

50376
1992
182

61303

50376
1992
182

N° d'ordre: 948

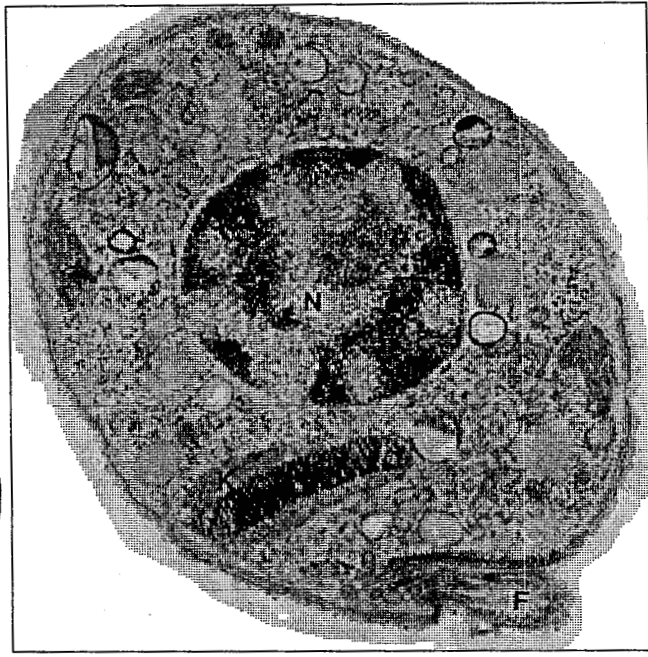
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Thèse de **ETOURNER LE**
Présentée à l'Université de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Béatrice PLUMAS-MARTY



**CARACTERISATION et CLONAGE MOLÉCULAIRE
d'ANTIGÈNES PROTECTEURS lors de l'INFECTION
EXPÉRIMENTALE de la SOURIS par le PARASITE
*TRYPANOSOMA CRUZI***

Présentée le 29 juin 1992 devant la commission d'examen:

- Président : M. VERBERT
- Rapporteurs : Mme DISSOUS
- M. OUAISSI
- Examineurs : M. CAPRON
- M. PAYS
- M. RIZVI
- M. STRECKER

Je dédie cette thèse,

à Joël

à mes parents et beaux-parents

à ma famille

à Pascale, Sylvie et Jean-Michel

à tous mes amis

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, Unité Mixte INSERM U167 - CNRS 624, 1 rue du Pr. A. Calmette, sous la direction de Monsieur le Professeur André CAPRON, dans le groupe de recherches sur le parasite *Trypanosoma cruzi*, animé par Monsieur le Docteur Ali OUAISSI. Le groupe "Service de Chimie des Biomolécules, CNRS-URA 1309" dirigé par le Monsieur le Professeur André TARTAR a également collaboré à ces travaux.

Le Ministère de la Recherche et de la Technologie, ainsi que la Fondation Marcel MERIEUX, ont participé au financement de cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier:

Monsieur le Professeur CAPRON qui m'a accueillie avec bienveillance, conseillée et encouragée avec clairvoyance et enthousiasme tout au long de ces années passées dans son laboratoire. Que ce travail soit le témoignage de tout mon respect et ma gratitude.

Madame le Docteur DISSOUS qui a bien voulu prendre de son temps afin de corriger les articles et faire partie de ce jury. Qu'elle soit assurée de toute ma sympathie.

Monsieur le Professeur VERBERT qui a bien voulu accepter de présider cette thèse. Qu'il me soit permis de lui exprimer ici toute mon estime.

Monsieur le Docteur OUAISSI qui m'a fait profiter de ses connaissances sur la maladie de Chagas. Qu'il veuille trouver ici l'expression de mes remerciements.

Monsieur le Docteur RIZVI qui m'a fait découvrir la recherche au cours de mon année de DEA et me fait aujourd'hui un très grand plaisir en acceptant de juger cette thèse. Qu'il soit assuré de toute mon amitié.

Monsieur le Docteur PAYS qui s'est intéressé à mon travail lors d'une réunion scientifique et a bien voulu le juger. Qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur STRECKER qui a tout de suite accepté de faire partie de ce jury. Qu'il en soit ici chaleureusement remercié.

C'est avec une disponibilité constante et un enthousiasme communicatif que Claudie Verwaerde m'a guidée et encouragée dans les moments les plus difficiles. Je tiens à l'en remercier chaleureusement et à lui exprimer ici l'assurance de toute mon amitié.

Je tiens également à remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidée, conseillée et encouragée tout le long de ces dernières années.

Josette, Daniel, Marie-France, Jean-Yves, Colette, Raymond, Ali, Ralf, Philippe, Jean-Loup, Jean-Pierre, Christian, Valérie, Marco, Isabelle, Laurence, Geneviève, Catherine, Bob, Jackelyne Cécile, Odile.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail,

un grand MERCI !!

*Que l'importance soit dans ton regard
et non dans la chose regardée.*

André GIDE

**PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS**

PUBLICATIONS

=====

RIZVI, F.S., OUAISSI, M.A., MARTY, B., SANTORO, F. & CAPRON, A. (1988) The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *Eur. J. Immunol.*, 18: 473.

OUAISSI, M. A., TAIBI, A., CORNETTE, J., VELGE, P., MARTY, B., LOYENS, M., ESTEVA, M., RIZVI, F.S. & CAPRON, A. (1990) Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology*, 100: 115.

OUAISSI, M.A., DUBREMETZ, J.F., KUSNIERZ, J.P., CORNETTE, J., LOYENS, M., TAIBI, A., MARTY, B., VELGE, P., RIZVI, F.S. & CAPRON, A.(1990) *Trypanosoma cruzi* : differential expression and distribution of an 85 kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Exp. Parasitol*, 71: 207.

MARTIN, U.O., TAIBI, M.A., LOYENS, M., MAIDANA, C., CORNETTE, J., CANDIOTI, C., MARTELEUR, A., AFCHAIN, D., VELGE, P., MARTY, B., CAPRON, A. & OUAISSI, M.A.(1990) *Trypanosoma cruzi*: IgM antibodies to a 85 KDa polypeptide epitope as a possible marker of the acute phase of Chagas'disease. *Med. Sci. Res.*, 18: 725.

OUAISSI, A., TAIBI, A., LOYENS, M., MARTIN, U., AFCHAIN, D., MAIDANA, C., CAUDIOTI, C., CORNETTE, J., MARTELLEUR, A., VELGE, P., MARTY, B. & CAPRON, A.(1991) *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of the human Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 45: 214.

VELGE, P., KUSNIERZ, J.P, OUAISSI, A., MARTY, B., PHAM, B.N. & CAPRON, A.(1991) *Trypanosoma cruzi*: infection of T lymphocytes and their destruction by antibody cell-mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 21: 2145.

PLUMAS-MARTY, B., VERWAERDE, C., LOYENS, M., VELGE, P., CESBRON, M.F., TAIBI, A., CAPRON, A. & OUAISSI, A.(1992) Glutathione-binding-proteins of *Trypanosoma cruzi*: immunogenicity during natural and experimental Chagas'disease. *Parasitology*, 104: 87.

OUAISSI, A., AGUIRRE, T., PLUMAS-MARTY B., PIRAS, M., SCHONECK, R., GRAS-MASSE, H., TAIBI, A., LOYENS, M. TARTAR, A., CAPRON, A. & PIRAS, R. Cloning and sequencing of a 24 kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen defined by a monoclonal antibody. Sous presse dans *Biology of the Cell*.

PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A., PESSOA, H., LOYENS, M., VERWAERDE, C., POMMIER, V., VELGE, P., OUAISSI, A. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: Protection induced by native

proteins in experimental model and analysis of the antibody response. Soumis.

PLUMAS-MARTY, B., SCHÖNECK, R., TAIBI, A., PLUMAS, J., VERWAERDE, C., LOYENS, M. POMMIER, V., GRAS-MASSE, H., DIESIS, E., TARTAR, A., CAPRON, & OUAISSI, A. Molecular cloning of *Trypanosoma cruzi* proteins of 30 and 25 kDa homologous to elongation factors 1 β . Soumis.

TAIBI, A., **PLUMAS-MARTY, B.**, PESSOA, H., LOYENS, M., CAPRON, A. & OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi*: immunity induced in mice and rats by trypomastigotes excretory secretory antigens. Soumis.

VELGE, P., **PLUMAS-MARTY, B.**, PHAM, B.N., OUAISSI, A. & CAPRON, A. Fibronectin promotes attachment to without promoting *Trypanosoma cruzi* penetration into T lymphocytes: CD3 marker is involved in the penetration step. Soumis.

PARTICIPATION à des CONGRES

=====

RIZVI, F.S., **MARTY, B.**, OUAISSI, M.A. & CAPRON, A. A new mechanism of *Leishmania* -host cell interaction. Présenté au Congrès Commun à la Société Britanique d'Immunologie et la Société Française d'Immunologie, à Paris en Avril 1988. (CO)

OUAISSI, M.A., CORNETTE, J., RIZVI, F.S., **MARTY, B.**, VELGE, P. &

CAPRON, A. Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas'disease. Présenté au Congrès Commun à la Société Britannique d'Immunologie et la Société Française d'Immunologie, à Paris en Avril 1988. (CO)

OUAISSI, M.A., TAIBI, A., DUBREMETZ, J.F., MARTY, B., CORNETTE, J., LOYENS, M., VELGE, P., KUSNIERZ, J.P., RIZVI, F.S. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* : Differential expression and distribution of the 85 kDa polypeptide by *in vitro* developmental stages. Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz. Suppl. II, vol. 84.(1989) (CO)

OUAISSI, M.A., CORNETTE, J., MARTY, B., VELGE, P., TAIBI, A. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: des fragments de clivage de la fibronectine induisent une différenciation des trypomastigotes *in vitro*. Présenté au VIIème Congrès International de Parasitologie, à Paris au mois d'Août 1990. (P)

MARTY, B., OUAISSI, M.A., CESBRON, M.F., PLUMAS, J. & CAPRON, A. Identification et caractérisation de molécules de *Trypanosoma cruzi* fixant le glutathion. Présenté au VIIème Congrès International de Parasitologie, à Paris au mois d'Août 1990. (P)

PLUMAS-MARTY.B., TAIBI, A., PESSOA, H., OUAISSI, A. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* glutathione binding proteins: protection against murine lethal infection. Présenté en Décembre 1991 au "Trypanosomiasis seminar" à Anvers (Belgique) (CO)

TAIBI, A., PLUMAS-MARTY, B., PESSOA, H., LOYENS, M., CAPRON, A. & OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi*: immunity induced in mice and rats by trypomastigotes excretory secretory antigens. Présenté en Décembre 1991 au "Trypanosomiasis seminar" à Anvers (Belgique) (P)

SCHONECK, R., PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A., LOYENS, M., CAPRON, A. & OUAISSI, A. Identification of *Trypanosoma cruzi* proteins with acetylcholinesterase activity. Présenté en Décembre 1991 au "Trypanosomiasis seminar" à Anvers (Belgique) (P)

OUAISSI, A., CORNETTE, J., PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A., VELGE, P., SCHONECK, R. & CAPRON, A. Molecular aspects of *Trypanosoma cruzi* interaction with host cell and parasite differentiation mechanisms. Présenté en Décembre 1991 au "Trypanosomiasis seminar" à Anvers (Belgique) (CO)

PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A., PESSOA, H., LOYENS, M., OUAISSI, A. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immune protection induced by native proteins and analysis of antibody response. Présenté en Septembre 1992 au "VI European Multicolloquium of Parasitology", à La Haye, Pays-Bas. (CO)

(P)= poster

(CO)= communication orale

SOMMAIRE

RESUME	P.14
ABREVIATIONS	P.16
GENERALITES	P.18
TRAVAUX PERSONNELS	P.119
DISCUSSION	P.200
REFERENCES	P.217
TITRE DES FIGURES	P.259
TABLE DES MATIERES	P.261

RÉSUMÉ

RESUME.

