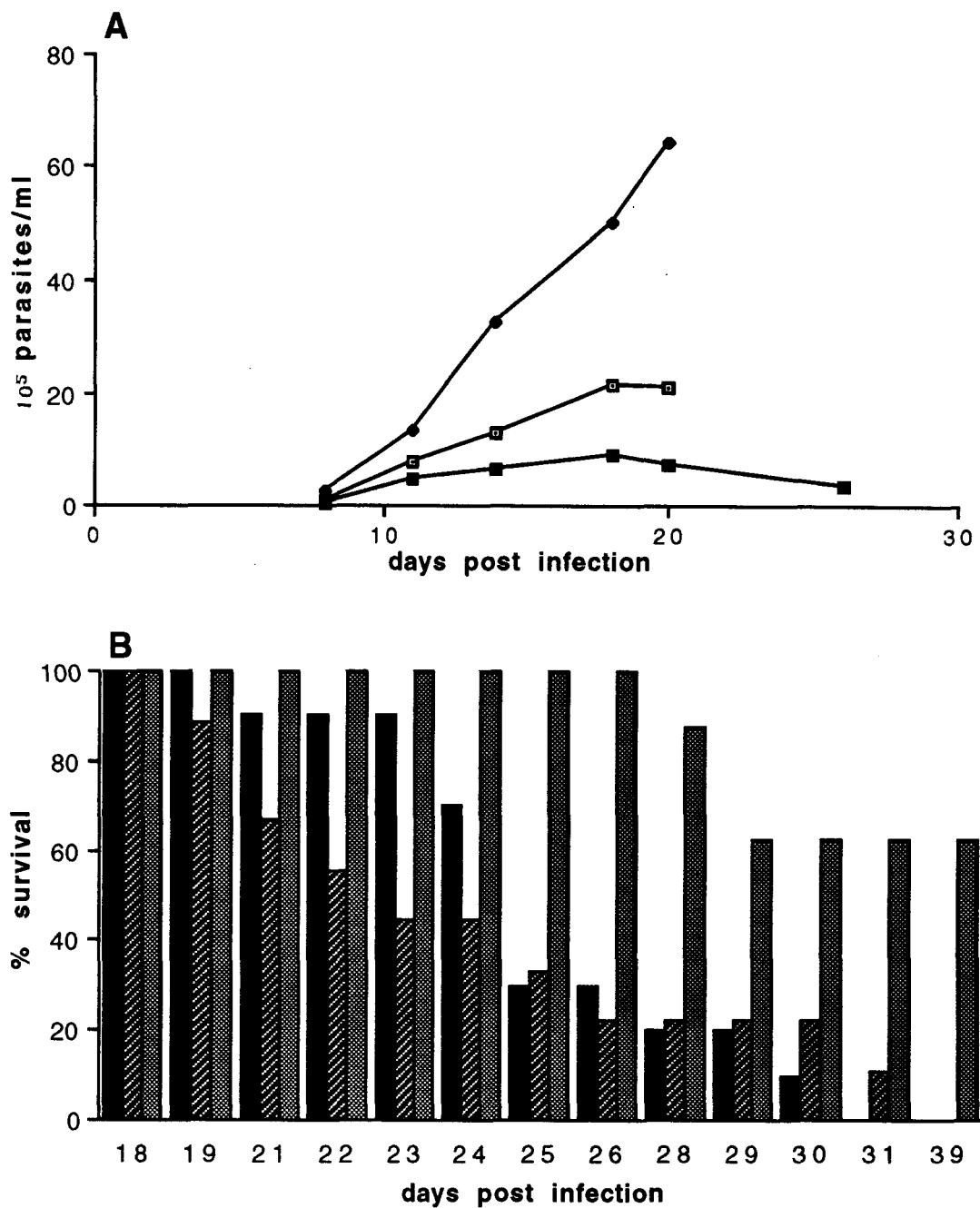


Figure 1: A. Time course of *T. cruzi* infection in mice. Control group of 10 non immunized mice (\square), 9 mice immunized with BpAl alone (\bullet), 8 mice immunized with ESA-BpAl (\blacksquare), were challenged with 2×10^3 bloodstream trypomastigotes of Y strain.

B. % of survival of control of 10 non immunized mice (\blacksquare), 9 mice immunized with BpAl alone (\square), 8 mice immunized with ESA-BpAl (\blacksquare).

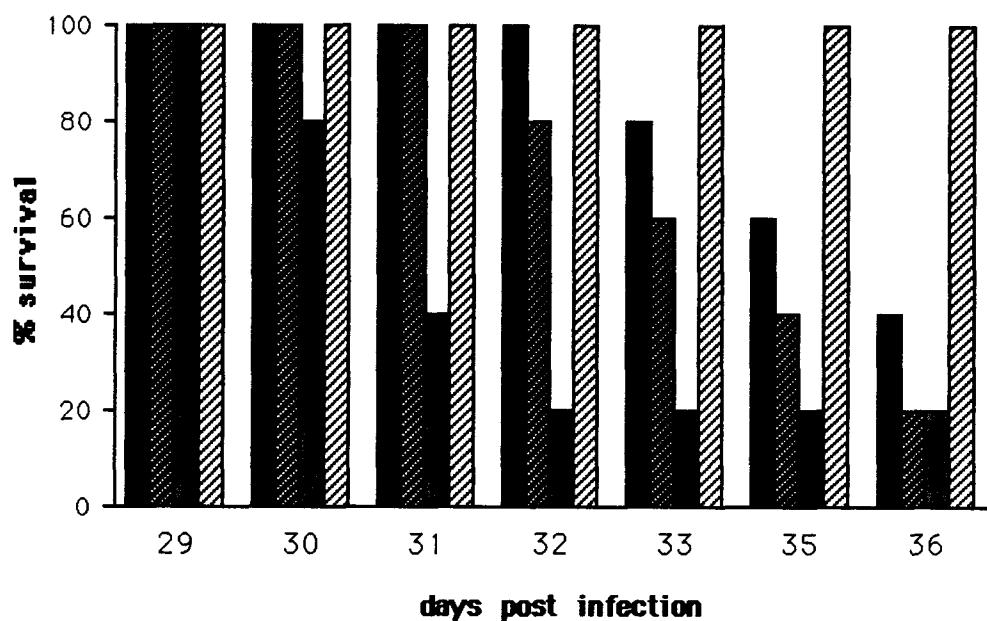


Figure 2. % of survival of control group of 5 non immunized rats (■), 5 rats immunized with BpAl alone (▨), 5 rats immunized with OVA-BpAl (▤), 5 rats immunized with ESA-BpAl (▩). Rats were challenged with 8×10^5 bloodstream trypomastigotes of Y strain.

Figure 3. Western blot of trypomasigote extracts using : sera from untreated mice (1), sera from mice immunized with BpAl alone (2), sera from mice immunized with ESA-BpAl (3), sera from protected mice (4).

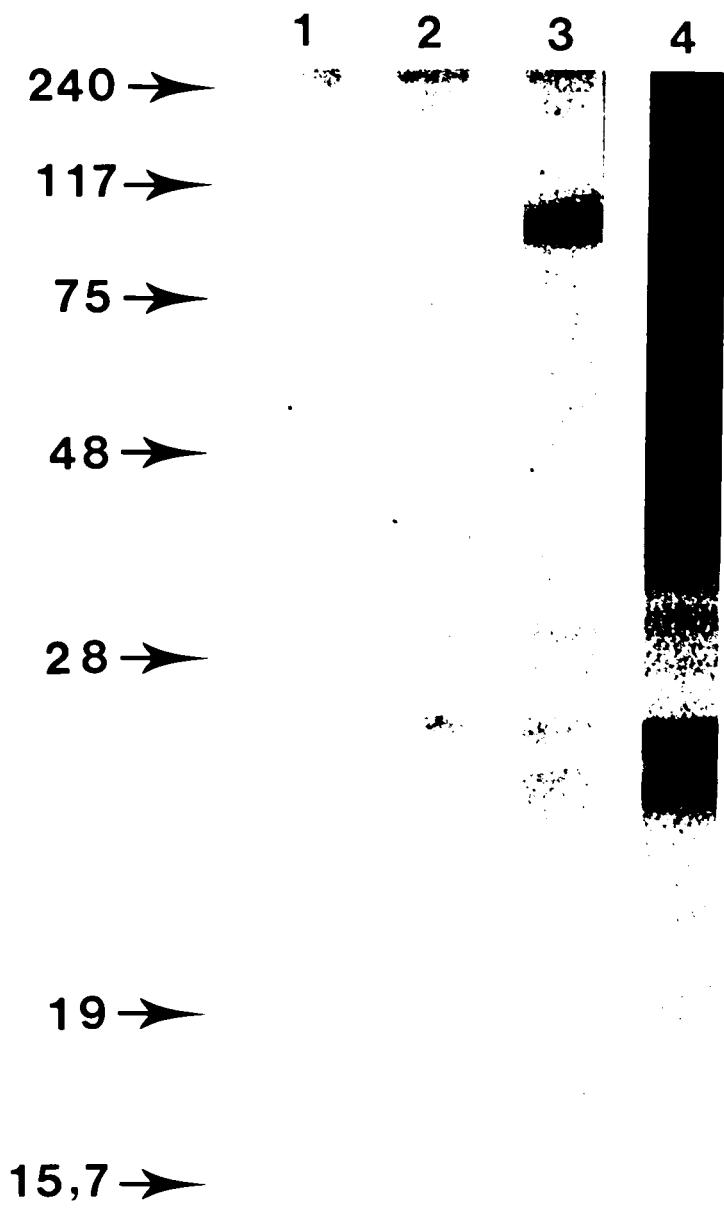


Figure 4. SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from ^{35}S methionine labelled trypomastigote NP40 soluble antigens using : normal rat serum (1), serum from rat immunized with BpAl alone (2), *T. cruzi* infected rat serum (3), sera from rats immunized with ESA-BpAl (4).

1 2 3 4

240 →

117 →



75 →

48 →



28 →

19 →

15,7 →

Isotype profiles of sera from mice and rats immunized with ESA.

Sera of mice and rats were tested by ELISA against ESA for the detection of specific antibody isotypes. In the experimental conditions used, no IgM and IgA antibodies could be detected in the sera of ESA-BpAl immunized mice. In contrast, analysis of IgG response showed that sera of mice immunized with ESA-BpAl presented significant levels of specific IgG1 and IgG2b subclasses, whereas IgG2a and IgG3 responses were negative (Fig. 5). These specific antibody levels showed significant enhancement in the sera of protected mice at 50 days post-infection.

The isotype profiles were also examined in the case of Fischer rats. The results obtained indicated that the immunization of rats with ESA-BpAl induced a significant level of IgM and IgG antibody subclasses (Fig. 6). The optical density values of all antibody classes were increased in the sera of immunized and protected rats tested 60 days after infection indicating an enhancement of antibody response.

The IgE specific antibody response was also examined. Rat antisera were reacted against ESA using an RIA test. The results obtained showed that the immunization of Fischer rats with ESA induced a weak IgE response. In contrast, IgE specific antibody could be detected in sera from rats following *T. cruzi* challenge infection : ESA-BpAl immunized and protected rats ($645 \text{ cpm} \pm 87$); sera from rats immunized with BpAl alone ($494 \text{ cpm} \pm 195$); sera from rats immunized with OVA-BpAl ($245 \text{ cpm} \pm 93$); normal rat sera ($312 \text{ cpm} \pm 136$). Mouse antisera were also tested for the presence of specific IgE antibodies using the same protocol and no IgE antibody could be detected.

Complement mediated lysis of cell culture derived trypomastigotes by mouse and rat antisera to ESA.

Sera of different groups of mice and rats were tested for their ability to lyse trypomastigotes *in vitro* in the presence of complement. As shown in Table 2, sera of mice and rats immunized with ESA-BpAl induced a significant lytic activity against *T. cruzi* infective forms (70,9% and 32,83% respectively), when compared to the values obtained with sera from chronically infected animals (100% and 96,5% respectively). These results clearly demonstrated the ability of ESA to induce the production of lytic antibodies.