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine est causée par le parasite *Trypanosoma cruzi*. Il n'existe à ce jour ni traitement satisfaisant ni vaccin pour lutter contre cette parasitose. Au cours de ce travail, nous avons caractérisé trois molécules du stade épimastigote de *Trypanosoma cruzi* se fixant à une colonne de glutathion (TcGBP). Ces holoprotéines spécifiques de *Trypanosoma cruzi*, de poids moléculaire 45, 30, et 25 kDa, sont exprimées par tous les stades parasitaires et sont immunogènes au cours des infections chagasiques naturelle et expérimentale. Leur expression est augmentée en présence de phénobarbital. Injectées en présence de *Bordetella pertussis* et d'alun, elles sont capables de protéger des souris contre une infection létale de trypomastigotes, alors qu'administrées avec de l'adjuvant de Freund, elles n'induisent pas d'immunité protectrice. Seuls les sérums des animaux immunisés par les trois protéines TcGBP, injectées en présence de *Bordetella pertussis* et d'alun, sont capables de lyser des parasites vivants. De plus, seuls ces sérums présentent des taux significatifs d'IgG2a, IgG2b et IgE spécifiques. Ces résultats montrent que ces molécules sont potentiellement protectrices et que les anticorps spécifiques IgG2a, IgG2b et IgE, pourraient être impliqués dans la protection observée. Les protéines de 25 et 30 kDa ont été ensuite clonées et séquencées. Elles sont codées par une famille de gènes très proches et transcrites par deux ARNs de taille différente. Ces protéines ne possèdent pas d'homologie significative avec d'autres glutathion S-transférases déjà clonées, mais avec des facteurs d'élongation de type 1 bêta, impliqués dans la régulation de la synthèse des protéines. Aux vues de ces observations, nous discutons du rôle possible de ces antigènes dans la biologie du parasite, ainsi que de l'orientation à apporter à notre stratégie vaccinale.

ABRÉVIATIONS

Abréviations

ADCC:	cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADP:	adénosine diphosphate
Al:	alun
AMPC:	adénosine monophosphate cyclique
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adénosine triphosphate
BCG:	bacille de Calmette et Guérin
Bp:	<i>Bordetella pertussis</i>
CD:	" cluster" de différenciation
ConA:	concanavaline A
CTL:	lymphocyte T cytotoxique
GMCSF:	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GP:	glycoprotéine
GST:	glutathion S-transférase
IFN:	interféron
Ig:	immunoglobuline
IL1...IL10:	interleukine 1...10
IL2(R)	récepteur de l'IL2
kb:	kilobase
kDa ou kD:	kilodalton
PHA:	phytohémagglutinine
TNF:	tumor necrosis factor
Tc:	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcGBP:	<i>Trypanosoma cruzi glutathione binding proteins</i>
VSG:	variable surface antigen
WGA:	wheat germ agglutinin

GÉNÉRALITÉS

INTRODUCTION

La **vaccination** et l'immunisation ont précédé l'utilisation des traitements pour combattre les maladies infectieuses. Dès le 5^e siècle avant Jésus-Christ, en Grèce, on savait déjà que la guérison de la variole ou de la peste rendait les individus résistants à la réinfection et que cette résistance était spécifique.

Il est difficile de dater les débuts des **pratiques d'immunisations**, mais il y a 2500 ans, les Chinois inhalaient une poudre de "croutes" de variole pour se protéger contre la maladie, et dès le 17^e siècle, l'injection de matériels issus de lésions actives servait de mesures prophylactiques contre cette maladie.

De la même manière l'immunisation contre la leishmaniose cutanée est très ancienne et d'ailleurs subsiste encore de nos jours.

Les travaux de **Jenner** et plus tard de **Pasteur** ont conduits au développement des premiers vaccins modernes, basés sur l'utilisation de bactéries ou de virus atténués, ayant permis d'éradiquer la variole, et de réduire la prévalence de la poliomyélite et de la tuberculose.

Aujourd'hui, si **50% des enfants** du globe sont immunisés contre ces maladies mais également contre la diphtérie, la coqueluche, la rougeole et le tétanos, il faut quand même rappeler que les **maladies infectieuses** parasitaires et non-parasitaires provoquent encore chaque année la **mort de millions d'entre eux** principalement dans les pays en voie de développement.

Les maladies parasitaires ont jusqu'ici posé d'insurmontables problèmes aux parasitologistes et aux immunologistes. En effet, les seuls vaccins anti-parasitaires commercialisés sont une préparation anti-coccidies chez le poulet, des vaccins

anti-*Babésia* , anti-*Theileria* et anti-*Dictyocaulus*, chez le bétail. Chez l'homme, seul un vaccin anti-leishmaniose cutanée composé de parasites tués est disponible. Si l'on essaye de comprendre pourquoi un si petit nombre de vaccins anti-parasitaires sont opérationnels, on peut remarquer que d'une part les parasites possèdent, à l'inverse des virus et des bactéries, une **grande** quantité de protéines, glycoprotéines et glycolipides à leur surface. D'autre part, du fait de la **complexité de leur cycle évolutif**, avec en particulier la présence de divers stades exprimant des antigènes pouvant être différents, les parasites représentent pour leurs hôtes des "**cibles mouvantes**" à laquelle ils doivent répondre par plusieurs contre-attaques immunologiques. Enfin, les parasites ont évolué en acquérant des moyens sophistiqués qui leur permettent d' **échapper** aux réponses immunes de l'hôte.

Les premières vaccinations emprises d'un certain **empirisme**, furent mises au point avec succès. Cependant, il est tentant de penser qu'aujourd'hui la **meilleure connaissance** à la fois du système immunitaire, de la biologie des parasites, et des adjuvants, alliée à l'utilisation des outils offerts par les nouvelles technologies bio-médicales, pourront contribuer à l'élaboration de stratégies qui permettront de mettre un frein au développement de certaines infections parasitaires. Comme tous les nouveaux vaccins, les futurs vaccins parasitaires pourront être soit recombinants, synthétiques ou encore anti-idiotypiques. Certains d'entre eux, utilisant des protéines purifiées ou recombinantes sont actuellement en voie de développement, en particulier dans le domaine de la **schistosomiase** (CAPRON A et coll.,1989).

Le **continent sud américain** est touché par plusieurs maladies parasitaires, dont la leishmaniose, la malaria, la filariose, l'onchocercose, la

schistosomiase, ainsi que la **maladie de Chagas** ou trypanosomiase américaine. Nous nous sommes intéressés à cette dernière maladie dans le but d'identifier des molécules potentiellement protectrices. Ceci représentait à bien des titres une gageure, puisque jusqu'ici d'énormes problèmes sociaux-politiques aussi bien que scientifiques tendaient à minimiser les recherches vaccinales sur cette protozoose dont il n'existe pourtant aucun traitement satisfaisant.

Dans la partie qui va suivre, nous allons présenter **les caractéristiques principales** de la maladie de Chagas, ainsi que **la stratégie** que nous avons entreprise dans le but non pas de mettre au point un vaccin, mais au moins d'en ébaucher une esquisse.

1. PRESENTATION de la MALADIE .

A. Historique.

En 1909, alors que Carlos CHAGAS se trouvait à Lasance à 500 km de Rio de Janeiro afin de combattre une épidémie de paludisme, il découvrit dans le tube digestif d'un insecte hématophage un nouveau trypanosome (**Fig.1**), qu'il nomma *Schizotrypanum* puis *Trypanosoma cruzi*, en l'honneur d'Oswaldo CRUZ (CHAGAS C,1909). A lui seul, CHAGAS détermina dans les années qui suivirent les transmetteurs, les réservoirs, ainsi que les formes cliniques de la maladie parasitaire qui porte son nom (CHAGAS C,1911), la maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine en raison de sa prévalence sur le continent sud américain.

B. Agent de la maladie.

Trypanosoma cruzi est un protozoaire flagellé, de la classe des *Zoomastigophorea*, de l'ordre des *Kinetoplastida*, du sous-ordre des *Trypanosomatidae*, et du genre des *Schizotrypanum* (LEVINE ND et coll.,1980).

C. Transmission de la maladie.

Les **Réduvidés** sont les transmetteurs naturels du parasite. Ils appartiennent à l'ordre des Hémiptères, famille des Réduvidés, sous-famille des Triatominae. La trypanosomiase américaine affectait à l'origine des animaux et était transmise par des triatomes sylvatiques. D'un point de vue évolutif, il faut

EXTRAITS DE LA PUBLICATION DE CARLOS CHAGAS EN 1909

Nova tripanozomiaze humana.

Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp.,
agente etiologico de nova entidade morbida do homem

pelo

Dr. Carlos Chagas,

Assistente.

(Estampas 9 a 13 e 10 figuras no texto)

Ueber eine neue Trypanosomiasis des Menschen.

Studien über Morphologie und Entwicklungszyklus des *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp.,
Erreger einer neuen Krankheit des Menschen

von

Dr. Carlos Chagas,

Assistenten.

(Mit Tafeln 9-13 und 10 Textfiguren)

Introdução.

Em 1907 fomos incumbido pelo diretor Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, de executar a campanha anti-palúdica nos serviços de construção da Estrada de Ferro Central do Brazil, na região norte do Estado de Minas Geraes. Tivemos informações da existencia ali do hematofago, denominado *barbeiro* pelos naturais da zona, que habita os domicilios humanos, atacando o homem á noite, depois de apagadas as luzes, ocultando-se, durante o dia, nas frestas das paredes, nas coberturas das cazas, em todos os esconderijos, enfim, onde possa encontrar guarida. De regra, é o hematofago visto em maior abundancia nas habitações pobres, nas choupanas de paredes não rebocadas e cobertas de capim. Ali a reprodução d'elle é consideravel; são encontrados em numero imenso nas frestas das paredes e constituem condição anti-vital das mais notaveis, pela dificuldade trazida ao repouzo do homem. Muita vez verificámos o ataque do homem pelo hematofago: Poucos minutos após a extinção da luz nos apo-

Einleitung.