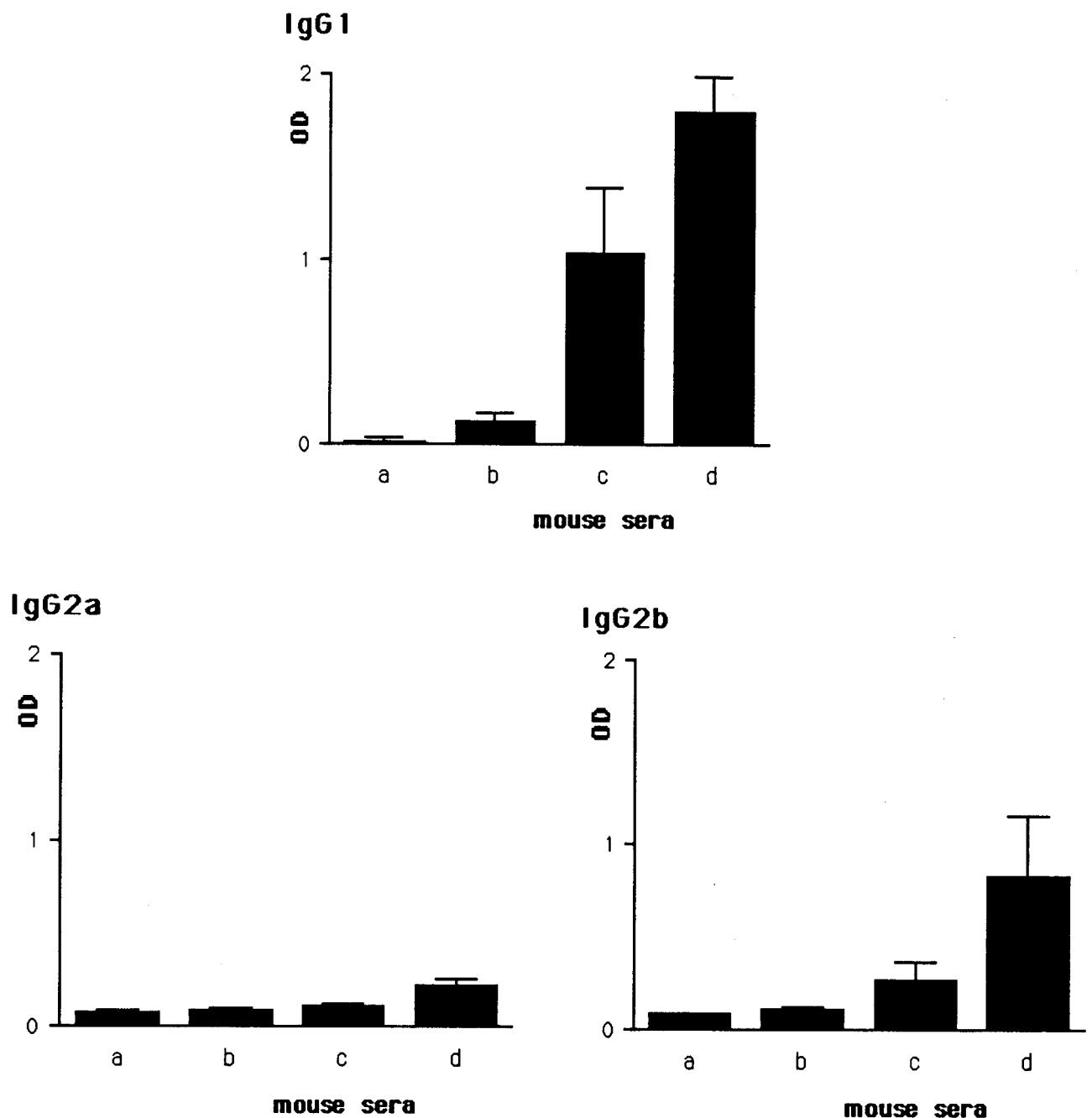


Figure 5. Specific IgG subclass profiles of antibodies induced by immunization with trypomastigote ESA, in sera from non immunized mice (**a**), sera from mice immunized with BpAl alone (**b**), sera from mice immunized with ES-BpAl (**c**), sera from mice immunized with ESA-BpAl, infected and protected (**d**).

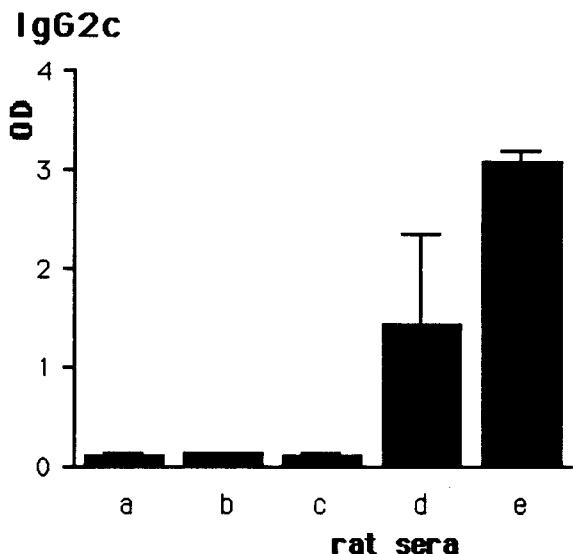
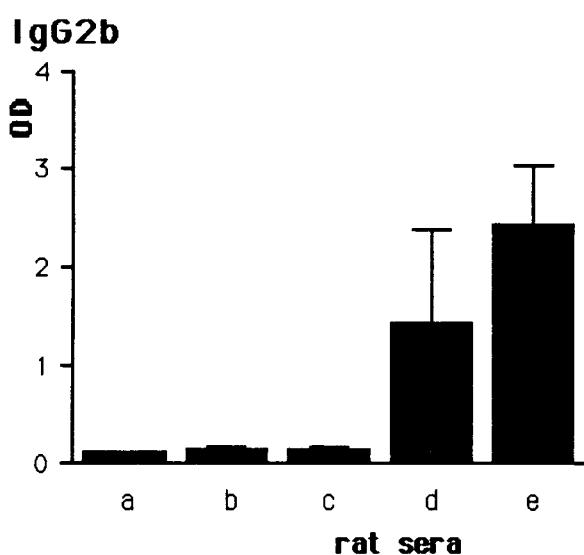
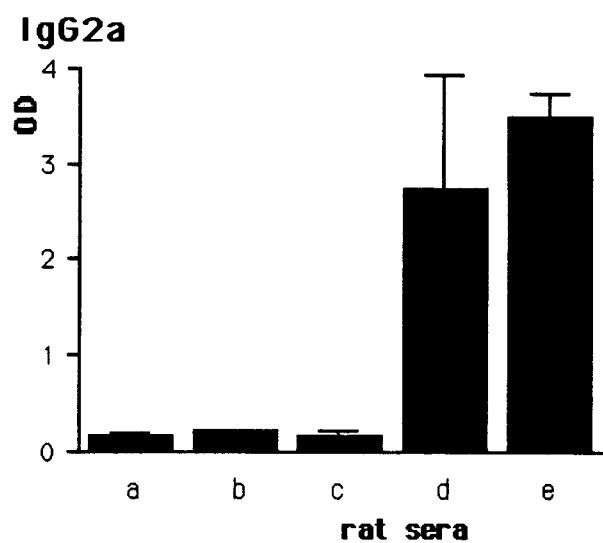
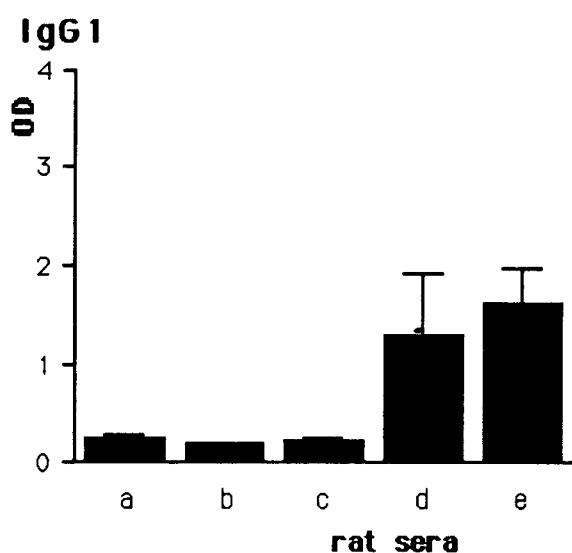
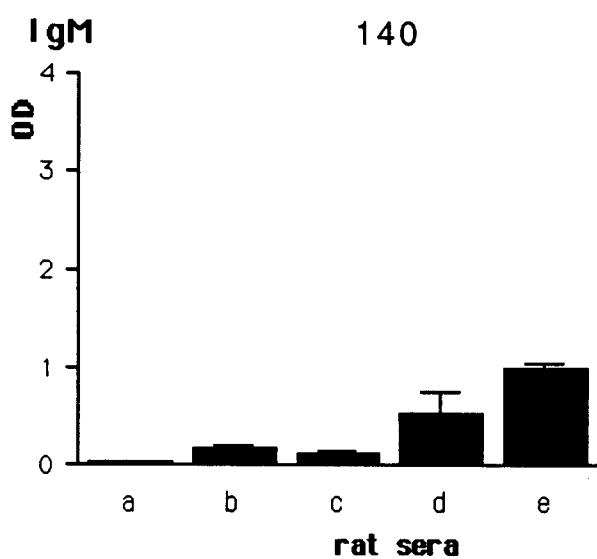


Figure 6. Specific isotype profiles of antibodies induced by immunization with ESA, in sera from non immunized rats (**a**), sera from rats immunized with BpAl alone (**b**), sera from rats immunized with OVA-BpAl (**c**), sera from rats immunized with ESA-BpAl (**d**), sera from rats immunized with ESA-BpAl, infected and protected (**e**).

Table 2. Complement mediated lysis of trypomastigotes by sera from mice and rats immunized with ESA and BpAl as adjuvant.

| <u>Immunization group</u> | <u>CML of trypomastigotes (%)</u> |
|---|-----------------------------------|
| Non immunized mice (2)* | 0 |
| Sera of mice inoculated with BpAl alone (2) | 6.5 |
| Sera of mice immunized with ESA-BpAl (8) | 71.9 |
| Sera of chronically infected mice (2) | 100 |
| Non immunized rats (5) | 5.59 |
| Sera of rats injected with BpAl alone (5) | 6 |
| Sera of rats inoculated with Ovalbumine-BpAl (5) | 6.29 |
| Sera of rats inoculated with ESA-BpAl (5) | 32.83 |
| Sera of chronically infected rats (5) | 96.5 |

(*) is the number of sera used in the lysis test.

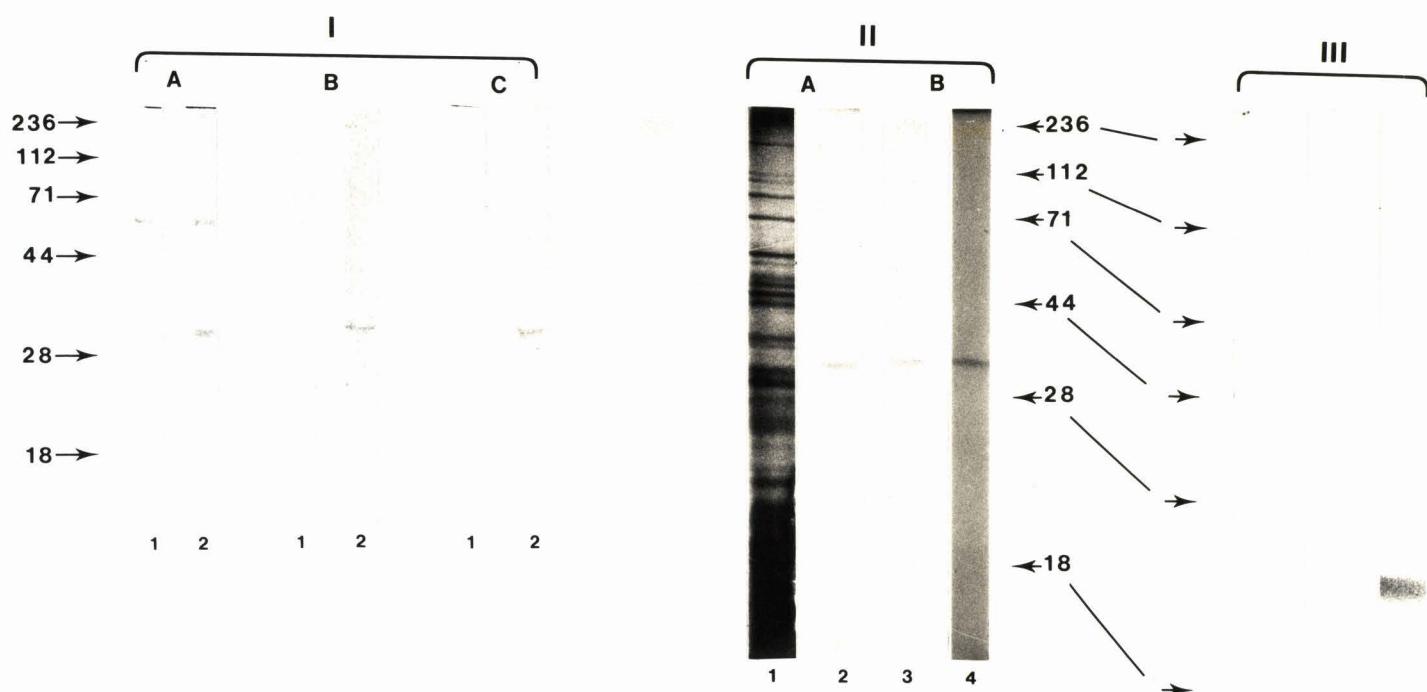
Identification of cDNA clones.

Using rat antiserum to ESA, the immunoscreening of a culture derived trypomastigote cDNA library revealed several clones of insert size between 280 and 860 bp (data not shown). Five clones were selected and DNA sequencing showed that all the clones presented overlapping nucleotide sequences. The clone presenting the largest insert (860bp) was completely sequenced. The search for possible homology of the cloned cDNA sequence in the GenBank database, revealed 98.6% in terms of aminoacid sequence with a previously described *T. cruzi* cDNA encoding a 24 kDa Ca²⁺ binding-protein (29, 30). Moreover, using a monoclonal antibody (Tcr7) against *T. cruzi* 24 kDa native protein one of us has recently identified cDNA clones corresponding to the 24 kDa protein carrying the epitope reacting with Tcr7 MAb (27). The homology search revealed that the cDNA clones defined by Tcr7 MAb was 99.8% homologous to the corresponding to the 24 kDa calcium-binding protein and to TA10 defined by anti-ESA antibodies. The differences observed between the TA10 clone and the one defined by Tcr7 MAb, correspond to the substitution of amino acids A at position 3 and L at position 143 by T, and F respectively.

Purification of the recombinant protein and study of its immunogenicity.

A pool of sera from chagasic patients, or experimentally infected animals presenting the chronic form of the disease (BALB/c and CBA mice), were tested against IPTG-induced bacterial lysates. As shown in Fig. 7-I, all reacted against the 31 kDa recombinant fusion protein. In our laboratory, recent studies showed that the immunoscreening of a *T. cruzi* epimastigote cDNA library using MAb (Tcr7) produced against a 24 kDa native protein resulted in the identification of cDNA clones encoding for the same polypeptide (27). Using this MAb the recombinant fusion protein was purified by affinity chromatography. Silver staining revealed a large number of polypeptides in the IPTG-induced bacterial lysates, whereas the profile of eluted protein showed a high level of purification of the recombinant fusion protein (Fig. 7-II.A1 and 2). The eluted material was used to immunize mice, and the antibodies obtained reacted against a 24 kDa polypeptide when tested by western blot against a total trypomastigote extract (Fig. 7- III.3)

Figure 7. I: Detection of the 31 kDa recombinant protein by western blot technique using the IPTG-induced bacterial lysates (2). In the same reaction conditions, a *Toxoplasma gondii* recombinant protein was used as control antigen (1). A, B, and C represent respectively; the reactivity obtained with a pool of sera from chronically infected BALB/c mice, CBA mice and sera from chagasic patients with chronic infection. **II-A:** Silver-stained SDS-polyacrylamide gel containing IPTG-induced bacterial lysates (1), and the material purified by affinity chromatography using Tcr7 MAb (2). **II-B:** reactivity of the Tcr7 MAb against IPTG-induced bacterial lysates using western blot (3), and against the recombinant protein eluted from the affinity column coupled to Tcr7 MAb (4). **III:** western blot of trypomastigote extracts using : normal mouse serum (1), serum from mouse immunized with β galactosidase and BpAl (2), serum from mouse immunized with the 31 kDa recombinant protein (3).



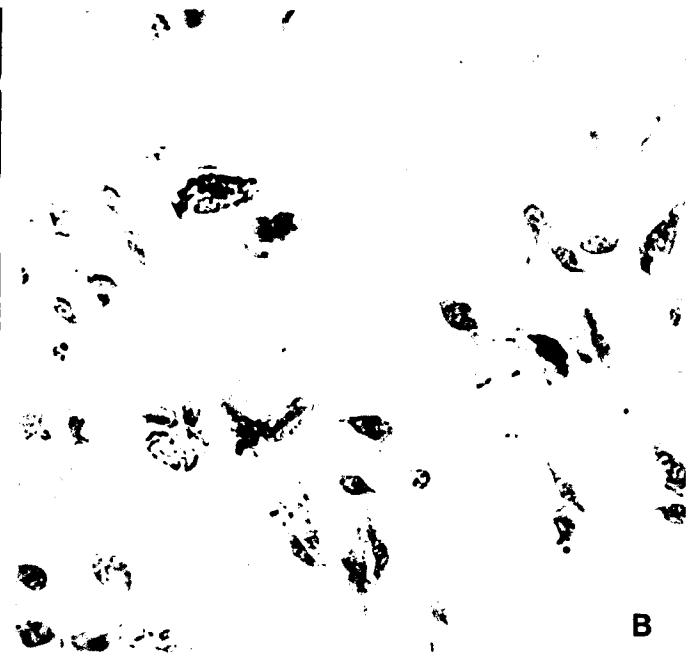
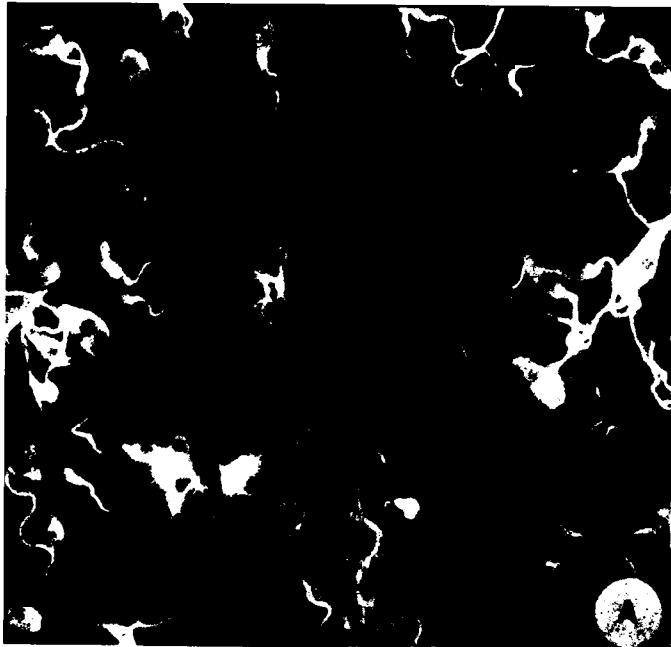
Reactivity of mouse antiserum to the 31 kDa recombinant protein against *T. cruzi* developmental stages.

Mouse antiserum produced against the 31 kDa recombinant fusion protein was used in IFA studies to localize the 24 kDa protein in different *T. cruzi* developmental stages. As shown in Fig. 8-C the reactivity was observed in the intracellular compartment of both trypomastigotes and amastigotes. In the epimastigote, the reactivity was mainly localized in the flagellum (Fig. 8-A). At higher resolution, immunoelectron microscopy using cryosections of epimastigotes showed that the 24 kDa molecule is associated with the flagellum membrane (Fig. 8-E).

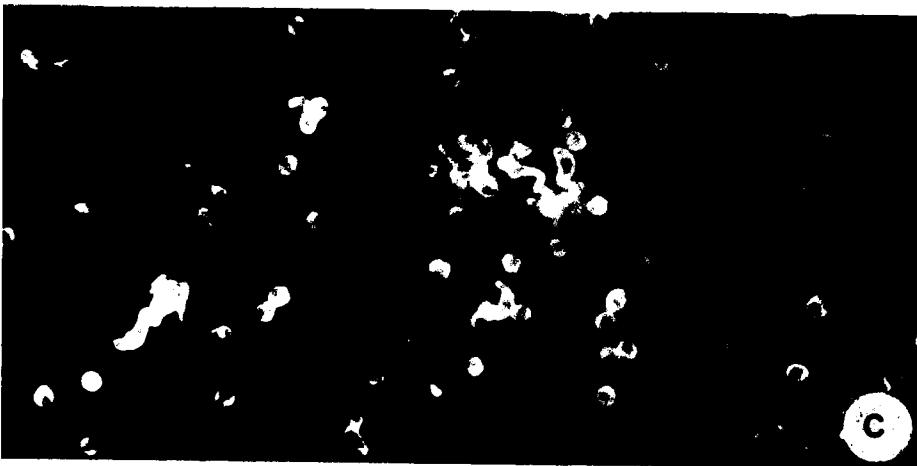
Immunoprotection induced in BALB/c mice using synthetic peptides.

The use of the homology scanning microcomputer program to predict functional T cell epitopes within the 24 kDa protein (31) revealed several haplotype specific T cell determinants that are located within the following sequences: from residue 39 to 62; 95 to 109 and 125 to 146 for CBA mice and from residue 95 to 109 and 111 to 121 for BALB/c mice. Since previous data from other laboratories suggested the involvement of CD8⁺ T cells in the immune protection against acute phase of experimental Chagas disease, we performed immunization experiments of BALB/c mice using synthetic peptides: the 20-40 peptide localized within the N-terminal region domain of the molecule previously shown to carry the Tcr7 MAb reactive epitope (27); the 109-124 peptide containing the putative BALB/c mice T cell determinant. The results obtained showed that in the experimental conditions used 75 to 84% of control mice (untreated mice and mice immunized with OVA-BpAl respectively) died 53 days after infection. Moreover, using 20-40 synthetic peptide conjugated to OVA, no protection was obtained. In contrast, mice immunized with the 109-124 peptide coupled to OVA were protected in terms of mortality against acute lethal infection with 55% survival (Fig. 9).

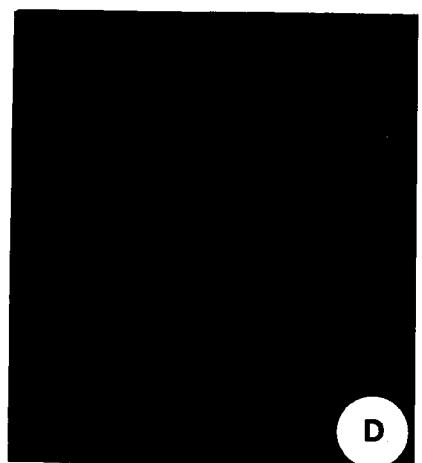
Figure 8. Immunofluorescence studies using mouse antiserum to the 31 kDa recombinant protein performed on formaldehyde fixed material. (A) epimastigotes. (C) mixed preparation of tissue culture derived-trypomastigotes and extracellular amastigotes. (D) no positive reaction was detected with mouse antiserum to β galactosidase. (B) epimastigotes seen on light microscopy. (E) electron micrographs of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes showing localization of the 24 kDa antigen on the parasite flagellum E, x24,000.



B



C



D



E

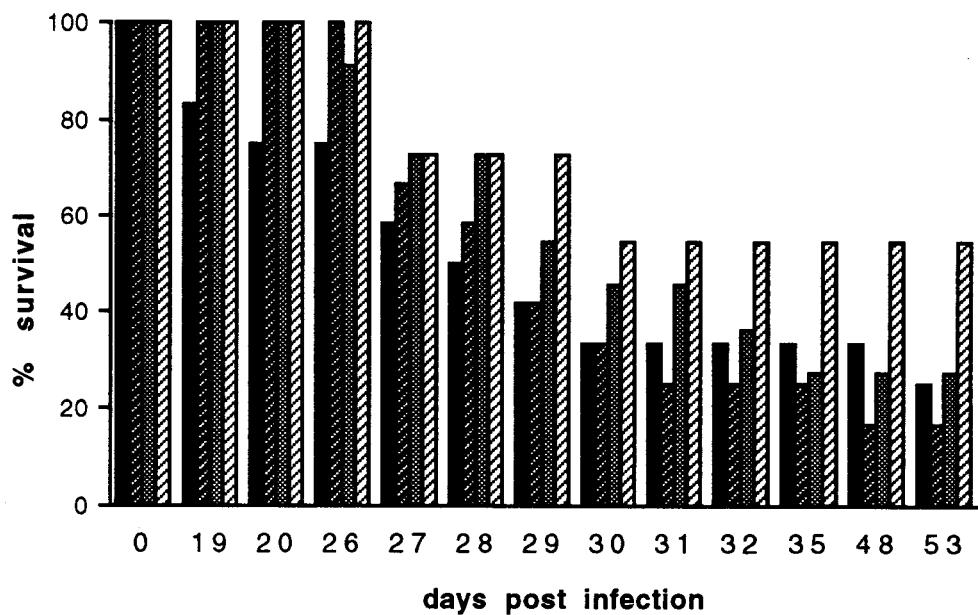


Figure 9. % of survival of control group of 12 non immunized mice (■), 11 mice immunized with OVA-BpAl (▨), 11 mice immunized with peptide 20-40 in association with BpAl (▨), 11 mice immunized with peptide 109-124 mixed with BpAl (▨). Mice were challenged with 2×10^3 bloodstream trypomastigotes (Y strain).

DISCUSSION

We have previously studied the relative importance of trypomastigote ESA during natural human infections and revealed the presence of antibodies against a limited number of major components. Among them, we identified an 85 kDa complex of proteins and showed that passive transfer of polyclonal antibodies against this component to naive rats induced a partial protection against lethal *T. cruzi* infection (16). Moreover, we have demonstrated that these products are expressed transiently on the surface of these parasite. In the present study, we have shown that trypomastigote ESA, when used in active immunization protocols in association with BpAl as adjuvant, induced production of lytic antibodies in both models : BALB/c mice and Fischer rats. A significant level of protection in terms of parasitemia and mortality in mice, and a high protection of rats against acute lethal infection were obtained. The antisera of mice and rats reacted against an 85 kDa complex and a 24 kDa polypeptide.

It is well known that humoral immunity plays an important role in the protective mechanisms against *T. cruzi* infection. Moreover, studies performed in experimental models showed that among different IgG subclasses, IgG2 and preferentially IgG2b appeared to be the most efficient antibodies against acute lethal infection (10, 32). Our present study showed that the immunization of mice with ESA induced production of IgG1 and IgG2b specific antibody responses which increased significantly following challenge infection. In contrast, the immunization of rats with ESA induced production of IgM and all IgG specific subclasses whose synthesis was increased upon challenge infection. Moreover, antisera against ESA exhibited lytic activity against culture derived *T. cruzi* trypomastigotes in an *in vitro* assay.

Under our experimental conditions, no specific IgE synthesis could be induced in mice. In the rat model, a specific IgE response could be detected in the sera of ESA-immunized rats only after challenge infection. These observations contrast with the results reported by other investigators who showed that immunization of mice with *T. cruzi* exoantigens could induce an IgE response (33). This apparent discrepancy needs further investigation, and the participation of this antibody isotype in parasite killing has to be explored. The results of immune protection

obtained in mice and rats after immunization with ESA could be explained by direct killing of parasite by specific antibodies in the presence of complement. Other mechanisms such as antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by eosinophils, neutrophils or other cellular populations could be involved in the parasite destruction (34, 35, 36).

Several previous reports have indicated that the immunization of mice with parasite surface components can confer resistance to acute *T. cruzi* infection (7, 8). Nonetheless, the study of ESA rather than parasite surface proteins as a strategy for vaccine development has been considered as an interesting alternative approach (37). Indeed, during infection, *T. cruzi* uses several mechanisms permitting it to escape the immune response. The ESA could play a role in this strategy by complexing antibodies, thus allowing the parasite to evade the immune response. These products might also possess some enzymatic activities which could destroy some cellular populations (38), or inhibit the host immune system (39). Thus, immunization with *T. cruzi* released products could induce an efficient immune response which may participate in the inhibition of some activities of these antigens and therefore increase the efficiency of the host immune system against *T. cruzi* infection.