Im Jahre 1907 wurde ich von Dr. OSWALDO GONÇALVES CRUZ, Leiter des Institutes von *Manguinhos* beauftragt, die Bekämpfung der Malaria bei der Konstruktion der brasilianischen Zentralbahn im Norden des Staates *Minas Geraes* zu organisieren. Dasselbst hörte ich von dem Vorkommen eines gefürchteten blutsaugenden Insektes, das bei den Einwohnern als *Barbier* (*Barbeiro*) bekannt ist. Dasselbe lebt in den menschlichen Wohnungen, woselbst es nachts, nach Löschen der Lichter, die Bewohner angreift, während es bei Tage sich in den Spalten der Wände, in den Zimmerdecken und wo es sonst eine sichere Zuflucht findet, versteckt hält. In der Regel wird dieser Blutsauger in grösster Menge in den Wohnungen armer Leute gefunden, welche nicht getüncht und nur mit Gras gedeckt sind. Hier vermehrt derselbe sich so sehr, dass er in ungeheurer Menge auftritt und durch die Störung des Schlafes eine höchst ungünstige Wirkung ausübt. Ich war oftmals Zeuge der Angriffe dieser Blutsauger, welche in den

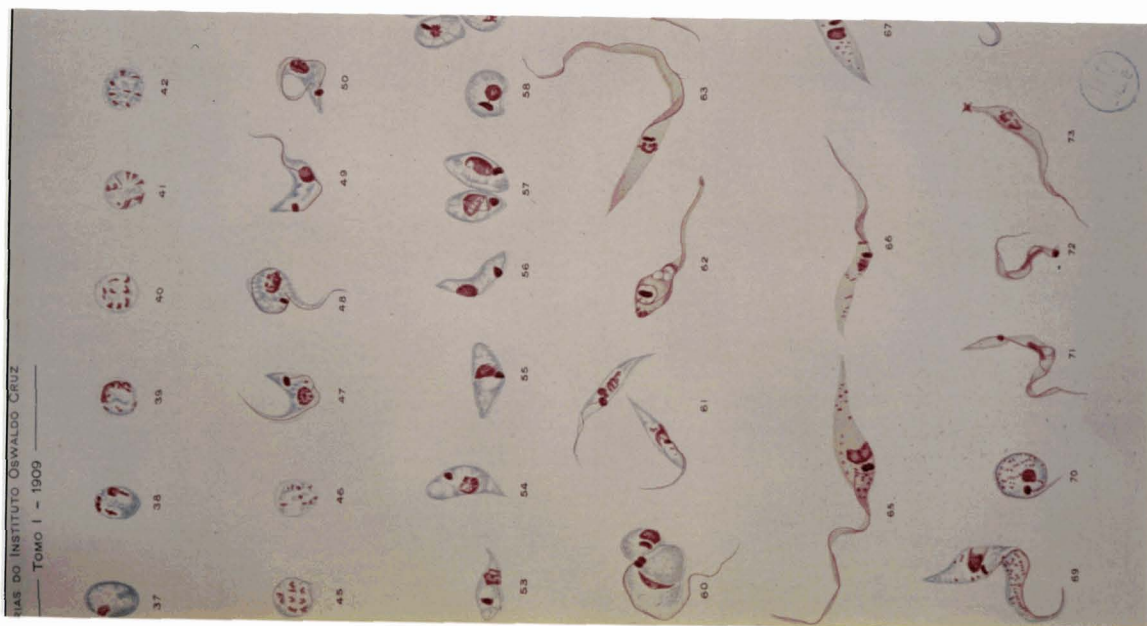


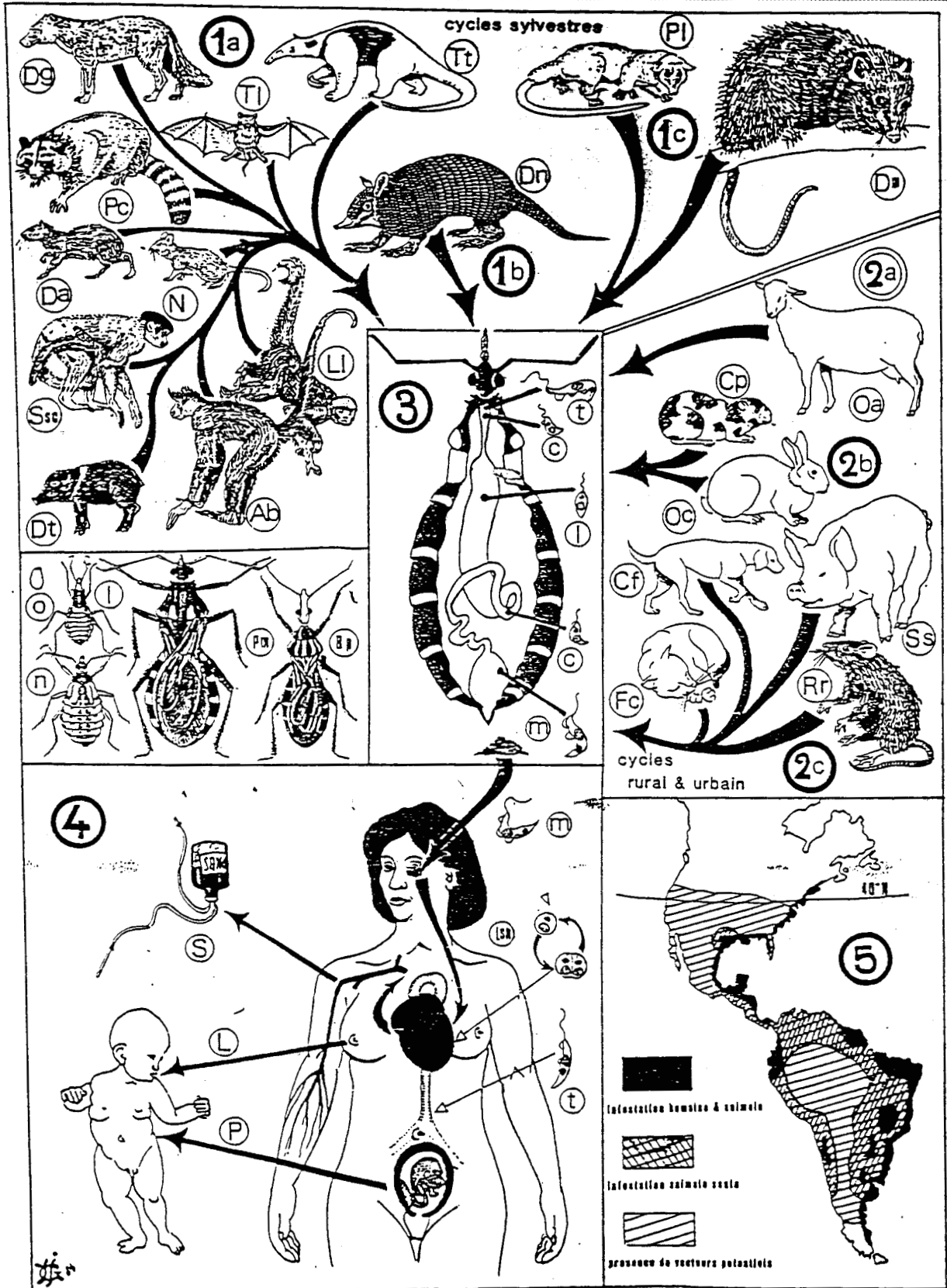
Fig. 1

souligner que certains trypanosomes du genre *Phytomonas* n'infectent que des plantes et sont également transmis par des insectes (CAMARGO EP et coll.,1990). On pense que la présence grandissante de l'homme a rompu l'équilibre écologique et que la maladie a gagné le milieu rural en se propageant à l'homme et aux animaux domestiques. Elle est particulièrement répandue dans les régions économiquement pauvres d'Amérique Latine où les réduves se sont adaptées à un environnement domestique constitué d'habitations en bois ou en torchis et toit de palme. Pourtant, des données récentes laissent à penser qu'elle soit en train de se transformer progressivement en une maladie urbaine, en raison des mouvements de populations (BRUMPT E,1980). Par exemple, lors d'une étude sérologique conduite chez des immigrants d'Amérique Centrale venus s'installer dans la région de Washington, la prévalence de l'infection par *Trypanosoma cruzi* serait de 5% (KIRCHOFF LV,1987).

Une **centaine d'espèces** de triatomes sont connues, trois étant très importantes pour la transmission de *Trypanosoma cruzi*: *Panstrongylus*, *Triatoma*, *Rhodnius*. Les espèces infectées se rencontrent sur le continent américain, du Nord de la Californie et du Maryland au Sud de l'Argentine et du Chili. Selon l'environnement et le climat, elles ont une répartition géographique propre. Il faut noter que cette répartition déborde largement celle de la maladie (**Fig.2, 5**).

Triatoma infestans, le transmetteur principal, se rencontre là où l'endémicité de la maladie est la plus grave: Sud du Brésil, Paraguay, Bolivie, Sud du Pérou et Argentine. *Panstrongylus megistus* est fort répandu au Brésil sauf dans le Nord et

LE CYCLE EVOLUTIF, LA TRANSMISSION ET L'EPIDEMIOLOGIE DE LA MALADIE DE CHAGAS.



D'après GOLVAN, Eds. Le Léopard d'Or, 1990

Fig. 2

peut vivre dans ou hors les demeures; *Panstrongylus herreri* est prédominant dans le Nord du Pérou; *Rhodnius prolixus* se rencontre au Vénézuéla, Colombie, dans les Guyanes et dans la zone des Caraïbes; *Triatoma dimidiata* se trouve sur la côte pacifique, en Equateur, Colombie, au Panama et Costa-Rica, au Salvador, Guatemala, ainsi qu'au Honduras.

Enfin dans certaines zones limitées, plusieurs espèces peuvent transmettre la maladie telles *T. phyllosoma*, *T. pallidipennis* et *T. protacta* au Mexique (CHARLES D,1987).

La piqûre des réduves est indolore et se produit au niveau des parties découvertes (visage) principalement durant la nuit. Ces insectes, hématophages à tous les stades et dans les deux sexes, injectent une salive anti-coagulante, sucent le sang durant environ 20 minutes et évacuent juste après des selles semi-liquides qui contiennent les formes parasitaires infectieuses.

Selon leur habitat et les différentes espèces, les Réduvidés établissent soit un cycle sauvage (enzootie des animaux sauvages) ou domestique (endémie chagasique et enzootie des animaux domestiques).