In the protection experiments performed using native ESA, we have focused our investigations on the antibody immune responses. The antibody response obtained might play a role in the immune mechanisms involved in the control of *T. cruzi* infection. However, the role of cell mediated immunity in the resistance against lethal *T. cruzi* infection has also to be considered. Indeed, despite the fact that a high lytic activity against parasite infective forms was obtained when using mouse and rat antisera to ESA, no correlation could be established between the trypanolytic activity of each immune serum and parasitemia levels or mortality during infection. These results suggest that if the lytic antibodies play a role in the destruction of parasites and immune protection phenomena, other important mechanisms could also be involved.

Using rat antiserum to ESA, the immunoscreening of a trypomastigote cDNA library revealed several cDNA clones which encode for a previously described *T. cruzi* 24 kDa calcium binding protein (27, 29, 30). As reported by Engman et al (30), we observed that this protein is localized to the flagellum of the epimastigote stage. However, we showed clearly that this protein exhibited different localization of expression in various developmental stages since in trypomastigote and amastigote forms it appeared to be expressed intracellularly throughout the

parasite. This protein could play a role in Ca^{2+} metabolism but its specific function has yet to be determined.

In a recent study, using a monoclonal antibody (Tcr7) reactive with all *T. cruzi* developmental stages and a 24 kDa native protein, we have cloned and sequenced a cDNA clone corresponding to the 24 kDa protein carrying the epitope reactive with Tcr7 MAb (27). Using the Tcr7 MAb we have isolated the 24 kDa recombinant protein and demonstrated that this molecule is immunogenic during natural human and experimental infections. Moreover, the use of microcomputer program to predict functional T cell epitopes enabled us to demonstrate that synthetic peptide derived from the primary sequence of the 24 kDa protein and carrying the T cell determinant could induce a significant level of protection against lethal *T. cruzi* infection in BALB/c mice, when compared to the peptide derived from the N-terminal sequence of the protein containing the Tcr7 MAb reactive site. These observations are in agreement with the data showing that T cells are involved in the immune protection mechanisms against experimental acute *T. cruzi* infection (40, 41, 42, 43). Moreover, using western blot technique mouse immune serum to the 109-124 peptide was tested against different mouse and rat tissues and no reactivity was obtained (data not shown).

Chagas disease is associated with many immunopathological reactions that could be the results of non specific polyclonal activation (44) or suppressive effects (45) that occur during *T. cruzi* infection. The presence of antigens cross-reactive between *T. cruzi* and mammalian cells could also participate in the appearance of immunological disorders (46). It is thus essential to take into account these phenomenon when trying to develop efficient vaccine against *T. cruzi*. Indeed, in a recent study, it has been shown by Pestel et al (47) that a repeat peptide derived from the sequence of an 85 kDa surface protein of *T. cruzi* trypomastigotes (48) and able to induce partial protection against lethal infection in BALB/c mice, could act as a nonspecific stimulator of presensitized cells. The results obtained in the present study demonstrated for the first time that a peptide sequence of a *T. cruzi* protein containing a putative T cell epitope could induce a significant protection against *T. cruzi* infection. Further studies will have to examine in detail the nature of T cell dependent immune protection mechanism induced by the 109-124 peptide.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors wish to thank Dr. J.F. Dubremetz for his help to perform electron microscopy studies and Dr. J. G. Guillet for computer analysis to predict functional T cell epitopes and C. Drolez for collaborative efforts.

REFERENCES

1. **W.H.O.** 1988. Chagas disease. in : Tropical Disease Research Ninth Programme Report. World Health Organization. Genève. 79.
2. **Morello, A.** 1988. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxification mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochem. and Physiol.* 19:1.
3. **Andrews, N.W., M.J.M. Alves, R.I. Schumacher, and W. Colli.** 1985. *Trypanosoma cruzi* : Protection in mice immunized with 8-Methoxysoralen-inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 60:255.
4. **Gonzalez Cappa, S.M., A. Bronzina, A.M. Katzin, H. Golfera, G.W. De Martini, and E.L. Segura.** 1981. Antigens of subcellular fractions of *T. cruzi*. III. Humoral immune response and histopathology of immunized mice. *J. Protozool.* 27:467.
5. **Zweerink, H.J., H.D. Weston, O.F. Andersen, S.S. Garber, and E.C. Hayes.** 1984. Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigote polypeptides. *Infect. Immun.* 46:826.
6. **Khoury, E.L., V. Rtacco, P.M. Cossio, R.P. Languens, A. Szarfman, C. Diez, and M. Arana.** 1979. Circulating antibodies to peripheral nerve in American trypanosomiasis (Chagas'disease). *Clin. exp. Immun.* 36:8.
7. **Scott, M.T., and D. Snary.** 1979. Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature* 282:73.

8. Snary, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* : protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:126.
9. Krettli, A.U., and Z. Brener. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116:755.
10. Takehara, H.A., A. Perini, M.H. Da Silva, and I. Mota. 1981. *Trypanosoma cruzi* : role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. parasitol.* 52:137.
11. Segura, E.L., J. Bua, A. Rosenstein de Campanini, E. Subias, M. Esteva, M. Moreno, and A.M. Ruiz. 1986. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* : Complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Lett.* 13:165.
12. Rivera-Vanderpas M.T., A.M. Rodriguez, D. Afchain, H. Bazin, and A. Capron. 1983. *Trypanosoma cruzi* : variation in susceptibility of inbred strains of rats. *act. Trop.* 40:5.
13. Rodriguez, A.M., F. Santoro, D. Afchain, H. Bazin, and A. Capron. 1981. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect. Immun.* 31:524.
14. Damonneville, M., C. Auriault, C. Verwaerde, A. Delanoye, R. Pierce, and A. Capron. 1986. Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A) : role of IgE antibodies. *Clin. exp. Immunol.* 65:244.

15. **Darcy, F., D. Desleé, F. Santoro, H. Charif, C. Auriault, A. Decoster, V. Duquesne, and A. Capron.** 1988. Induction of protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 10:553.
16. **Ouaissi, M.A., A. Taibi, J. Cornette, P. Velge, B. Marty, M. Loyens, M. Esteva, F.S. Rizvi, and A. Capron.** 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitol.* 100:115.
17. **Gonçalves, M.F., E.S. Umezawa, A.M. Katzin, W. De Souza, M.J.M. Alves, B. Zingales, and W. Colli.** 1991. *Trypanosoma cruzi* : Shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72:43.
18. **Ouaissi, M.A., J.F. Dubremetz, J.P. Kusnierz, J. Cornette, M. Loyens, A. Taibi, B. Marty, P. Velge, F. Rizvi, and A. Capron.** 1990. *Trypanosoma cruzi* : Differential expression and distribution of an 85 kDa polypeptide by *in vitro* developmental stages. *Exp. Parasitol.* 71:207.
19. **Cerban, F., A. Gruppi, S. Gea, and E. Vottero-Cima.** 1991. IgG isotype profiles induced in mice by *Trypanosoma cruzi* electronegative antigens. *Int. Arch. Allergy App. Immunol.* 96:35.
20. **Cornette, J., Capron, A., and M.A. Ouaissi.** 1988. *Trypanosoma cruzi* : fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 86:139.
21. **Ouaissi, M.A., J. Cornette, and A. Capron.** 1986. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19:201.

22. **Piras, M.M., Piras, R., and D. Henriquez.** 1982. Changes in morphology and infectivity of cell-culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:67.
23. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and J.R. Randall.** 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 93:265.
24. **Merrifield, R.B.** 1963. Solid-phase peptide synthesis: the synthesis of tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149.
25. **Ouaissi, M.A., A. Taibi, M. Loyens, U. Martin, D. Afchain, C. Maidana, C. Caudioti, J. Cornette, A. Martelleur, P. Velge, B. Marty, and A. Capron.** 1991. *Trypanosoma cruzi* : A carbohydrate epitope defined by monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45:214.
26. **Krettli, A.U., P. Weisz-Carrington, and R.S. Nussenzweig.** 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice : strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* 37:416.
27. **Ouaissi, A., Aguirre, T., Plumas-Marty, B., Piras, M., Schöneck, R., Gras-Masse, H., Taibi, A., Loyens, M., Tartar, A., Capron, A., and R. Piras.** 1992. Cloning and sequencing of 24 kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol. Cell.* (in press)
28. **Webster, P., and W. R. Fish.** 1989. Endocytosis by African trypanosomes. II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting. *Eur. J. Cell Biol.* 49:303.
29. **Lizardi, P.M., Lerner, T.J., Gonzalez, A., and N. Nogueira.** 1985.

Expression in *Escherichia coli* of cDNA clone encoding a hypothetical calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. In cold Spring Harbor Vaccines 85, R.A. Lerner, R.M. Chanock and F. Brown eds pp 67-70, cold Spring Harbor Laboratory, New York.

30. Engman, D.M., Krause, K.H., Blumin, J.H., Kim, K.S., Kirchhoff, L.V., and J.E. Donelson. 1989. A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 264:18627.
31. Guillet, J.G., J. Hoebeke, R. Lengagne, K. Tate, F. Borras-Herrera, A.D. Strosberg, and F. Borras-Cuesta. 1991. Haplotype specific homology scanning algorithm to predict T-cell epitopes from protein sequences. *J. Mol. Recognition.* 4:17.
32. Scott, M.T., and M. Goss-Sampson. 1984. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. exp. Immunol.* 58:372.
33. Gruppi, A., M.C. Pistoresi-Palencia, B. Basso, and E. Vottero-Cima. 1990. Mouse IgE response against exoantigens of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92:56.
34. Okabe, K., T.L. Kipnis, V.L.G. Calich, and W.D. Da Silva. 1980. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi* I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopath.* 16:344.
35. Kipnis, T.L., S.L. James, A. Sher, and J.R. David. 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.

36. **Kierszenbaum, F.** 1979. Antibody-dependent killing of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leukocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28:965.
37. **Capron, A., and J.P. Dessaint.** 1988. Vaccination against parasitic diseases : Some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* 139:109.
38. **Andrews, N.W., and M.B. Whitlow.** 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:249.
39. **Velge, Ph., M.A. Ouaissi, J. Cornette, D. Afchain, and A. Capron.** 1988. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote collagen binding proteins : Possible role in cell-parasite interaction. *Parasitol.* 97:255.
40. **Trischmann, T.M.** 1980. *Trypanosoma cruzi*. Ability of T-cell-enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp. parasitol.* 49:225.
41. **Rodriguez, A.M., D. Afchain, F. Santoro, H. Bazin, and A. Capron.** 1983. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. *Parasitenkd.* 69:141.
42. **Roberson, E.L., W.L. Hanson, and W.L. Chapman.** 1973. *Trypanosoma cruzi* : effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34:168.
43. **Araujo, F.G.** 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. *Infect. Immun.* 57:2246.

44. **Minoprio, P., H. Eisen, L. Forni, M.R. D'imperio Lima, M. Joskowicz, and A. Coutinho.** 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I-Quantification of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* 24:661.
45. **Maleckar, J.R., and F. Kierszenbaum.** 1983. Inhibition of mitogen induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 130:908.
46. **Van Voorhis, W.C., and H. Eisen.** 1989. F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. exp. Med.* 169:641.
47. **Pestel, J., J.P. Defoort, H. Gras-Masse, D. Afchain, A. Capron, A. Tartar, and A. Ouaissi.** 1992. Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of an 85-kilodalton surface protein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infect. Immun.* 60:715.
48. **Peterson, D.S., R.A. Wrightsman, and J.E. Manning.** 1986. Cloning of a major surface antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature.* 322:566.

DISCUSSION-CONCLUSION

La maladie de Chagas qui résulte de l'infection par le parasite protozoaire *T. cruzi* connaît actuellement une extension non négligeable dans les pays d'endémie et hors zones d'endémie. Le parasite possède la capacité d'infecter différentes populations cellulaires. Sa pénétration dans la cellule hôte est précédée par une phase d'adhésion, dans laquelle des molécules de surface des deux compartiments parasitaire et cellulaire jouent un rôle déterminant.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude des protéines de surface des stades épimastigote et trypomastigote de *T. cruzi*, dans le but d'identifier des antigènes ayant des potentialités diagnostiques et/ou vaccinantes. En revanche, nos connaissances sur les antigènes de sécrétion du parasite sont très limitées.

Dans le présent travail, nous avons porté notre intérêt à l'étude des produits de sécrétion des trypomastigotes, formes infectantes du parasite, leurs potentialités diagnostiques et/ou vaccinantes.

A l'aide de sérums humains chagasiques, nous avons pu caractériser les immunogènes majeurs parmi les ESA. Ils correspondent à des composants de 160, 130 et un complexe de 80-110 kDa. Par la suite, nous avons pu montrer par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle que le complexe 80-110 kDa comporte en fait une série de composants ayant des pH_i différents (5,4 à 6,7). Des résultats comparables ont été décrits par ANDREWS et coll. (1984) concernant un composant de surface des trypomastigotes de 85 kDa. De plus, récemment KAHN et coll. (1990) ont réalisé le clonage par biologie moléculaire de ce

composant, et montrent qu'il y aurait au moins neuf molécules de 85 kDa exprimées à la surface du trypomastigote. Ces auteurs affirment que dans ce cas, il ne s'agit pas d'un processus de variation antigénique mais de l'existence d'une famille de gènes qui codent pour des protéines possédant à la fois des épitopes communs et des séquences différentes.

Une certaine similitude a été observée entre le profil des immunogènes majeurs de surface et des ESA. Ceci nous a conduit à réaliser deux types d'expériences :

- L'immunoprecipitation des antigènes de surface des trypomastigotes, avec des sérums humains chagasiques préincubés ou non avec une fraction non marquée d'ESA.
- L'utilisation de l'anticorps monoclonal 155D3 pour immunoprecipiter des antigènes de surface marqués à l'iode 125 et libérés dans le milieu de culture.