Les réservoirs varient donc selon le caractère sauvage ou domestique (Fig.2:1 et 2) de la maladie: le chien, le chat et le cobaye constituent les réservoirs domestiques tandis que les divers rongeurs et marsupiaux constituent les réservoirs péri-domestiques. Par ailleurs, de nombreux animaux sauvages ont été reconnus comme porteurs alors que les oiseaux et les animaux à sang froid sont réfractaires à *Trypanosoma cruzi*.

Hormis la transmission habituelle par le contact des déjections d'insectes

infectés, d'autres **modes de transmission** existent (**Fig.2 : 4**) qu'ils soient transplacentaires (REYES MB et coll.,1990), produits par le lait maternel provenant de mère infectée, accidentels lors de greffes d'organes ou de manipulations de laboratoire, ou encore par voie orale lors d'ingestion de gibier en particulier.

Enfin, le risque de transmission par **transfusion sanguine** est particulièrement élevé. Par exemple, on estime que 0,5 à 5,2% des donneurs de sang présentent une sérologie positive dans les états de Minas Gerais et de Sao Paulo et qu'entre 10000 et 20000 nouveaux cas d'infection par an au Brésil, sont dûs aux transfusions sanguines (DIAS JCP,1987).

D. Récentes données épidémiologiques.

D'après SCHOFIELD CJ (1985), environ 90 millions de sujets seraient exposés à une infestation; quant à la prévalence, elle s'établirait à environ **24 millions** de personnes (**Fig. 3**).

La mortalité est parfois élevée au cours de la phase aiguë mais c'est la nature chronique qui fait de la maladie de Chagas un fléau social et économique.

E. Déroulement de la maladie.

La maladie de Chagas comporte deux phases, l'une aiguë durant 2 à 3 mois chez l'homme et une chronique qui dure toute la vie et qui intervient après une période de latence dont la durée est inexplicée (CHARLES,1987). 60% des

LES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Chagas' Disease in Latin America^a

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. Guiana	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	

^aND: no data. From Schofield (1985).

Fig. 3

patients en phase chronique sont asymptomatiques et présentent seulement une sérologie positive. 40% des malades présentent des symptômes qui vont en s'accroissant sur 5, 10, voire 20 ans.

a. Anatomie pathologique

- de la phase aiguë

Au niveau du foyer d'inoculation, il existe une réaction inflammatoire locale où cohabitent des neutrophiles, des éosinophiles et des macrophages contenant des formes amastigotes, et simultanément une lymphadénite aiguë (TAFURI WL,1979).

A distance, il se produit une congestion vasculaire au niveau splénique, une stéatose hépatique et un oedème sous-cutané. Des infiltrats inflammatoires paucicellulaires se localisent au voisinage des cellules éclatées.

Au niveau du coeur, on trouve les signes d'une myocardite avec de nombreux parasites.

Par ailleurs, une encéphalomyélite focale ainsi qu'une inflammation des neurones, de l'oesophage et de l'intestin sont les signes cliniques atteignant le système nerveux.

- de la phase chronique.

Au niveau du coeur, les lésions sont différentes selon que les patients sont asymptomatiques ou symptomatiques. Chez les patients asymptomatiques décédés accidentellement, on observe seulement une légère inflammation et une fibrose peu sévère. En revanche, chez les cardiaques décédés subitement, le coeur

est peu hypertrophié; un amincissement de l'apex ventriculaire est observé dans 1/3 des autopsies. La myocardite peut être focale ou diffuse, la fibrose étendue. Chez les cardiaques décédés après insuffisance cardiaque, le coeur est hypertrophié, les thromboses intracardiaques sont fréquentes et il n'y a ni lésion de l'endocarde ni lésion vasculaire.

Au stade de la chronicité, les différents foyers confluent avec la présence de grandes cellules histiomonocytaires, contribuent à la formation de granulome. L'inflammation atteint aussi l'épicarde et l'endocarde. La fibrose peut être de type interstitiel diffus et septal.

Dans l'appareil digestif, il peut y avoir une diminution des cellules nerveuses ganglionnaires et une inflammation locale. On peut observer principalement un méga-oesophage et un méga-côlon.

b. Pathogénie.

Lors de la phase aiguë, la présence abondante de parasites qui se sont multipliés au niveau des tissus, principalement dans le myocarde, et la réaction inflammatoire qui s'en suit, expliquent les manifestations cliniques observées.

Lors de la phase chronique la présence "cachée" de parasites qui libèrent continuellement des antigènes parasitaires, les séquelles de la phase aiguë ou encore des manifestations auto-immunes pourraient expliquer la pathogénie de cette phase.

c. Etude clinique.

c. 1: phase aiguë.

La phase aiguë passe souvent inaperçue, apparaissant dans 90% des cas chez des sujets âgés de moins de 15 ans. Près de 10% des sujets meurent et le jeune âge du malade rend le pronostic pessimiste (CHARLES,1987). Entre 3 et 30 jours après l'infection, se déclarent les premiers symptômes. Chez environ 40% des malades, la porte d'entrée oculaire des parasites donne naissance à un complexe ophtalmo-ganglionnaire appelé "signe de Romana". Chez environ 30% des sujets, la porte d'entrée cutanée conduit à un chancre ou "chagome". Pour les autres cas, la porte d'entrée est inapparente.

Des manifestations systémiques telles qu'une asthénie, une anorexie, des céphalées, des myalgies et du nervosisme apparaissent dans un contexte de fièvre associée à une tachycardie. Les autres signes courants peuvent être une hépatosplénomégalie, une macropolyadénopathie accompagnée de diarrhée, des oedèmes des membres inférieurs et d'un exanthème morbilliforme.

On pourra distinguer plusieurs formes cliniques:

- une forme cardiaque, se manifestera par une myocardite aiguë qui touchera mortellement 10 à 20% des malades; les survivants guériront en quelques semaines, certains conserveront cependant des anomalies persistantes au niveau de l'E.C.G..
- une forme méningo-encéphalitique atteignant de façon mortelle les enfants en bas âge.

c. 2: Phase chronique.

Les symptômes de la phase aiguë disparaissent en quelques mois et c'est après un temps de latence pouvant durer une vingtaine d'années qu'apparaîtront les manifestations de la phase chronique chez des individus âgés de 20 à 50 ans. La maladie peut pourtant persister sous forme asymptomatique chez de nombreux sujets infectés. En effet, les parasites étant "sequestrés" dans les tissus de l'hôte (JOSKOWICZ M,1985), la parasitémie extrêmement faible n'est souvent détectable que par le seul xénodiagnostic. Néanmoins, plusieurs profils cliniques peuvent également être décrits concernant cette phase.

c. 2 . 1 : Forme cardiaque.

La plupart des malades (pour qui la phase aiguë n'a pas été reconnue et qui n'ont fait l'objet d'aucun dépistage sérologique) ne présentent pas de symptôme sauf de légères modifications de l'E.C.G.. Les formes symptomatiques les plus fréquentes survenant dans 30 à 40% des cas, sont tout d'abord une arythmie avec augmentation des troubles à l'effort, ainsi qu'une insuffisance cardiaque ou cardiomyopathie accompagnée d'anomalies de l'E.C.G..

c. 2. 2 : Forme digestive.

Isolée ou associée à la forme cardiaque, elle n'apparaît que dans une

zone géographique restreinte à une partie du Brésil, au Chili et en Argentine. Elle se traduit avant tout par une dilatation et des altérations de la motricité de l'appareil digestif, principalement au niveau de l'estomac et du côlon et se rencontre chez environ 10% des malades.

L'existence de nids parasitaires dans l'épaisseur des couches musculaires du tube digestif humain suivie de la rupture de ces pseudokystes conduirait à une réaction inflammatoire locale entraînant la dégénérescence de cellules nerveuses post-ganglionnaires.

Cette dégénérescence provoque une dilatation majeure de l'estomac, du côlon et d'autres viscères creux avec apéristaltisme. L'observation de la lumière intraluminale montre que les contractions sont anarchiques et que le cardia reste fermé pendant la déglutition, la dysphagie apparaissant suivie d'une oesophagite, de dysplasies épithéliales pouvant aller jusqu'au carcinome. De nombreux symptômes accompagnent bien évidemment cette forme de la maladie: dysphagie, pyrosis, hoquet... L'examen radiologique confirme le diagnostic et permet de distinguer 4 degrés d'ectasie oesophagienne:

- I. Stagnation brève de la baryte signifiant une dilatation transversale allant jusqu'à 4 cm.
- II. Stase prolongée, le diamètre peut atteindre 4 à 10 cm et la forme est alors dite en "radis".
- III. Stase encore plus prolongée avec diamètre atteignant 7 à 10 cm.
- IV. Dilatation pouvant aller au delà de 10 cm, caractéristique d'un dolichomégaoesophage envahissant le champ pulmonaire droit.

Les deux derniers stades peuvent être accompagnés de carcinome.

c. 2. 3 : Autres formes.

Vessie, uretère, vésicule biliaire et bronches peuvent également être altérés, ceci s'accompagnant de plusieurs troubles fonctionnels. La forme nerveuse a été décrite principalement par KÖBERLE F(1968), qui a montré en particulier que le nombre des cellules des ganglions sympathiques était très diminué chez des patients en phase chronique.

d. Diagnostic.

Plusieurs signes cliniques peuvent être évocateurs pour détecter une infection précoce. La mise en évidence du parasite, en inoculant du sang de malade, à des animaux sains, (xénodiagnostic) reste la méthode de choix, cette méthode demandant néanmoins plus d'un mois. Les tests sérologiques sont difficilement applicables dès les premières semaines.

Pour le diagnostic de la phase chronique, si le xénodiagnostic peut être entrepris, des méthodes telles que la réaction de fixation du complément de Machado-Guerreiro, l'hémagglutination indirecte ou passive, ou encore l'immunofluorescence indirecte (CERISOLA JA,1970) sont parfois simultanément utilisées. Tous ces tests, y compris les tests ELISA tentés jusqu'ici se heurtent aux problèmes de réactions croisées avec les leishmanioses viscérales (CHARLES,1987).

Depuis quelques années, des travaux ont porté sur la recherche d'antigènes purifiés ou sur la production d'anticorps monoclonaux susceptibles de faciliter le diagnostic (OROZCO O et coll.,1982); (DRAGON EA et coll.,1985); (SCHARFSTEIN J et coll.,1985); (LEMESRE JL et coll.,1986); (MARTIN UO et coll.,1990). Les techniques de biologie moléculaire ont également permis d'identifier des séquences d'ADN très répétées qui pourraient servir à détecter de très faible nombre de parasites circulants (GONZALEZ A et coll.,1984); (AVILA AH et coll.,1991). Il semble cependant que le coût actuel de ces techniques les rende inutilisables en routine.

e. Evolution et pronostic.