Les résultats de ces deux expériences suggèrent que certains antigènes de surface des formes trypomastigotes sont également sécrétés dans le milieu extérieur. Ces résultats se sont vus confirmés ultérieurement par d'autres auteurs (GONCALVES et coll. 1991). Ces derniers ont montré que ce phénomène de sécrétion dépend de la température et du temps d'incubation, alors qu'il est indépendant de la présence ou non de protéines ou de sérum dans le milieu. Par ailleurs, à travers des expériences réalisées sur quatre souches différentes de *T. cruzi* (Y, CA1, YuYu, RA), ces mêmes auteurs ont montré que dans tous les cas le composant de 85 kDa (Tc85) est libéré dans le milieu extérieur.

Il est certain que le diagnostic sérologique de la maladie de Chagas connaît certaines difficultés qui se traduisent de la manière suivante :

- un manque de spécificité qui s'explique par l'existence dans la même zone d'endémie, de parasitoses dues à d'autres agents pathogènes qui partagent certains déterminants antigéniques avec *T. cruzi*.
- un manque de sensibilité et risque de réactions faussement négatives observées essentiellement dans certains cas d'infection aiguë.

Il s'agit donc d'améliorer les techniques de diagnostic afin de pouvoir traiter à temps les individus atteints et de mieux contrôler la propagation de la maladie.

La suite de notre travail a consisté à étudier la possibilité de détection des ESA dans les sérums de patients chagasiques. Ainsi, dans un premier temps, une fraction IgG purifiée à partir d'un sérum de rat anti-85 kDa nous a permis dans un test ELISA de mettre en évidence dans les sérums humains chagasiques le composant parasitaire circulant libre ou complexé aux anticorps. Ce test nous a permis d'obtenir un taux de positivité de 81% et 98% pour les sérums provenant respectivement d'Argentine et de Bolivie. Dans ce contexte, il faut souligner également que par la technique d'immunoprécipitation des produits marqués à l'iode 131, FREILIJ et coll. (1987) ont déjà mis en évidence la présence de deux composants de 80 et 55 kDa dans les urines de patients en phase aiguë. Cependant,

aucun élément ne nous permet de faire la relation entre ces deux molécules et celles que nous avons détectées dans les sérum de malades chagasiqes.

Le test ELISA que nous avons décrit ci-dessus apporte effectivement des évidences sur la possibilité de détection de certains composants parasitaires dans les sérum de patients chagasiqes. Il reste cependant limité quant à son utilisation comme un test de routine puisqu'il nécessite la préparation permanente et régulière d'anticorps anti-85 kDa qui constitue l'outil indispensable à la détection de l'antigène parasitaire.

Ces dernières années, la production d'anticorps monoclonaux a permis d'aborder l'analyse immunologique des antigènes de surface et cytoplasmiques de *T. cruzi*, l'identification d'antigène(s) spécifique(s) de stade et/ou d'espèces (ANDREWS et coll. 1984, BEARD et coll. 1985). Ces outils ont permis également le développement de certaines techniques de diagnostic de la maladie de Chagas (LEMESRE et coll. 1986).

Dans ce contexte, en bénéficiant de l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-ESA, nous avons cherché à établir un test spécifique de diagnostic de cette affection. Cet anticorps monoclonal appelé VG3/G11 réagit vis-à-vis d'un épitope glycanique exprimé par un composant ES de 82-86 kDa. Son utilisation dans un test de capture permet de déceler des complexes immuns circulants IgM, IgG et IgA portant l'épitope réactif avec l'anticorps monoclonal, dans respectivement 84, 75 et 69% de sérum chagasiqes de phase aiguë. Cette forte positivité en complexes immuns circulants IgM serait vraisemblablement en

relation avec le niveau de parasitémie observée lors de la phase aiguë et pourrait éventuellement représenter un indicateur de la charge parasitaire. L'épitope glycanique reconnu par l'anticorps monoclonal pourrait constituer un marqueur de la phase aiguë de la maladie de Chagas.

Il est vrai que les techniques de diagnostic parasitologique (observation directe au microscope, xénodiagnostic, etc...) possèdent une sensibilité non négligeable. Cependant, elles ne sont pas très rapides et demandent parfois des niveaux de parasitémie élevés pour être sensibles. Dans ces conditions, le recours à des techniques sérologiques basées sur la détection d'anticorps devient indispensable. Récemment, certains auteurs suggèrent l'utilisation de protéines recombinantes ou de peptides synthétiques, qui permettent dans certains cas de classer les patients en fonction de leur état clinique symptomatique ou asymptomatique (VERGARA et coll. 1992, LORCA et coll. 1992). Cependant, l'efficacité de ces techniques se limite au dépistage de patients en phase chronique de la maladie.

Pendant la phase aiguë de l'infection, nous assistons au développement d'un phénomène d'immunosuppression caractéristique de cette affection. Dans ce cas, le diagnostic sérologique basé sur la détection d'anticorps spécifiques de *T. cruzi* n'est pas toujours fiable et présente de ce fait une sensibilité restreinte (LEMESRE et coll. 1986). Par conséquent, au vu des résultats que nous avons obtenus, le test de détection de complexes immuns circulants IgM (SCCA) pourrait être utilisé pour le diagnostic de la phase aiguë de la maladie. Il permettra également dans certains cas d'évaluer l'effet d'un traitement

chimiothérapeutique.

Il faut rappeler que dans certaines parasitoses, la détection d'antigène(s) parasitaire(s) ou de complexes immuns circulants dans les sérums ou les urines de malades a suscité une importance particulière. Dans le cas de la toxoplasmose, de hauts titres de complexes immuns spécifiques dont les immunoglobulines fixées sont d'isotypes IgG et IgM, ont été retrouvés dans les sérums humains ou d'animaux infectés (VAN KNAOPEN et coll. 1985). Des antigènes solubles et les anticorps correspondants ont également été détectés dans les urines d'individus atteints de leishmaniose viscérale (KOHANTEB et coll. 1987). D'autre part, dans le cas de certaines helminthiases telle que la filariose, la recherche de complexes immuns circulants dans les sérums de patients, permet dans certains cas de faire la distinction entre des sujets asymptomatiques et des patients symptomatiques (LUTCH et coll. 1988).

Enfin, il faut noter que le développement des techniques de détection d'antigènes ou de complexes immuns circulants, permettent parfois de distinguer entre une phase précoce et un état chronique d'une infection.

Toutes ces observations rendent compte de l'importance de l'étude des ESA. De plus, il ne s'agit pas de leur attribuer un rôle uniquement sur le plan diagnostic de certaines affections parasitaires. En effet, les ESA ont fait l'objet de nombreux travaux visant à identifier des composants potentiellement vaccinants. C'est le cas de *Schistosoma mansoni* où ces antigènes appelés SRP (schistosomula-released-products) sont capables d'induire par immunisation chez

le rat une protection significative (83%) après infection (DAMMONVILLE et coll. 1986). Le rôle des ESA dans le développement d'une immunité protectrice a également été montré dans le cas de *Toxoplasma gondii*. Ainsi, le transfert passif de sérum anti-ESA chez le rat Fischer nude induit un bon niveau de protection (DARCY et coll. 1988). Dans ce contexte, il nous a paru important d'étudier le rôle protecteur éventuel des ESA des formes trypomastigotes. Ainsi, des expériences d'immunisation ont été conduites en utilisant deux modèles expérimentaux : la souris BALB/c et le rat Fischer.

Les résultats obtenus chez la souris montrent une réduction très sensible au niveau de la parasitémie mais également de la mortalité en phase aiguë. 63% de souris immunisées ont survécu plus de 150 jours après infection avant d'être sacrifiées.

De la même manière, les expériences d'immunisation réalisées chez le rat ont permis d'obtenir un taux de protection significatif en terme de mortalité en phase aiguë. Dans ce cas, le paramètre de parasitémie n'a pu être exploité. En effet, dans les conditions d'expérience utilisées, les parasites ne sont détectables dans la circulation des rats qu'à partir du 25^{ème} jour environ après l'infection. De plus, nous avons remarqué que les rats meurent 24h à 48h après l'apparition des parasites sanguicoles. Cependant, il faut souligner que ce phénomène ne peut pas être généralisé à toutes les souches de rats puisque le niveau de parasitémie atteint en phase aiguë dépend de la souche de parasites, mais également de la souche, de l'âge et du sexe des animaux utilisés (RIVERA-VANDERPAS et coll. 1983).

L'immunité effectrice dans la maladie de Chagas a été pendant longtemps attribuée plutôt à la réponse humorale. Le rôle des anticorps lytiques a d'abord été décrit et considéré comme un mécanisme déterminant dans l'élimination des parasites (KRETTLI et coll. 1979). L'intervention des anticorps dans un phénomène d'ADCC avec diverses populations cellulaires (neutrophiles, éosinophiles, plaquettes etc...) a été également démontré (LOPEZ et coll. 1978, TAMBOURGI et coll. 1989, UMEKITA et MOTA 1989). Cependant, parmi les mécanismes de défense vis-à-vis du parasite, la participation de la réponse cellulaire est loin d'être négligeable (TRISHMANN 1983, 1984, ARAUJO 1989). Pour notre part, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'analyse de la réponse anticorps avec ses différentes composantes. Les sérums d'immunisation de souris et de rats présentent une activité lytique *in vitro* en présence du complément qui est de 71% et 32% respectivement. Ces anticorps jouent probablement un rôle important dans la destruction du parasite pendant l'infection. Cependant, ils ne constituent vraisemblablement pas le seul mécanisme effecteur efficace vis-à-vis de *T. cruzi*. En effet, certains travaux de transfert passif d'anticorps chez la souris montrent que le pouvoir protecteur d'un anticorps n'est pas forcément lié à son activité lytique (SEGURA et coll. 1986). Par ailleurs, d'autres auteurs ont montré que chez la souris, l'activité protectrice des anticorps serait portée par les isotypes IgG2a et IgG2b (TAKEHARA et coll. 1981, SCOTT et GOSS-SAMPSON 1984b). Dans le travail que nous avons mené, l'analyse des sous-classes IgG induites par immunisation avec les ESA chez le rat et la souris, montre une prédominance des IgG1 et IgG2b. Une réponse IgG2a et IgG2c est également obtenue dans le cas du rat. Les

sérum d'animaux immunisés réagissent vis-à-vis de deux composants majeurs de 85 et 24 kDa. Il faut souligner à ce niveau qu'il est tout à fait possible que la protection obtenue après immunisation avec les protéines natives, soit due en partie à la réponse immune induite par le composant de 85 kDa. De nombreux travaux ont déjà montré le rôle de la molécule de 85 kDa dans l'adhésion du parasite à la cellule hôte. Ce composant exprimé à la surface des trypomastigotes, possède une partie glycanique très immunogène représentant environ 40% de la molécule. De plus, certains auteurs indiquent que la capacité d'adhésion de cette glycoprotéine serait vraisemblablement liée à une structure glycanique. En effet, des études réalisées *in vitro*, ont déjà montré que des anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés vis-à-vis d'une partie glycanique de la molécule sont capables d'inhiber l'infection de cellules de mammifères. Aucun travail à l'heure actuelle n'a décrit l'implication d'une structure protéique de ce composant dans l'adhésion ou la pénétration du parasite dans la cellule hôte. D'autre part, certains auteurs ont déjà souligné le rôle de certains déterminants protéiques de la molécule plutôt dans l'induction d'une prolifération polyclonale B et T qui serait probablement responsable en partie de certains phénomènes pathologiques observés lors de l'infection (PESTEL et coll. 1992).

Il faut noter que dans le cas de *T. cruzi*, beaucoup de travaux ont été réalisés ces dernières années dans le but d'identifier des composants parasitaires ayant des potentialités protectrices. Cependant, à l'heure actuelle aucune structure protéique n'a été décrite pour son rôle protecteur contre l'infection.

Le criblage de la banque d'expression cDNA de trypomastigote avec les sérum de rat anti-ESA a permis d'identifier une série de clones codant tous pour une protéine de 24 kDa. Le séquençage de certains clones a été réalisé et la séquence obtenue a révélé une homologie d'environ 98,6% avec celle déjà décrite par d'autres auteurs (LIZARDI et coll. 1985). De plus, cette protéine présente une homologie significative avec des protéines fixant le calcium. Récemment, les travaux de ENGMAN et coll. (1989) ont montré que cette molécule possède effectivement la capacité de fixer le calcium et qu'elle s'exprimerait au niveau du flagelle. Ces mêmes auteurs suggèrent que cette protéine jouerait un rôle dans la motilité du parasite.

A l'aide de sérum anti-protéine recombinante, les travaux que nous avons réalisés en immunofluorescence indirecte et par microscopie électronique montrent que cette protéine est effectivement exprimée au niveau du flagelle dans le cas de la forme épimastigote. Cependant, cette molécule présente une localisation intracytoplasmique et en surface dans le cas du trypomastigote et de l'amastigote.

L'anticorps monoclonal Tcr7 nous a permis de purifier la protéine recombinante avec un degré de pureté très satisfaisant. Malheureusement, la faible quantité de protéines obtenues ne nous a pas permis de réaliser des expériences d'immunisation afin de pouvoir apprécier le pouvoir protecteur éventuel de cette molécule. Par conséquent, nous avons été amenés à adopter une stratégie peptidique.

Si la réponse humorale a longtemps été considérée comme jouant un rôle principal dans la résistance à l'infection, la réponse lymphocytaire T paraît essentielle et déterminante durant au moins les premières phases de l'infection (TRISHMANN 1984, TARLETON 1990). Par conséquent, dans la stratégie peptidique que nous avons développée, nous nous sommes basés pour le choix de la séquence peptidique à utiliser, sur la sélection de déterminants antigéniques susceptibles de représenter des épitopes B ou T.