10% des sujets meurent lors de la phase aiguë et près de 40% des sujets infectés présenteront des manifestations chroniques.

f.Traitement.

Dès 1957, PACKCHANIAN A, a montré que les dérivés du nitrofurane étaient actifs vis-à-vis de *Trypanosoma cruzi*. Parmi eux, le (4-[(5-nitrofurfurylidene) amino] -3- méthylthiomorpholine- 1,1-dioxide) ou nifurtimox est le médicament le plus utilisé lors de la phase aiguë, associé à une corticothérapie. Il peut donner naissance à de nombreux effets secondaires (MARR JJ et coll.,1986): problèmes digestifs, insomnie, polynévrite...

Le **benznidazole** (N-benzyl-2nitroimidazole-1-acetamide) peut être

actif lors de phase chronique mais provoquerait des neuropathies périphériques (DOCAMPO R et coll.,1985). Il faut noter que selon les souches, la résistance naturelle du parasite vis-à-vis de ces deux drogues est très variable (FILARDI LS et coll.,1987).

Les traitements symptomatiques sont médicaux (ex.: anti-arythmiques) et chirurgicaux.

De nombreux **xénodiagnos** doivent être pratiqués pour parler de guérison parasitologique, qui n'est sans doute pas suffisante pour modifier l'évolution de la maladie.

F. Existence de nombreuses souches parasitaires.

Depuis longtemps, des différences entre les souches de *Trypanosoma cruzi* ont été observées, au niveau de la morphologie, de l'infectivité, et du tropisme chez l'hôte vertébré. La classification des souches selon leur tropisme n'est cependant pas clairement établie. Ainsi par exemple, la souche Y avec laquelle nous avons travaillé a longtemps été considérée comme une souche réticulotropique (ANDRADE SG,1974), alors que de récents travaux tendent à démontrer que c'est en fait une souche pantropique. Néanmoins, elle présente un cardiotropisme très marqué (PENIN P et coll.,1990). Plusieurs travaux ont souligné ces différences inter-souches, quant à l'expression de protéines de surface parasitaires (PLATA F et coll.,1984), à la réactivité de certains anticorps monoclonaux (ABUIN G et coll.,1989), et encore au caryotype et à la localisation chromosomique des gènes (ENGMAN DM et coll.,1987). Elles ont également été étudiées plus systématiquement selon deux approches. La première est l'étude des

profils isoenzymatiques ou **zymodèmes** (BAGSTER et coll., 1973; READY PD et coll.,1979). La deuxième est l'étude des profils de restriction des ADN kinétoplastiques (voir chapitre sur les organelles) appelée **schizodèmes** (MATTEI DM et coll.,1977); (MOREL C et coll.,1980). Plusieurs classifications en zymodèmes et en schizodèmes ont été proposées, se superposant pour certains auteurs seulement. L'hétérogénéité naturelle existant parmi les différentes souches pose bien évidemment de nombreux problèmes (DVORAK JA,1984), et comme nous le verrons, exclut pour le moment toute variation antigénique, du moins telle qu'on l'entend pour les trypanosomes africains (PAYS E et coll.,1980); (BORST P et coll.,1982). D'autre part, le débat portant sur la clonalité des protozoaires est particulièrement actif depuis quelques années (TIBAYRENC M et coll.,1990). On comprend en effet que l'existence d'une clonalité chez ces parasites aurait des implications à la fois biologiques mais aussi et surtout médicales. En effet, si l'existence de clones majeurs était établie, ils seraient à étudier en priorité pour affiner une stratégie de lutte contre la maladie de Chagas.

G. Prophylaxie.

Comme il n'existe à ce jour ni traitement satisfaisant, ni vaccin efficace, les moyens de lutte antivectorielle sont mis en avant, ayant l'avantage d'être accompagnés de mesures sociales non négligeables. L'épandage d'**insecticides** tels l'hexachlorocyclohexane, la cryperméthrine ou encore la deltaméthrine est largement utilisé, en une campagne comprenant 3 phases: une

phase préparatoire, visant à mobiliser les populations, une phase d'attaque et une dernière dite de vigilance (DIAS,1987).

L'utilisation de peintures insecticides semble prometteuse car efficace et moins coûteuse que les insecticides. L'emploi de cartouches fumigènes dégageant des insecticides est également envisagé lors des phases de vigilance dès lors que le retour des réduves est repéré par des pièges appelés capteurs.

Il est probable que l'utilisation de **protocoles pluridisciplinaires**, accompagnés d'une éducation des populations, pourront aboutir à limiter le niveau d'endémicité de cette infection. D'autre part l'amélioration de l'habitat serait-elle un facteur primordial dans cette lutte? S'il est tentant de s'en persuader, il semble cependant que les réduves envahissent d'ores et déjà des zones urbaines considérées comme salubres.

Pour prévenir la transmission associée aux transfusions sanguines risquant d'étendre les zones d'endémie, l'utilisation du violet de gentiane, additionné d'ascorbate de sodium en présence de lumière visible serait efficace pour tuer les trypanostigotes sans trop colorer le sang. Une épreuve d'agglutination rapide est actuellement à l'étude. Il faut signaler dans ce contexte, que les banques de sang d'Amérique Latine doivent également coordonner le dépistage du tréponème ainsi que celui des virus du SIDA et de l'hépatite B.

2.BIOLOGIE CELLULAIRE DU PARASITE.

La connaissance des **bases moléculaires** de l'interaction du parasite hautement pléomorphe qu'est *Trypanosoma cruzi* avec ses hôtes, est

particulièrement intéressante à plus d'un titre. En effet si les démarches empiriques ne peuvent être écartées, il est raisonnable de penser qu'une telle connaissance puisse être à la base d'une stratégie rationnelle pour le contrôle de la maladie de Chagas. D'autre part sur un plan plus fondamental, elle peut contribuer à mieux connaître les mécanismes de différenciation et d'interaction entre cellules.

A. Différentes formes.

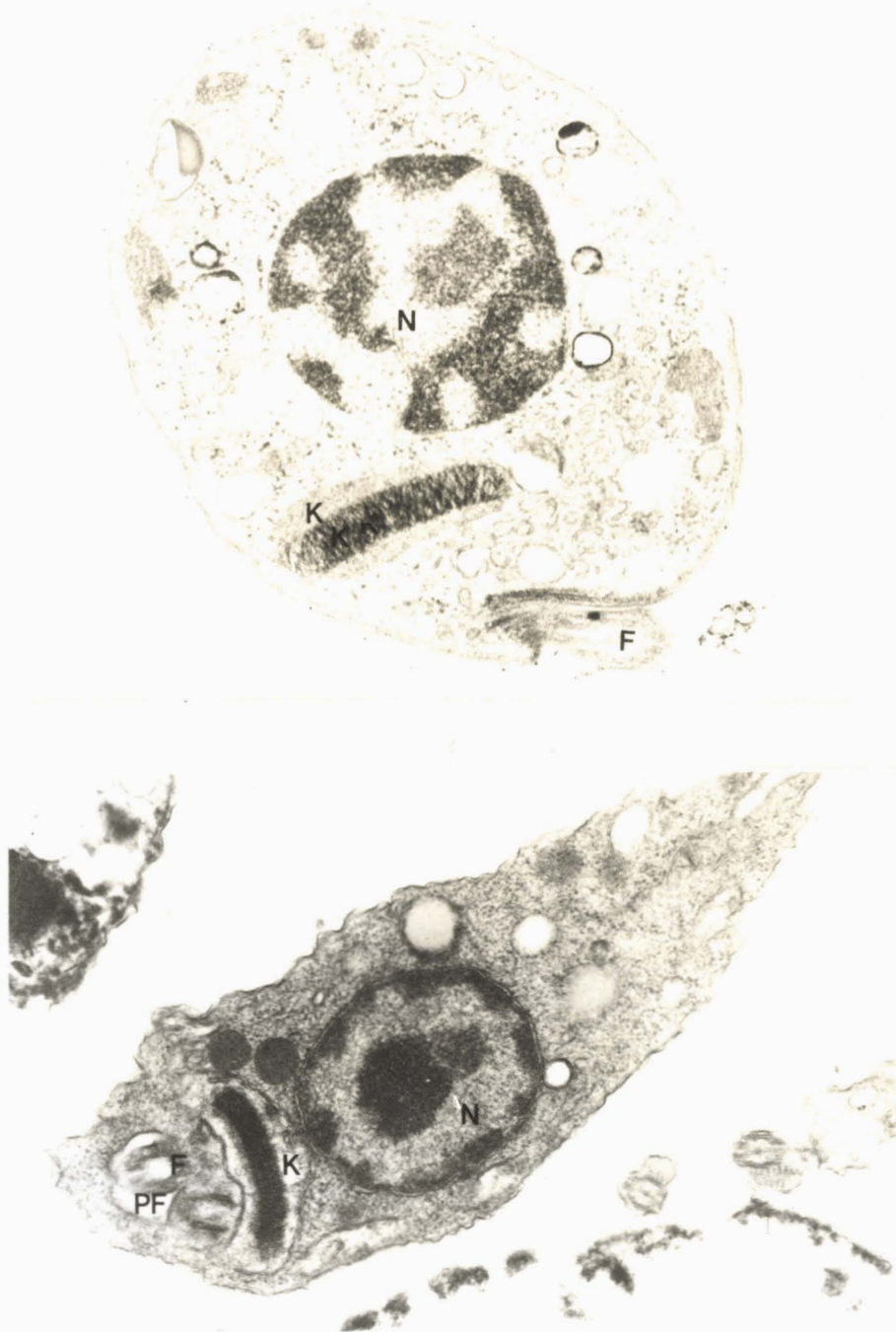
a. 1: morphologie.

Les **trypomastigotes** possèdent un kinétoplaste postérieur au noyau, mesurent 20 μ m de long et 2 μ m de large. Chez les mammifères, ils sont trouvés intracellulairement dans les tissus et extracellulairement dans la circulation. Chez les hôtes invertébrés, ils sont toujours extracellulaires et localisés dans l'intestin postérieur où ils sont nommés "métacycliques".

Les **amastigotes** sont les formes intracellulaires replicatives (**Fig.4 haut**). Arrondis, ils possèdent un court flagelle; ils se multiplient par fission binaire avec un temps de réplication allant entre 7 et 14 h, selon les souches et la température.

Les **épimastigotes** (**Fig.4bas**) dont le kinétoplaste est localisé antérieurement par rapport au noyau, ont entre 20 et 40 μ m de long. Ils se trouvent dans l'intestin moyen du vecteur où ils s'y multiplient.

TRYPANOSOMA CRUZI: AMASTIGOTE ET
EPIMASTIGOTE (Microscopie électronique).



N: noyau; K: kinétoplaste;
F: flagelle; PF: poche flagellaire

Fig. 4

a. 2: cycle.