Les cellules B reconnaissent généralement des structures antigéniques conformationnelles. L'identification des épitopes B obéit parfois à certains critères tels que la disponibilité à la surface de la molécule, la mobilité (TAINER et coll. 1984) ou l'hydrophilie (WESTHOFF et coll. 1984). Ainsi, les peptides synthétiques capables d'induire une réponse anticorps permettent parfois de confirmer la validité d'une certaine séquence protéique mais également d'identifier les protéines natives portant ces déterminants.

Il faut souligner cependant qu'à l'heure actuelle, les critères chimiques ou physico-chimiques caractérisant les épitopes T restent très discutés.

L'établissement d'une stratégie vaccinale demande l'orientation de la réponse immune vers des mécanismes bénéfiques pour l'hôte. Par conséquent, l'utilisation de peptides synthétiques, passe par l'analyse des différentes composantes du système immunitaire (populations lymphocytaires activées, lymphokines, isotypes et sous-classes d'anticorps produites, etc ...) mises en jeu par immunisation.

Dans ce contexte, il faut préciser que tous les anticorps produits lors d'une infection par *T. cruzi*, ne jouent pas forcément un rôle bénéfique pour l'hôte. CAVALESCO et PEREIRA (1988) ont clairement montré que des anticorps produits contre une protéine de *T. cruzi* à activité neuraminidase peuvent jouer en faveur du parasite et favoriser l'infection.

De la même manière, dans le modèle *Schistosoma mansoni*, le rôle des anticorps bloquants dans la modulation de la réponse effectrice a également été démontré. En effet, des anticorps monoclonaux de rat de sous-classes IgG2c, sont capables d'inhiber *in vitro* le phénomène d'ADCC médié par un anticorps monoclonal IgG2a en association avec des macrophages et des éosinophiles (GRZYCH et coll. 1984).

D'autre part, il faut rappeler que lors d'une infection, les lymphocytes T peuvent être responsables également du déclenchement de certains phénomènes pathologiques. MOSMANN et coll. (1986) ont montré que les lymphocytes T helper peuvent être divisés en deux sous-populations en fonction du profil des lymphokines sécrétées.

- Une sous-population T appelée Th1 qui sécrète de l'IL2 et de l'IFN γ .
- Une sous-population appelée Th2 qui ne produit pas d'IL2 ni de l'IFN γ , mais de L'IL4 et de l'IL5.

Dans le cas d'une infection par *Leishmania major* chez la souris, le rôle respectif de ces deux sous-populations dans la diminution de la pathologie et de l'exacerbation des lésions a déjà été démontré (SCOTT et coll. 1988, HEINZEL

et coll. 1989, MOSMANN et COFFMAN 1989).

Récemment, LIEW et coll. (1990) ont montré qu'un peptide de 10 acides aminés, dérivé d'une molécule (GP 63) de *Leishmania major* est capable d'induire par immunisation chez la souris BALB/c une exacerbation de la maladie, et d'activer préférentiellement la sous-population lymphocytaire Th2.

Dans le cas de *T. cruzi*, des populations lymphocytaires possédant des propriétés comparables ont été décrites (SPINELLA et coll. 1990, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ et coll. 1987). En revanche, dans ce cas il reste à identifier des molécules ou des déterminants antigéniques d'origine parasitaire capables d'orienter sélectivement la réponse immune vers l'une ou l'autre des deux sous-populations lymphocytaires. Néanmoins, l'existence d'un phénomène de prolifération polyclonale T et B à la fois en phase aiguë et chronique de la maladie est certaine (MINOPRIO et coll. 1986a, SPINELLA et coll. 1990). Récemment, PESTEL et coll. (1992) ont montré qu'un peptide de neuf acides aminés, dérivé d'un composant de 85 kDa exprimé à la surface des formes trypomastigotes, est capable d'induire par immunisation chez la souris une prolifération polyclonale T et B.

Les résultats des expériences de protection réalisées avec les peptides 20-40 et 109-124 montrent clairement que seul le peptide 109-124 est capable de conférer une protection significative. De plus, des expériences D'IFA réalisées sur les formes trypomastigotes et amastigotes montrent effectivement une bonne réactivité des sérums de souris anti-peptide 20-40 vis-à-vis de ces formes parasitaires, alors que la réaction est négative avec les sérums de souris

anti-peptide 109-124.

Ces résultats suggèrent que le peptide 109-124 serait un inducteur d'une réponse lymphocytaire T protectrice.

Il serait très intéressant d'étudier l'antigénicité de ce peptide chez des patients ou des animaux en phase aiguë et chronique de l'infection. Par ailleurs, l'analyse du profil des lymphokines produites par les cellules T anti-peptide 109-124 permettra de confirmer dans une certaine mesure le rôle de ce peptide dans la protection vis-à-vis de l'infection par *T. cruzi*.

Enfin, il serait capital d'examiner le rôle de ce peptide dans la réduction de la charge parasitaire mais également dans la diminution de la pathologie.

En conclusion, nos travaux s'inscrivent dans le cadre du développement de moyens de contrôle de la maladie de Chagas et de lutte contre le parasite responsable *T. cruzi*. Ces mesures passent par la mise en place de techniques de diagnostic adaptées aux différentes phases de l'infection, ainsi que la recherche de protéines parasitaires pouvant représenter des candidats vaccinants.

La technique que nous avons développée, basée sur la détection de complexes immuns circulants IgM, pourra être envisagée pour le dépistage des patients à des stades précoce de l'infection. Il est évident que des études réalisées sur le terrain avec l'utilisation d'un nombre de sérum plus important, permettra de mieux juger la validité de ce test.

Les ESA des formes trypomastigotes sont capables d'induire par immunisation chez le rat Fischer et la souris BALB/c un degré de protection significatif. Par la suite, nous avons réussi à cloner un composant ESA de 24 kDa. Il serait intéressant de sous-cloner cette molécule dans un vecteur d'expression à rendement élevé, afin de pouvoir disposer en quantité importante de cette protéine. Nous pourrions alors réaliser des expériences d'immunisation dans le but d'évaluer les capacités protectrices de la protéine recombinante.

La molécule de 24 kDa porte au moins un épitope protecteur correspondant au peptide 109-124. Celui-ci, par immunisation chez la souris induirait une réponse lymphocytaire T. Il importe de préciser à ce niveau que dans certains cas, la réponse immune vis-à-vis des peptides serait restreinte aux antigènes de

classe II du CMH, ce qui rend compte des limites d'utilisation des peptides synthétiques dans une stratégie vaccinale. Cependant, il est tout à fait possible de mettre au point des constructions peptidiques telles qu'elles soient antigéniques quelque soient les antigènes du CMH de l'individu. Une première alternative serait de tester différentes constructions en utilisant certains modèles expérimentaux (souris, rat, etc...) avec des haplotypes différents.

Enfin, l'on peut envisager l'utilisation de certains déterminants antigéniques issus de la molécule de 24 kDa en association avec des structures antigéniques appartenant à d'autres protéines protectrices (dont certaines sont en cours de clonage dans notre laboratoire) dans le but de mettre en place un vaccin multiprotéique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAHAMSHON, I. A. and W. D. DA SILVA.** 1977. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 75: 317
- ABUIN, G., W. COLLI, W. DE SOUZA and M. J. ALVES.** 1989. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc 85) is heterogenous in expression and molecular constitution. *Mol. Biol. Parasitol.* 35: 229
- ALVES, M. J. M., G. ABUIN, V. Y. KUWAJIMA and W. COLLI.** 1986. Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 21: 75
- ANDREWS, N. W., C. K. ABRAMS, S. L. SLATIN and G. GRIFFITHS.** 1990. A *T. CRUZI*-Secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61: 1277
- ANDREWS, N. W., A. KATZIN and W. COLLI.** 1984. Mapping of surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* by two dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity. *Eur. J. Biochem.* 140: 599
- ANDREWS, N. W., M. J. MANSO ALVES, R. I. SCHUMACHER and W. COLLI.** 1985. *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxysoralen-inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 60: 255
- ANDREWS, N. W. and M. B. WHITLOW.** 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 249
- ANSELMI, A., F. PIFANO, J. A. SUAREZ and O. GURDIEL.** 1966. Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic finding in chronic human and experimental chagas myocarditis. *Amer. Heart. J.* 72: 469
- ARAUJO, F. G.** 1982. Detection of circulating antigens of *Trypanosoma cruzi* by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76: 25
- ARAUJO, F. G.** 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on viable population of (L3T4⁺) T lymphocytes. *Infect. Immun.* 57: 2246
- ARAUJO, F. G., E. CHIARI and J. C. P. DIAS.** 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with acute Chagas' disease. *Lancet.*
- ARAUJO, F. G. and B. MOREIN.** 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi*

epimastigote antigens incorporated into Iscoms protects against lethal challenge in mice.
Infect. Immun. 59: 2909

AURIAULT, C., M. CAPRON and A. CAPRON. 1982. Activation of rat and human eosinophils by soluble factor(s) released by *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Cell. Immunol.* 66: 59

AURIAULT, C., M. A. OUASSI, G. TORPIER, H. EISEN and A. CAPRON. 1981. Proteolytic cleavage of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunol.* 3: 33

AVILA, A. H., D. S. SIGMAN, L. M. COHEN and R. C. MILLIKAN. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from blood lysates: diagnosis of chronic Chagas'disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 211

BEARD, C. A., R. A. WRIGHTSMAN and J. E. MANNING. 1985. Identification of monoclonal antibodies against the trypomastigote stage of *Trypanosoma cruzi* by use of iminobiotinylated surface polypeptides. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 199

BELTZ, L. A., M. B. SZTEIN and F. KIERSZENBAUM. 1988. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes Inhibition of IL-2 receptor expression. *J. Immunol.* 141: 289

BONGERTZ, V., K. HUNGEGER and B. GALVAO-CASTRO. 1981. *Trypanosoma cruzi*: circulating antigens. *Mem. Inst. Oswaldo cruz.* 76 (suppl): 71

BRENER, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347

BUA, J., E. J. BONTEMPI, M. J. LEVIN, A. ORN, D. VELASCO, M. MORENO, P. LEVI-YEYATI, A. ENGSTROM, E. L. SEGURA and A. A. RIUZ. 1991. *Trypanosoma cruzi*: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19-amino acid synthetic peptide. *Exp. Parasitol.* 72: 54

CAMARGO, M. E. 1976. Serologic diagnosis of Chagas' disease. *PAHO Scientific publication.* 318: 206

CAVALLESCO, R. and M. E. A. PEREIRA. 1988. Antibody to *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection in vitro and identifies a subpopulation of trypomastigotes. *J. Immunol.* 140: 617

- CERBAN, F., A. GRUPPI, S. GEA and E. VOTTERO-CIMA.** 1991. IgG isotype profiles induced in mice by two *Trypanosoma cruzi* electronegative antigens. *Int. Arch. Allergy App. Immunol.* 96: 35
- CERISOLA, J. A.** 1970. Immunodiagnosis of Chagas'disease: hemagglutination and immunfluorescence test. *J. Parasitol.* 56: 409
- CERISOLA, J. A., M. ALVAREZ and G. J. W. MARTINI.** 1980. Reaccion de aglutinacion de particulos de latex para el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos aires).* 40: 132
- CHAGAS, C.** 1911. Molestia de Chagas on tireoidite parazitaria Leuzinger, Rio de Janeiro.
- CHESS, Q., A. M. ACOSTA, J. K. SETHI and C. A. SANTOS-BUCH.** 1983. reversible acquisition of a host surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. *Inf. Immun.* 40: 299
- COSSIO, P. M., C. DIEZ, A. SZARFMAN, E. KREUTZER, B. CANDIOLo and R. M. ARANA.** 1974. Chagasic cardiomyopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which binds with endocardium and vascular structures. *Circulation.* 49: 13
- CULBERSON, J. T. and M. H. KOLODNY.** 1938. Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 24: 83
- D'IMPERIO LIMA, M. R., H. EISEN, P. MINOPRIO, M. JOSKOWICZ and A. COUTINHO.** 1986. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 137: 353
- D'IMPERIO LIMA, M. R., M. JOSKOWICZ, A. COUTINHO, T. KIPNIS and H. EISEN.** 1985. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 15: 201
- DAMONNEVILLE, M., C. AURIAULT, C. VERWAERDE, A. DELANOYE, R. PIERCE and A. CAPRON.** 1986. Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A) : role of IgE antibodies. *Clin. exp. Immunol.* 65: 224
- DARCY, F., D. DESLEE, F. SANTORO, H. CHARIF, C. AURIAULT, A. DECOSTER, V. DUQUESNE and A. CAPRON.** 1988. Induction of a protective