Initialement décrit par CHAGAS en 1909, puis confirmé par d'autres auteurs comme BRUMPT E en 1912, le cycle du parasite, se partage entre l'insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un mammifère (hôte définitif) (Fig. 2).

Trypanosoma cruzi est capable d'infecter et de se multiplier dans une large **variété de cellules hôte**, incluant les macrophages, les cellules des muscles lisses et striés, les cellules de Schwann, les fibroblastes, les cellules gliales, et les neurones. Il a été montré récemment que ce parasite pouvait même infecter les lymphocytes T (VELGE P et coll.,1991).

Lorsqu'un triatome infecté pique un mammifère, il libère par l'intermédiaire de ces déjections, des trypomastigotes métacycliques qui, après avoir traversé la peau érodée ou les muqueuses, infectent les cellules avoisinantes (Fig. 2: 3 ,4). A l'intérieur des cellules, les trypomastigotes se différencient en amastigotes qui se divisent par fission binaire de manière asynchrone. Une fois la cellule "gorgée" d'amastigotes, commence alors une différenciation en trypomastigotes qui rompent la membrane cellulaire, rejoignent la circulation sanguine et contribuent ainsi au maintien de l'infection par réinfection de nouvelles cellules. Ils peuvent également être ingérés par un triatome lors de son repas sanguin, et par là même initier l'infection de l'hôte invertébré. Transformés en épimastigotes, ils migrent vers l'intestin moyen où ils se multiplient, puis vers l'intestin postérieur où ils adhèrent aux glandes rectales et se différencient enfin en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes pour les hôtes vertébrés.

a. 3: beaucoup d'aspects du cycle sont mal compris.

Il est clair que des changements substantiels concernant les caractéristiques à la fois morphologiques et biochimiques interviennent durant la croissance du parasite dans chacun de ses hôtes (Fig.5).

Cependant, les processus de **différenciation** du parasite dans ses hôtes vertébrés ou invertébrés demeurent largement inconnus. Les épimastigotes peuvent être cultivés à 28°C dans différents milieux semi-définis type GLSH (CORNETTE J et coll.,1988) ou LIT (DE MAIO A et coll.,1983). Dans le milieu LIT, on sait également faire différencier des épimastigotes en trypomastigotes métacycliques *in vitro* (métacyclogénèse), ces derniers étant tout de même très différents des trypomastigotes issus de l'insecte.

Récemment, il a été possible de cultiver des épimastigotes dans de l'urine artificielle de réduve (de ISOLA ELD et coll.,1987); (GOLDENBERG S et coll.,1987), riche en L-proline, qui adhèrent alors au flacon de culture (ce qui n'était pas le cas en milieu LIT), se **différencient** en trypomastigotes qui se détachent du support et se déplacent dans le milieu. Cet analogue de l'urine stimulerait donc les événements biologiques semblables à ceux qui se produisent dans la glande rectale de l'insecte. Les trypomastigotes ainsi induits, se rapprocheraient plus des trypomastigotes métacycliques, ce qui rend ce système *in vitro* particulièrement intéressant pour étudier les processus de différenciation.

Ces transformations morphologiques sont associées avec l'expression de **polypeptides spécifiques** qui sont présents dans les parasites adhérents (BONALDO MC et coll., 1988). Des études ont également montré que la

LA DIFFERENCIATION DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

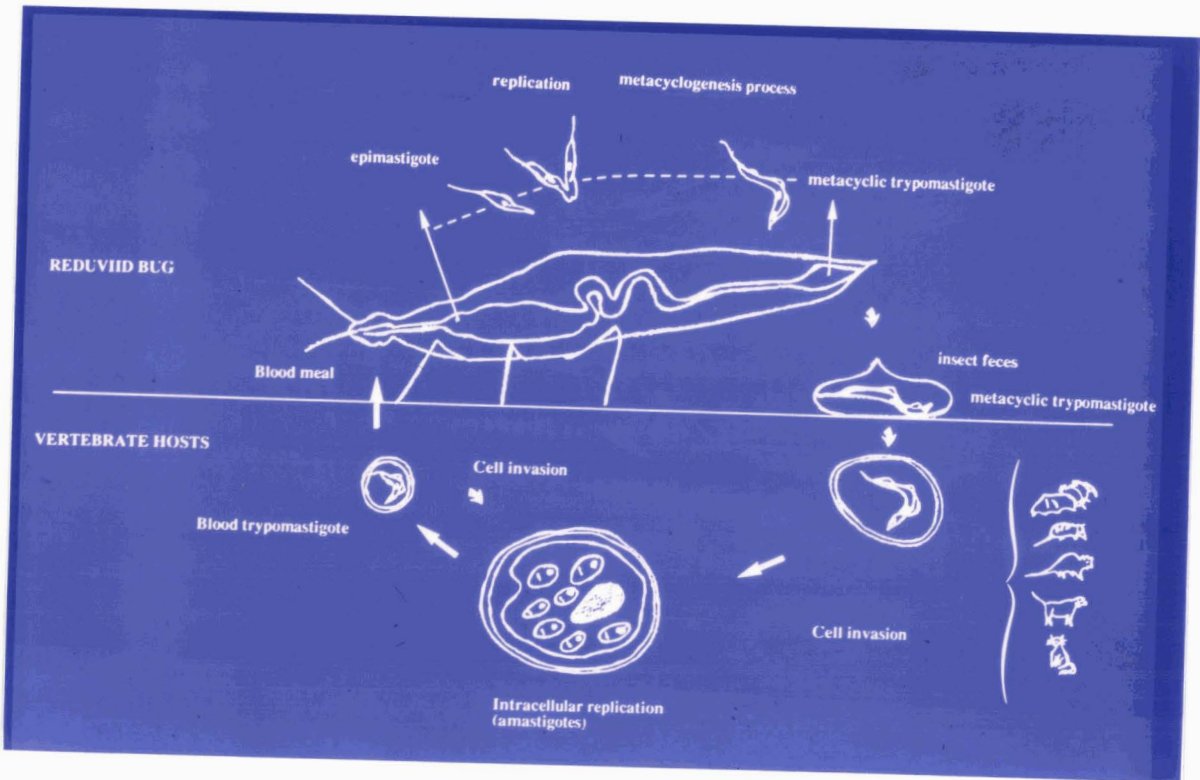


Fig. 5

métacyclogénèse pouvait être induite par l'**AMP cyclique** et des activateurs de l'adénylate cyclase (GONZALES-PERDOMS M et coll.,1988). De plus, un **gène** dont l'expression est augmentée durant ce processus, mais aussi en présence d'AMPc ou d'analogues d'AMPc a été récemment identifié (HEATH S et coll.,1990).

Concernant les mécanismes d'**interactions trypomastigote-cellule hôte**, OUAISSI MA et coll.,(1984) ont décrit que la **fibronectine** jouait un rôle clé tout d'abord dans les phénomènes d'**adhésion** et ont montré que les parasites se fixaient au térapeptide "arginine-glycine-acide aspartique-sérine" ou **RGDS**, peptide qui est le domaine de fixation de la fibronectine à la cellule (OUAISSI MA et coll.,1986). De plus, l'expression du récepteur de la fibronectine à la surface des trypomastigotes a été étudiée durant la différenciation en utilisant soit des peptides marqués contenant la séquence RGDS soit un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur parasite (OUAISSI MA et coll.,1988; OUAISSI MA et coll.,1990a). Des résultats très récents montrent en outre qu'au contact de la fibronectine, le parasite hydrolyse cette molécule grâce à ses protéases, libérant ainsi des fragments peptidiques qui activent la **différenciation**, ce phénomène étant concomittant avec la stimulation de la synthèse protéique, l'augmentation de la concentration d'AMPc, et la phosphorylation de plusieurs protéines parasites (OUAISSI A et coll.,1991). Ceci suggère que ces protéines phosphorylées pourraient avoir un rôle dans la transduction du signal donné par les fragments de clivage de la fibronectine. Il a été également démontré que le parasite utilisait le même récepteur pour interagir avec le collagène, probablement en utilisant la séquence RGD de cette molécule, et que des anticorps dirigés contre le **collagène**

inhibaient l'infection des cellules par le parasite (VELGE P et coll.,1988). Ceci montre donc que l'expression des récepteurs parasitaires est corrélée avec la capacité d'attachement et d'invasion de la cellule par *Trypanosoma cruzi*. Ces résultats ont été dernièrement confirmés par des travaux montrant que les trypomastigotes pouvaient interagir avec des composants de la matrice extracellulaire tels que l'**héparine**, le sulfate d'héparine et aussi le collagène (RIMOLDI MT et coll.,1988). Dans ce même contexte, en plus des mécanismes d'attachement faisant intervenir les composants de la matrice extra-cellulaire, le parasite peut également adhérer aux cellules par le biais du composant C1q, qu'il peut fixer de façon indépendante de la fibronectine (ORTEGA-BARRIA E et coll.,1991). Il est donc probable que plusieurs types d'interactions parasite-cellule soient mis en jeu lors de l'infection et que le blocage de l'une de ces interactions soit inefficace pour enrayer l'infection.

D'autre part, les trypomastigotes sont des formes non répliquatives responsables de la transmission de l'infection, de l'hôte vertébré vers l'insecte et vice et versa. Il est généralement décrit que les trypomastigotes quittent les cellules infectées après rupture de ces dernières. Pourtant, on ne connaît pas les mécanismes exacts (actifs ou passifs?) qui permettent la "**sortie**" des trypomastigotes hors de la cellule.

Par ailleurs, après avoir infecté les cellules, les trypomastigotes se trouvent à l'intérieur des phagosomes alors que les amastigotes se multiplient librement dans le cytosol. Quand les épimastigotes infectent des macrophages *in vitro*, ils sont également entourés par la membrane parasitophore mais à la différence des trypomastigotes qui propagent l'infection, ils ne peuvent s'en

échapper. Cette différence quand à la **capacité d'échappement du phagolysosome** concernant les différents stades demeure inexpliquée.

Un autre point concerne l'interaction entre l'**endothélium vasculaire et les parasites** avant leur entrée dans la cellule. En effet, pour envahir les tissus, ces derniers doivent interagir avec le glycocalyx et le plasmalemme.

Un dernier point concerne la notion même de **stade infectant** qui est aujourd'hui remise en question. En effet dès 1968, BRACK C avait identifié dans le tube digestif de l'insecte, des formes rondes mais pourvues de flagelle qu'elle appela "**sphéromastigotes**". Ces mêmes formes furent décrites chez l'hôte vertébré en 1978 par PAN SC (1978). De plus, des travaux ont montré que des trypomastigotes placés au sortir de la cellule dans un milieu acellulaire de type RPMI, s'arrondissaient progressivement pour se transformer en "**sphéromastigotes**". De telles formes étaient plus infectantes que des trypomastigotes (PIRAS MM et coll.,1982). Ces travaux ont été confirmés en utilisant des anticorps monoclonaux réagissant de façon différentielle avec les diverses formes de trypomastigotes maintenus dans un milieu acellulaire, ou des cellules fixées pour étudier l'"adhésivité" des parasites, au cours de la différenciation *in vitro* (ANDREWS NW et coll.,1987a). Cependant, les bases moléculaires de ces processus demeurent largement inconnues. Récemment, il a été prouvé que des formes rondes étaient capables d'initier une infection *in vitro* et *in vivo* (LEY V et coll.,1988). L'ensemble de ces observations a évidemment une importance fondamentale lorsqu'il s'agit de définir des stratégies vaccinales, ou de trouver des drogues actives puisque le stade "sphéromastigote" doit alors être pris en considération.