- immunity antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 10: 553
- DRAGON, E. A., V. M. BROTHERS, R. A. WRIGHTSMAN and J. MANNING.** 1985. A Mr. 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Mol. Biol. Parasitol.* 16: 213
- EISEN, H. and S. KAHN.** 1991. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: fantasy and reality. *Curr. Opin. Immunol.* 3: 507
- ENGMAN, D. M., K.H. KRAUSE, J. H. BLUMIN, K. S. KIM, L. V. KIRCHHOFF and J. E. DONELSON.** 1989. A novel flagellar calcium-binding protein in Trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 264: 18627
- FREILIJ, H. L., R. S. CORRAL, A. M. KATZIN and S. GRINSTEIN.** 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 25: 133
- GOLDENBERG, S., V. T. CONTRERAS, J. M. SALLES, M. P. A. L. FRANCO, M. C. BONALDO, D. VALLE, A. M. GONCALVES and C. L. MOREL.** 1983. Perspectives for vaccinations against Chagas'disease through biotechnology. II. Genes expression in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and cell free translation, of mRNA coding for relevant surface antigens. *New approaches to vaccine development. Proceeding of a meeting organized by the W.H.O..* 442
- GONCALVES, M. F., E. S. UMEZAWA, A. M. KATZIN, W. De SOUZA, M. J. M. ALVES, B. ZINGALES and W. COLLI.** 1991. *Trypanosoma cruzi*: shedding of surface antigens as membrane vesicles. *Exp. Parasitol.* 72: 43
- GONZALEZ, J., M. F. ARAGUTH and N. YOSHIDA.** 1991. Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90 kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Inf. Immun.* 58: 863
- GONZALEZ-CAPPA, S. M., N. H. VATTUONE, S. MENES and G. A. SCHMUNIS.** 1973. Humoral antibody response and Ig characterization of the specific agglutinins in rabbits during experimental American trypanosomiasis. *Exp. Parasitol.* 34: 32
- GOTTLIEB, M.** 1977. A carbohydrate-containing antigen from *Trypanosoma cruzi* and its detection in the circulation of infected mice. *J. Immunol.* 119: 465

- GRANT, I. H., J. W. M. GOLD, M. WITTNER, H. B. TANOVITZ, C. NATHAN, K. MAYER, L. REICH, N. WOLLNER, L. STEINHERZ, F. GHAVIMI, R. O'REILLY and D. ARMSTRONG.** 1989. Transfusion-associated acute Chagas' disease acquired in the United States. *Ann. Intrn. Med.* 111: 849
- GRUPPI, A., S. GEA, E. R. A. MORETTI and E. VOTTERO-CIMA.** 1989. Human antibodies against *Trypanosoma cruzi* exoantigens recognizing parasite surface antigens and heart tissue components. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 90: 119
- GRUPPI, A., M. C. PISTORESI-PALENCIA, B. BASSO and E. VOTTERO-CIMA.** 1990. Mouse IgE response against exoantigens of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92: 56
- GRZYCH, J. M., M. CAPRON, C. DISSOU and A. CAPRON.** 1984. Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental Schistosomiasis. *J. Immunol.* 133: 998
- GUERREIRO, C. and A. MACHADO.** 1913. De reacao de bordet e Gengou na molestia de Carlos Chagas como elemento diagnostico. *Bras. Med.* 27: 225
- HATCHER, F. M., R. E. KUHN, M. C. CERRONE and R. C. BURTON.** 1981. Increased natural killer cell activity in experimental American Trypanosomiasis. *J. Immunol.* 127: 1126
- HEINZEL, F. P., M. D. SADICK, B. J. HOLADAY, R. L. COFFMAN and R. M. LOCKSLEY.** 1989. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.* 169: 59
- HOFF, R.** 1974. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with ammonium chloride. *J. Parasitol.* 60: 527
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M., G. SAID, G. MILON, G. MARCHAL and H. EISEN.** 1987. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur. J. Immunol.* 17: 1027
- HUGHES, H. P.** 1988. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Immunol. Today.* 4: 340
- JOINER, K. A., W. D. DA SILVA, M. T. RIMOLDI, C. H. HAMMER, A. SHER**

- and T. L. KIPNIS.** 1988. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertase. *J. Biol. Chem.* 263: 11327
- KAHN, S., T. G. COLBERT, J. C. WALLACE, N. A. HOAGLAND and H. EISEN.** 1991. The major 85 kD surface antigen of the mammalian stage of *Trypanosoma cruzi* is a family of sialidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4481
- KAHN, S. A., W. C. VAN WOORHIS and H. EISEN.** 1990. The major 85 kDa surface antigen of the mammalian form of *Trypanosoma cruzi* is encoded by a large heterogenous family of simultaneously expressed genes. *J. Exp. Med.* 172: 589
- KATZIN, A. M., A. MARCIPAR, H. FREILIJ, R. CORRAL and J. F. YANOVSKY.** 1989a. Rapid determination of *Trypanosoma cruzi* urinary antigens in human chronic Chagas' disease by agglutination test. *Exp. Parasitol.* 68: 208
- KATZIN, A., M. J. M. ALVES, G. ABUIN and W. COLLI.** 1989b. Antigenuria in chronic chagasic patients detected by a monoclonal antibody raised against *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 341
- KHAN, I. A., K. A. SMITH and L. H. KASPER.** 1988. Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141: 3600
- KIERSZENBAUM, F., W. R. CUNA, L. A. BELTZ and M. B. SZTEIN.** 1990. Trypanosomal immunosuppressive factor (TIF): A secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* which inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 144: 4000
- KIERSZENBAUM, F. and M. M. HAYES.** 1980. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 708
- KIERSZENBAUM, F. and J. G. HOWARD.** 1976. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biziozi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116: 1208
- KOHANTEB, J., S. M. ARDEHALI and H. R. REZAI.** 1987. Detection of *Leishmania*

- donovani* soluble antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 578
- KOLODNY, M. H.** 1940. Studies on age resistance against trypanosome infections. VII. The influence of age upon the immunological response of rats to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Hyg.* 31: 1
- KRETTLI, A. U. and Z. BRENER.** 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116: 755
- KRETTLI, A. V., P. WEISZ_CARRINGTON and R. S. NUSSENZWEIG.** 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* 37: 416
- KUHN, R. E. and J. E. MURNANE.** 1977. *Trypanosoma cruzi*: immune destruction of parasitized mouse fibroblasts in vitro. *Exp. Parasitol.* 41: 66
- LEMESRE, J. L., D. AFCHAIN, O. OROZCO, M. LOYENS, F. S. BRENIERE, P. DESJEUX, Y. CARLIER, U. MARTIN, A. NOGUEIRA-QUEIROZ, D. LE RAY and A. CAPRON.** 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 86
- LEY, V., N. W. ANDREWS, E. S. ROBBINS and V. NUSSENZWEIG.** 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infection cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.* 168: 649
- LIEW, F. Y., S. M. MILLOTT and J. A. SCHMIDT.** 1990. A repetitive peptide of *Leishmania* can activate T helper type 2 cells and enhance disease progression. *J. Exp. Med.* 172: 1359
- LIZARDI, P., T. J. LERNER, A. GONZALEZ and N. NOGUEIRA.** 1985. Expression in Escherichia coli of a cDNA clone encoding a hypothetical calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Vaccines (Lerner, T.J., Chanock, C. and Brown, D.D., eds) Cold Spring Harbor Laboratory.* 67
- LOPEZ, A. F., M. M. BUNN MORENO and C. J. SANDERSON.** 1978. The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Int. J. Parasitol.* 8: 485

- LORCA, M., A. GONZALEZ, C. VELOSO, V. REYES and U. VERGARA.** 1992. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 44
- LUTSCH, C., J. Y. CESBRON, D. HENRY, J. P. DESSAINT, K. WANDJI, M. ISMAIL and A. CAPRON.** 1988. Lymphatic filariasis : detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. *Clin. exp. Immunol.* 71: 253
- MADEIRA, E. D., A. F. B. ANDRADE, M. M. BUNN-MORENO and M. BARCINSKI.** 1979. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: characterization of the effector cell from normal human blood. *Infect. Immunol.* 25: 34
- MALECKAR, J. R. and F. KIERSZENBAUM.** 1983. Inhibition of mitogen induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 130: 908
- MARCIPAR, A., S. BARNES, E. LENTWOJT and G. BROWN.** 1982. Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of *Trypanosoma cruzi*. *App. Biochem. Biotechnol.* 7: 459
- MARTINS, M. S., L. HUDSON, A. U. KRETTLI, J. R. CANCADOS and Z. BRENER.** 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 61: 343
- MAZINGUE, C., C. WALKER, W. DOMZIG and A. CAPRON.** 1987. Effect of schistosome-derived inhibitory factor on the cell cycle of T lymphocytes. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 83: 12
- McCABE, R. E. and B. T. MULLINS.** 1990. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. *J. Immunol.* 144: 2384
- MILES, M. A., P. D. MARDSEN, L. E. PETTIT, C. C. DRAPER, S. WATSON and S. K. K. SEAH.** 1979. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in monkeys. III. Electrocardiographic and histopathological finding. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73: 528
- MINOPRIO, P., H. EISEN, L. FORNI, M. R. D'IMPERIO LIMA, M.**

- JOSKOWICZ and A. COUTINHO.** 1986a. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I- Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand. J. Immunol.* 24: 661
- MINOPRIO, P., A. COUTINHO, M. JOSKOWICZ, M. R. D'IMPERIO LIMA and EISEN.** 1986b. Polyclonal lymphocyte response to *T. cruzi* infection.-II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 24: 669
- MINOPRIO, P., H. EISEN, M. JOSKOWICZ, P. PEREIRA and A. COUTINHO.** 1987. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice with anti-L3T4 antibodies. *J. Immunol.* 139: 545
- MINTER-GOEDBLOED, E.** 1978. The primary isolation by haemoculture of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* from animals and man. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 72: 22
- MOLINA, H. A. and F. KIERSZENBAUM.** 1989a. Eosinophil activation in acute and chronic chagasic myocardial lesions and deposition of toxic eosinophil granule proteins on heart myofibers. *J. Parasitol.* 75: 129
- MOLINA, H. A. and F. KIERSZENBAUM.** 1989b. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* *in vitro* causes bystander cardiac cell damage. *Immunology.* 66: 289
- MORETTI, E. R., B. BASSO and E. VOTTERO-CIMA.** 1985. Exoantigens of *Trypanosoma cruzi*. I. Conditions for their detection and immunogenic properties in experimental infections. *J. Protozool.* 32.
- MOSMANN, T. and R. COFFMAN.** 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functionnal properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145
- MOSMANN, T. R., H. CHEWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN and R. L. COFFMAN.** 1986. Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. *J. Immunol.* 136: 2348
- MUNIZ, J.** 1967. Contribuição para um melhor conhecimento da ação patogénica de *S. cruzi* no organismo humano. *Hospital (Rio de Janeiro).* 72: 676
- NICKERSON, P., P. ORR, M. L. SCHROEDER, L. SEKLE and J. B. JOHNSON.** 1989. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic

area. *Ann. Intern. Med.* 111: 851

NOGUEIRA, N., J. ELLIS, S. CHAPLAN and Z. COHN. 1981a. *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 51: 325

NOGUEIRA, N., S. CHAPLAN, M. RESSINK, J. TYDINGS and Z. A. COHN. 1981b. *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear monocytes phagocytes. *J. Immunol.* 128: 2142

NOGUEIRA, N. 1981c. *Typanosoma cruzi* surface antigens of blood and culture forms. *J. Exp. Med.* 153: 629

NOISIN, E. L. and F. VILLALTA. 1989. Fibronectin increases *Trypanosoma cruzi* amastigote binding to and uptake by murine macrophages and human monocytes. *Infect. Immun.* 57: 1030

OMS. 1988. Chagas' disease. In : Tropical Disease Research Ninth Programme Report. *Organisation mondiale de la santé, Genève.* 79: 84

ORTEGA-BARRIA, E. and M. E. A. PEREIRA. 1991. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. *Cell.* 67: 411

OUAISSE, M. A., D. AFCHAIN, A. CAPRON and J. A. GRIMAUD. 1984. Fibronectin receptor on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological functions. *Nature.* 308: 380

OUAISSE, M.A., J. CORNETTE, AND A. CAPRON. 1985. *Trypanosoma cruzi* : modulation of parasite-cells interaction by plasma fibronectin. *Eur. J. Immunol.* 15:1096

OUAISSE, M. A., J. CORNETTE and A. CAPRON. 1986a. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 201

OUAISSE, M. A., J. CORNETTE, D. AFCHAIN, A. CAPRON, H. GRAS-MASSE and A. TARTAR. 1986b. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science.* 234: 603

OUAISSE, M. A., A. TAIBI, J. CORNETTE, P. VELGE, B. MARTY, M.

- LOYENS, M. ESTEVA, F. S. RIZVI and A. CAPRON.** 1990. Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of a protective antigen. *Parasitol.* 100: 115
- PESTEL, J., J. P. DEFOORT, H. GRAS-MASSE, D. AFCHAIN, A. CAPRON, A. TARTAR and A. OUAISI.** 1992. Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of 85-Kilodalton surface protein of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Infect. Immun.* 60: 715
- PETERSON, D. S., R. A. WRIGHTSMAN and J. E. MANNIG.** 1986. Cloning of a major surface-antigen gene of *Trypanosoma cruzi* and identification of a nonapeptide repeat. *Nature.* 322: 566
- PETRY, K. and H. EISEN.** 1989. Chagas'disease: a model for the study of autoimmune disease. *Parasitol. today.* 5: 111
- PIRAS, M. M., R. PIRAS and D. HENRIQUEZ.** 1982. Changes in morphology and infectivity of cell culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6: 67
- PIZZI, T. P., D. M. RUBIO and T. F. KNIERIM.** 1953. Contribucion al conocimiento de los mecanismos immunitarios en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. *Bol. Inst. Parasit. Chile.* 8: 66
- PLATA, F., F. GARCIA-PONS and J. WIETZERBIN.** 1987. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 138: 397
- PLATA, F., J. WIETZERBIN, F. GARCIA PONS, E. FALCOFF and H. EISEN.** 1984. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Eur. J. Immunol.* 14: 930
- POWELL, M. R. and R. E. KUHN.** 1980. Measurement of cytolytic antibody in experimental Chagas' disease using a terminal radiolabeling procedure. *J. Parasitol.* 66: 399
- RAMOS, C., I. SCHÄDTLER-SIWON and L. ORTIZ-ORTIZ.** 1979. Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J.Immunol.* 122: 1243
- REED, S. G.** 1980. Adoptive transfert of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with

T-lymphocyte-enriched spleen cells. *Inf. Immun.* 28: 404

- REED, S. G., C. F. NATHAN, D. L. PIHL, P. RODRICKS, K. SHANEBECK, P. J. CONLON and K. H. GRABSTEIN.** 1987. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. *J. Exp. Med.* 166: 1734
- REED, S. G., D. L. PIHL and K. H. GRABSTEIN.** 1989. Immune deficiency in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. *J. Immunol.* 142: 2067
- REED, S. G., S. B. ROTERS and E. A. GOIDL.** 1983. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 131: 1978
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. and L. HUDSON.** 1980. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.* 40: 36
- RIVERA-VANDERPAS, M. T., A. M. RODRIGUEZ, D. AFCHAIN, H. BAZIN and A. CAPRON.** 1983. *Trypanosoma cruzi* variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Tropica.* 40: 5
- ROBERSON, E. L., W. L. HANSIN and W. L. CHAPMAN.** 1973. *Trypanosoma cruzi* : effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.* 34: 168
- RODRIGUEZ, A. M., D. AFCHAIN, F. SANTORO, H. BAZIN and A. CAPRON.** 1983. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. *Parasitenkd.* 69: 141
- RODRIGUEZ, A. M., F. SANTORO, D. AFCHAIN, H. BAZIN and A. CAPRON.** 1981. *Trypanosoma cruzi* infection in B cell deficient rats. *Infect. Immun.* 524
- ROTTENBERG, M. E., R. L. CARDONI, E. H. TITTO, M. MORENO and E. L. SEGURA.** 1988. *Trypanosoma cruzi*: immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp. Parasitol.* 65: 101
- RUIZ, A., M. ESTEVA, P. CABEZA MECKERT, R. P. LAGUENS and E.**

- SEGURA.** 1985. Protective immunity and pathology induced by inoculation with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 42: 299
- RUIZ, A. M., M. ESTEVA, A. RIARTE, E. SUBIAS and E. L. SEGURA.** 1986. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Lett.* 12: 1
- RUIZ, A. M., M. ESTEVA, E. SUBIAS, M. MORENO, A. ROSENSTEIN de CAMPANINI, E. VELAZQUEZ and E. L. SEGURA.** 1990. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 117
- RUSSO, M., N. STAROBINAS, R. RIBEIRO-DOS-SANTOS, P. MINOPRIO, H. EISEN and M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ.** 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11: 385
- RUSSO, M., N. STAROBINAS, P. MINOPRIO, A. COUTINHO and M. HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ.** 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann. Inst. Pasteur (Immunol.)*. 139: 225
- SANDERSON, C. J., M. M. BUNN MORENO and A. F. LOPEZ.** 1978. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* : the release of ^3H -labelled RNA, DNA and protein. *Parasitol.* 76: 299
- SCHARFSTEIN, J., M. M. RODRIGUES, C. A. ALVES, W. DE SOUZA, J. O. PREVIATO and L. MENDONCA-PREVIATO.** 1983. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J. Immunol.* 131: 972
- SCHECHTER, M., J. E. FLINT, A. VOLLMER, F. GUHL, C. J. MARINKELLE and M. A. MILES.** 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet.* 22: 939
- SCOTT, M. T.** 1981. The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered

- from acute infection. *Parasite Immunol.* 3: 209
- SCOTT, M. T., G. BAHR, F. MODDABER and D. AFCHAIN.** 1984a. Adjuvant requirements for protective immunization of mice using a *Trypanosoma cruzi* 90K cell surface glycoprotein. *Int. Archs. Allergy App. Immunol.* 74: 373
- SCOTT, M. T. and M. GOSS-SAMPSON.** 1984b. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients *Clin. exp. Immunol.* 58: 372
- SCOTT, M. T. and D. SNARY.** 1979. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein form *Trypanosoma cruzi*. *Nature.* 282: 73
- SCOTT, P., P. NATOVOTZ, R. L. COFFMAN, E. PEARCE and A. SHER.** 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.* 168: 1675
- SEAH, S. K. K., P. D. MARSDEN, A. VOLLER and L. E. PETTIT.** 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys : the acute phase. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 63
- SEGURA, E. L., J. BUA, A. ROSENSTEIN DE CAMPANINI, E. SUBIAS, M. ESTEVA, M. MORENO and A. M. RUIZ.** 1986. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*: complement-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Lett.* 13: 165
- SEGURA, E. L., C. VALQUEZ, A. BRONZINA, J. M. CAMPOS, J. A. CERISOLA and S. M. GONZALEZ CAPPA.** 1977. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. *J. Protozool.* 24: 540
- SEVER, J. L. and D. L. MADDEN.** 1977. Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for infectious agents. *J. infect. Dis.* 136 (suppl.): S257
- SNARY, D.** 1983a. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 126
- SNARY, D., M. A. J. FERGUSON, M. T. SCOTT and A. K. ALLEN.** 1981. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 3: 343

- SNARY, D. and L. HUDSON.** 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *Febs. Lett.* 100: 166
- SPINELLA, S., G. MILON and M. HONTBEYRIE-JOSKOWICZ.** 1990. A CD4+ Th2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 20: 1045
- STORNI, P. D., F. L. BOLSI and S. F. YANOVSKY.** 1975. Reaccion de aglutinacion directa para diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*. 35: 67
- SZTEIN, M. B., W. R. CUNA and F. KIERSZENBAUM.** 1990. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.* 144: 3558
- TAFURI, W.L., E.R. LOPES, E. CHAPADEIRO, H.L. MIZIARA, B.G. SANTOS and P. RASO.** 1983. Miocardite chagásica humana: provável agressão à célula cardiaca pelo granulocito eosinófilo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 16:122
- TAINER, J. A., E. D. GETZOFF, H. ALEXANDER, R. A. HOUGHTEN, A. J. OLSON and R. A. LERNER.** 1984. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein. *Nature*. 312: 127
- TAKEHARA, H. A., A. PERINI, M. H. DA SILVA and I. MOTA.** 1981. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* 52: 137
- TALIAFERRO, W. H. and T. PIZZI.** 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 96: 199
- TAMBOURGI, D. V., T. L. KIPNIS and W. D. DA SILVA.** 1989. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp. Parasitol.* 68: 192
- TANDON, A., H. ZAHNER and G. LAMMLER.** 1979. CELISA (Complement-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a new method for the estimation of complement fixing antibodies; its use for Chagas' disease. *Tropnmed. Parasitol.* 30: 189
- TARLETON, R. L.** 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144: 717

- TARLETON, R. L.** 1991. The role of T-cell subpopulation in experimental Chagas' disease. *Research in Immunol.* 142: 130
- TARRANT, C. J., E. H. FIFE and R. I. ANDERSON.** 1965. Serological characteristics and general chemical nature of the *in vitro* exoantigens of *T. cruzi*. *J. Parasitol.* 51: 277
- TEIXEIRA, A. R. L. and C. A. SANTOS-BUCH.** 1974. The immunology of experimental Chagas' disease : I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* 113: 859
- TEIXEIRA, A. R. L., M. L. TEIXEIRA and C. A. SANTOS-BUCH.** 1975. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *Am. J. path.* 80: 163
- TEIXEIRA, M. M. G. and N. YOSHIDA.** 1986. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 271
- TRISCHMANN, T., H. TANOWITZ, M. WITTNER and B. BLOOM.** 1978. *Trypanosoma cruzi* : role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45: 160
- TRISCHMANN, T. M.** 1983. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 130: 1953
- TRISCHMANN, T. M.** 1984. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Parasite Immunol.* 6: 561
- UMEKITA, L. F. and I. MOTA.** 1989. *In-vitro* lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasite Immunol.* 11: 561
- VAN KNAPPEN, F., S. O. PANGGABEAN and J. VAN LEUSDEN.** 1985. Demonstration of Toxoplasma antigen containing complexes in active toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 22: 645
- VAN VOORHIS, W. C. and H. EISEN.** 1989. Fl-160: a surface antigen from *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641
- VELGE, P., J. P. KUSNIERZ, A. OUASSI, B. MARTY, B. N. PHAM and A. CAPRON.** 1991. *Trypanosoma cruzi*: infection of T lymphocytes and their destruction by

- antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 21: 2145
- VELGE, P., M. A. OUAISSI, J. CORNETTE, D. AFCHAIN and A. CAPRON.** 1988. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction. *Parasitology*. 97: 255
- VERGARA, U., C. VELOSO, A. GONZALEZ and M. LORCA.** 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46: 39
- VRAY, B., P. DE BAETSELIER, A. OUAISSI and Y. CARLIER.** 1991. Trypanosoma cruzi but not *Trypanosoma brucei* fails to induce a chemiluminescent signal in a macrophage hybridoma cell line. *Inf. & Immu.* 59: 3303
- WEITZ, B.** 1960. The properties of some antigens of *Trypanosoma brucei*. *J. gen. Microbiol.* 23: 589
- WESTHOFF, E., D. ALTSCHUH, D. MORAS, A. C. BLOOMER, A. MONDRAGON, A. KLUG and M. H. V. VAN REGENMORTEL.** 1984. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature*. 311: 123
- WIRTH, J. J. and F. KIERSZENBAUM.** 1984. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 133: 460
- WOOD, J. N., L. HUDSON, T. M. JESSEL and M. YAMAMOTO.** 1982. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature (Lond.)*. 296: 34
- ZWEERINK, H. J., H. D. WESTON, O. F. ANDERSEN, S. S. GARBER and E. C. HAYES.** 1984. Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three trypomastigotes polypeptides. *Inf. Immun.* 46: 826

TABLE DES MATIERES

| | Page |
|--|-------------|
| RESUME | 13 |
| ABREVIATIONS | 15 |
| INTRODUCTION | 16 |
| GENERALITES SUR LA MALADIE DE CHAGAS | 19 |
| I. QU'EST CE QUE LA MALADIE DE CHAGAS ? | 20 |
| I.1. Qui a découvert la maladie de Chagas ? | 21 |
| I.2. Cycle évolutif | 21 |
| I.3. Morphologie | 24 |
| I.4. Souches de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 25 |
| I.5. Mode de transmission | 26 |
| I.6. Moyens de lutte et traitement | 28 |
| I.6.1. Lutte anti-vectorielle | 28 |
| I.6.2. Traitement | 28 |

| | |
|--|-----------|
| I.7. Symptomatologie | 29 |
| I.7.1. Phase aiguë | 29 |
| I.7.2. Phase chronique | 30 |
| I.8. Les modèles expérimentaux | 33 |
| | |
| II. DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE CHAGAS | 36 |
| | |
| II.1. Diagnostic par la recherche du parasite | 38 |
| II.1.1. L'observation directe au microscope | 38 |
| II.1.2. Le xénodiagnostic | 38 |
| II.1.3. L'hémoculture | 39 |
| | |
| II.2. Diagnostic sérologique | 40 |
| II.2.1. Réaction de fixation du complément | 40 |
| II.2.2. Réaction d'agglutination directe | 40 |
| II.2.3. Réaction d'hémagglutination indirecte | 41 |
| II.2.4. Réaction d'immunofluorescence | 42 |
| II.2.5. Agglutination des particules de latex après sensibilisation avec de l'antigène parasitaire | 42 |
| II.2.6. La réaction d'ELISA | 43 |

III. LES ANTIGENES DE *TRYPANOSOMA CRUZI*
JOUANT UN ROLE DANS L'ADHESION DU
PARASITE A LA CELLULE HOTE ET DANS
L'INDUCTION D'UNE IMMUNITE PROTECTRICE 46

| | |
|---|-----------|
| III.1. Les composants de <i>Trypanosoma cruzi</i> jouant un rôle dans l'adhésion | 48 |
| III.2. Les antigènes à potentialités vaccinantes | 50 |
| III.2.1. Les antigènes membranaires | 51 |
| III.2.2. Les antigènes flagellaires | 53 |
| III.2.3. Les antigènes d'excrétion-sécrétion | 55 |
| III.3. Stratégie vaccinale | 58 |
| IV. IMMUNITE A <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> | 62 |
| IV.1. Immunité naturelle | 63 |
| IV.2. Immunité associée à l'infection | 63 |
| IV.2.1. Immunité humorale | 64 |
| IV.2.1.1. Implication des anticorps dans la résistance à l'infection | 64 |

| | |
|---|-----------|
| IV.2.1.2. Mécanisme d'action des anticorps | 65 |
| | |
| IV.2.2. Immunité cellulaire | 67 |
| IV.2.2.1. Rôle des lymphocytes T | 67 |
| IV.2.2.2. Rôle du macrophage | 71 |
| | |
| V. MECANISMES D'EVASION | |
| ET IMMUNOPATHOLOGIE | 73 |
| | |
| V.1. Mécanismes d'évasion | 74 |
| | |
| V.2. Immunopathologie | 78 |
| V.2.1. Existe t-il une réactivité croisée entre des antigènes parasitaires et des composants de l'hôte ? | 79 |
| V.2.2. Activation polyclonale | 82 |
| | |
| TRAVAUX PERSONNELS | 85 |
| | |
| <u>ARTICLE 1</u> | |
| Caractérisation des immunogènes majeurs de surface et dans les antigènes d'excrétion-sécrétion des formes trypomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 87 |

ARTICLE 2

- Trypanosoma cruzi* : un épitope glycanique
défini par un anticorps monoclonal comme marqueur
possible de la phase aiguë de la maladie de Chagas 100

ARTICLE 3

- Trypanosoma cruzi* : immunité induite chez
la souris et le rat par les antigènes excrétés-sécrétés et
identification d'une séquence peptidique ayant une activité protectrice ... 114

DISCUSSION-CONCLUSION 160

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 177

TABLE DES MATIERES 195