Tous ces points illustrent donc de manière non exhaustive la **complexité du cycle** de *Trypanosoma cruzi* et sont la preuve que ce dernier est loin d'être définitivement établi et compris.

B. Organelles cytoplasmiques

La plupart des organelles des eucaryotes supérieurs sont retrouvés chez *Trypanosoma cruzi*, avec apparemment des fonctions classiques. A la manière des trypanosomatidés en général, ce parasite possède néanmoins des structures originales.

Tout d'abord il ne possède qu'une **seule mitochondrie**, linéaire chez le trypomastigote, "branchée" chez les autres stades, dont la principale fonction est la production d'ATP au travers de la respiration oxydative. De même, l'ADN mitochondrial est le seul ADN dans la nature qui soit organisé en réseau, comprenant des milliers de cercles et dont le changement de localisation définit les stades morphologiques (DeSOUZA W,1984). Il est visualisé par des colorants basiques, et avant que sa composition soit connue, les cytologistes l'ont nommés **kinétoplaste** pour "corps associé au mouvement". Si l'analyse des profils de restriction de cet ADN kinétoplastique (ou ADNk) donne lieu depuis plusieurs années à des travaux visant à mieux caractériser les différentes souches de parasites (MATTEI, et al.,1977; MOREL, et al.,1980), en revanche le rôle de ce support d'information génétique est encore mal connu (DEGRAVE W et coll.,1988). Deux sortes de cercles se trouvent dans ce réseau. Les **maxi-cercles**, de 20 à 38 kb, dont le nombre est limité (environ 50), possèdent

des gènes essentiels au bon fonctionnement de la mitochondrie, des gènes codant pour la synthèse des ARN ribosomiaux, ainsi que des gènes dont les protéines sont impliquées dans les transport d'électrons et dans la synthèse de l'ATP. Comme les autres génomes mitochondriaux, les maxi-cercles utilisent le codon UGA pour coder pour le tryptophane, alors que ce codon est un signal de STOP, dans le code génétique universel. Une autre propriété originale de ces maxi-cercles réside dans le fait que plusieurs de leurs gènes sont "incomplets". En effet, leurs transcrits sont sujet à un processus d'ajout d'uridine connu sous le terme **d'édition de l'ARN** (STUART K,1983). Ce phénomène a été décrit chez *Trypanosoma brucei*, *Leishmania tarentolae*, et *Crithidia fasciculata*, mais reste à ce jour inconnu chez *Trypanosoma cruzi*. Les **mini-cercles**, de 0,7 à 2,5 kb, sont beaucoup plus nombreux (plus de 5000). Il semblerait qu'ils aient un rôle structural, mais leur fonction exacte est inconnue. Il a été récemment démontré que la totalité de l'ADN des mini-cercles de *Trypanosoma cruzi* était transcrite mais on ne sait pas si les ARN correspondants sont traduits (THERTULIEN R et coll.,1991). Les mécanismes intervenant dans la réplication de l'ADN kinétoplastique sont également mal élucidés, mais il est probable qu'ils mettent en jeu une machinerie enzymatique originale, pouvant servir de cible pour atteindre sélectivement le parasite.

Les **microtubules subpelliculaires**, qui connectés entre eux ainsi qu'à la membrane plasmique confèrent une certaine "rigidité" au parasite, sont également des structures originales. Ils sont localisés sur l'entière surface de la membrane plasmique sauf à l'endroit où le flagelle émerge de la cellule (poche

flagellaire). Des travaux ont montré qu'une drogue capable de stabiliser ces microtubules, pouvait inhiber la réplication de *Trypanosoma cruzi* (BAUM SG et coll.,1981). Malheureusement, cette drogue est toxique pour les cellules de mammifères et donc inutilisable en thérapie. Cependant, les recherches concernant les composés susceptibles d'interagir spécifiquement avec ces structures parasitaires méritent d'être poursuivies.

Les **glycosomes**, trouvés chez tous les Trypanosomatidés, ont été identifiés pour la première fois chez *Trypanosoma brucei* (OPPERDOES FR et coll.,1977). Ces organelles délimités par une membrane, mesurent environ 0,3 μm . Présents en nombre de 200 à 300 par cellule, ils ont un rôle métabolique, puisqu'ils contiennent plusieurs enzymes responsables de réactions cataboliques et anaboliques, en particulier des enzymes de la glycolyse et du métabolisme du glycérol. Le glycosome apparaît constituer une réserve séparée des intermédiaires de la glycolyse, permettant au parasite d'économiser son énergie (OPPERDOES FR et coll.,1984) en métabolisant le glucose 50 fois plus vite que le système équivalent chez les mammifères. Ce complexe multi-enzymatique qu'est le glycosome apparaît donc être une cible potentielle lors d'une stratégie chimiothérapique.

C. Voies métaboliques originales.

De manière générale, la **N glycosylation** des protéines implique le transfert d'un oligosaccharide contenant 2 N-acétylglucosamine, 9 mannose, et 3

glucose d'un dérivé dolichol - diphosphate vers un résidu asparagine. Les 3 glucose semblent être indispensables et les oligosaccharides transférés sont ensuite modifiés par perte de monosaccharide ou addition d'autres sucres. Chez *Trypanosoma cruzi* ainsi que chez tous les trypanosomatidés, des oligosaccharides sans glucose sont transférés.

De la même manière, la composition en sucre des glycoprotéines parasitaires peut être différente de celle des glycoprotéines de mammifères. Par exemple, la GP72 des épimastigotes est relativement riche en ribose, alors que seules les protéines ADP ribosylées des autres eucaryotes en contiennent .

Plusieurs **enzymes oxydatives** peuvent produire de substantielles quantités d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène dans les tissus de mammifères. Certaines de ces activités ont été retrouvées chez *Trypanosoma cruzi* (DOCAMPO R et coll.,1984). Cependant, contrairement aux mammifères le parasite serait partiellement déficient quant aux mécanismes de défense contre ces métabolites toxiques de l'oxygène. Les **superoxydes dismutases**, qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en conduisant à la formation d'hydrogène peroxyde et d'oxygène sont présentes chez les formes épimastigotes (DOCAMPO R et coll.,1976). Une activité **ascorbate peroxydase** aurait cependant été détectée (DOCAMPO, et coll.,1976) bien que cette détection soit controversée (BOVERIS A et coll.,1980).

Cependant, le parasite serait déficient en **catalase** et en enzyme qui catalyse la réaction entre des hydroperoxydes et du glutathion réduit pour former du glutathion oxydé ainsi que des produits de réduction de ces hydroperoxydes, à

savoir la **glutathion-peroxydase** (DOCAMPO, et coll.,1976); (BOVERIS, et coll.,1980).

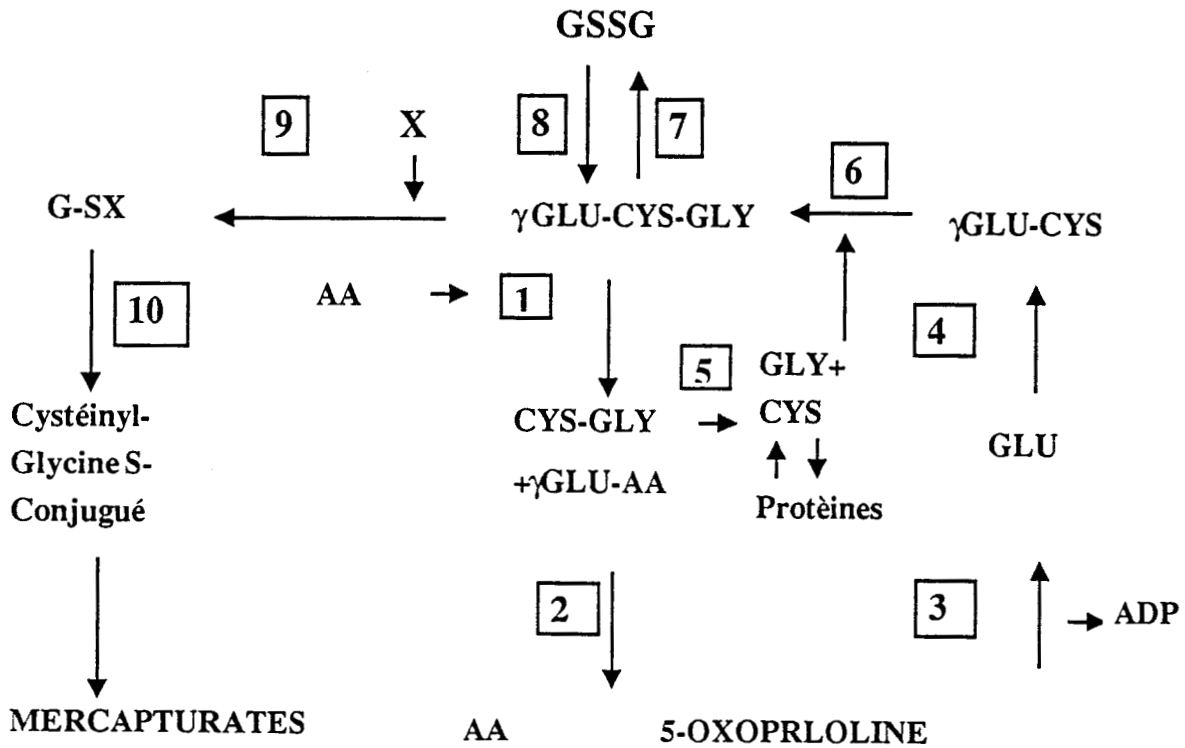
Des informations détaillées sont disponibles concernant la synthèse et le **métabolisme du glutathion** au travers du cycle "gamma-glutamyl" chez les mammifères (**Fig. 6**), la régulation des enzymes intervenant dans ce cycle, ainsi que le **rôle protecteur** joué par ce tripeptide contre les dérivés toxiques de l'oxygène et les radicaux libres.

Le **glutathion** est en effet un coenzyme intervenant dans plusieurs réactions (**Fig. 7**), en se conjuguant avec des drogues ou bien encore en se conjuguant avec des métabolites de xénobiotiques, produits par exemple par le cytochrome P-450, décrit chez *Trypanosoma cruzi* (AGOSIN M et coll.,1976). De plus le "turn-over" cellulaire du glutathion peut être associé avec le transport d'acides aminés par la gamma-glutamyl transpeptidase membranaire (MEISTER A,1981; MEISTER A,1983).

L'inhibition de la synthèse du glutathion par la **buthionine sulfoximide** peut protéger les souris contre une infection par *Trypanosoma brucei* et a été proposée comme stratégie chimiothérapique contre ce parasite (ARRICK BA et coll.,1971).

La concentration en glutathion réduit chez *Trypanosoma cruzi* est très faible (BOVERIS, et coll.,1980). MONCADA C, (1987) a montré que selon les souches, la concentration de glutathion chez les épimastigotes variait entre 0,60 et 1,03 mM. On pourrait donc supposer que l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans le cycle du glutathion avec des drogues appropriées rendrait le parasite plus susceptible que l'hôte vis-à-vis des radicaux libres formés par ces

LE METABOLISME DU GLUTATHION



1: γ GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE

2: γ GLUTAMYL CYCLO TRANSFERASE

3: 5 OXOPROLINASE

4: γ GLUTAMYLSYNTHETASE

5: DIPEPTIDASE

6: GLUTATHION SYNTHETASE

7: PLUSIEURS REACTIONS ENZYMATIQUES OU NON

8: GLUTATHION REDUCTASE

9: GLUTATHION S-TRANSFERASE

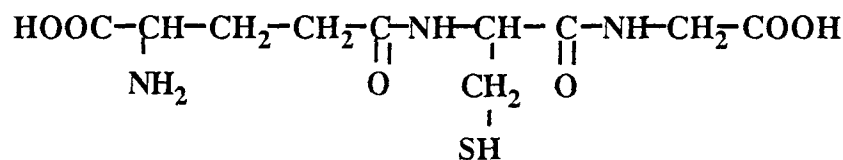
10: γ GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE

ENZYMES DU
CYCLE
 γ GLUTAMYL

Fig. 6

LE METABOLISME ET LES FONCTIONS DU GLUTATHION

DETECTE POUR LA PREMIERE FOIS CHEZ LA LEVURE EN 1888, LE GLUTATHION OU γ -GLUTAMYL-CYSTEINYLGLYCINE EST UN TRIPEPTIDE D'ORIGINE NON PROTEIQUE, DONT L'ACIDE GLUTAMIQUE ASSURE SA LIASON PEPTIDIQUE AVEC LA CYSTEINE PAR L'INTERMEDIARE DE SON GROUPEMENT CARBOXYLE γ ET NON α . SA STRUCTURE A ETE PROUVEE PAR SYNTHESE CHIMIQUE EN 1935.



SES FONCTIONS BIOCHIMIQUES SONT NOMBREUSES:

PIEGEAGE DE RADICAUX LIBRES (NE)
 REDUCTION DE PONTS DISULFURES (NE)
 METABOLISME DES PEROXIDES (E)
 REDUCTION DE RIBONUCLEOTIDES (E)
 TRANSPORT D'ACIDES AMINES (CYCLE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE)
 CONJUGAISON DE COMPOSES EXOGENES (METABOLISME DES DROGUES) PAR
 L'INTERMEDIARE DES GLUTATHION S-TRANSFERASES
 DIVERSES FONCTIONS DE COENZYME

Fig. 7

drogues.

Chez *Trypanosoma cruzi*, les seules enzymes du cycle du glutathion déjà décrites sont la **gamma-glutamyl transpeptidase** et la **gamma-glutamyl cystéine synthétase** (REPETTO Y et coll.,1987). Cette dernière est la première enzyme impliquée dans la synthèse du glutathion et elle est inhibée par la buthionine sulfoxymide. Traitées par ce composé lors de leurs cultures *in vitro*, plusieurs souches de parasites voient leur concentration en glutathion diminuer de moitié environ (MONCADA,1987).

Comme nous l'avons souligné ç-dessus, un des rôles importants du glutathion est la protection des cellules du "stress" oxydatif et de l'action des radicaux libres. Le produit final de telles réactions est le glutathion oxydé, lui même toxique pour les cellules (MEISTER,1983). Cependant, chez les mammifères, le glutathion oxydé ne s'accumule pas, étant réduit par une **glutathion-réductase**, dépendante du cofacteur NADPH₂. En 1985, FAIRLAMB a montré que la glutathion-réductase de plusieurs trypanosomatidés n'utilisait pas le glutathion mais nécessitait un cofacteur original pour son activité, identifié par la suite comme étant un conjugué de glutathion et de spermidine nommé **trypanothion** (FAIRLAMB AH et coll.,1985); (SHAMES SL et coll.,1986), dont la formule est:

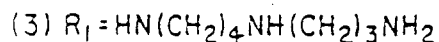
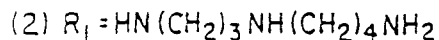
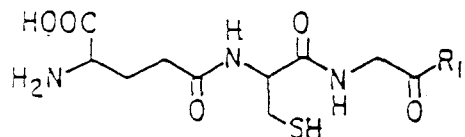
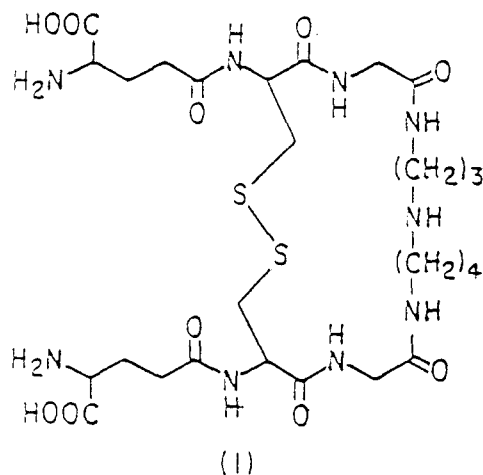
N1, N8-bis [L-gamma-glutamyl-L-hemicystinyl-glycyl] spermidine (**Fig. 8**), et dont la biosynthèse a été décrite (FAIRLAMB AH et coll.,1986). Puisque les glutathion-réductases des autres organismes n'utilisent pas le trypanothion, la **trypanothion-réductase**, récemment clonée et cristallisée (SULLIVAN FX et coll.,1991), et/ou la biosynthèse du trypanothion (**Fig. 9**) pourraient être des

LE METABOLISME DU TRYPANOTHION

CHEZ TOUS LES TRYPANOSOMATIDES, LE METABOLISME DU GLUTATHION ET DES POLYAMINES SONT LIES.

LE GLUTATHION REDUIT EST DETECTABLE CHEZ CES PARASITES.

ILS REDUISENT LE GLUTATHION OXYDE PAR L'INTERMEDIAIRE DU NADPH ET D'UN COMPOSE DIALYSABLE DE FAIBLE POIDS MOLECULAIRE, APPELE TRYPANOTHION COMPOSE DE DEUX MOLECULES DE GLUTATHION LIEES AUX GROUPEMENTS AMINO TERMINAUX DE LA SPERMIDINE.



Structure du (1) trypanothion disulfide ou (T(S)₂), de la (2) N1-monogluthionylspermidine, et de la (3) N8-monogluthionylspermidine.

Fig. 8

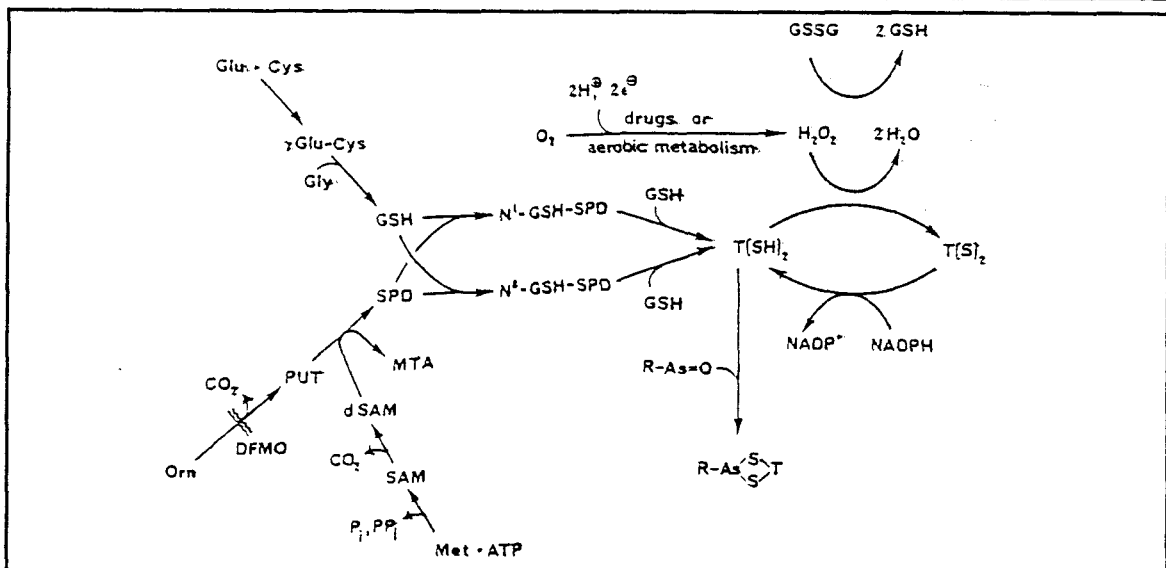
LA BIOSYNTHESE DU TRYPANOTHION

LA TRYPANOTHIONE REDUCTASE QUI EST L'EQUIVALENT DE LA GLUTATHION REDUCTASE, MAINTIEN LE TRYPANOTHION SOUS SA FORME (T(SH)₂) EN REDUISANT LE (T(S)₂) PAR L'INTERMEDIAIRE DU NADPH. LE PRODUIT (T(SH)₂) PEUT INTERVENIR DANS LES ECHANGES THIOLS/DISULPHIDES AVEC D'AUTRES COMPOSES DISULPHIDES (PAR EXEMPLE LE GSSG).

IL SEMBLE DONC QUE LE SYSTEME TRYPANOTHION AIT PRIS LA PLACE DU SYSTEME GLUTATHION CHEZ LES TRYPANOSOMATIDES PUISQU'ON TROUVE PAR EXEMPLE UNE PEROXIDASE DEPENDANTE DU TRYPANOTHION CHEZ *T. BRUCEI* ET *C. FASCICULATA*.

LA BIOSYNTHESE DU GLUTATHION ET DE LA SPERMIDINE S'EFFEC-TUENT COMME POUR LES MAMMIFERES MAIS CES COMPOSES SONT LIES DE MANIERE COVALENTE PAR UNE ENZYME DEPENDANTE DE L'ATP. UNE SECONDE MOLECULE DE GLUTATHION EST ENSUITE AJOUTEE POUR DONNER LE DIHYDROTRYPANOTHION.

LA BIOSYNTHESE DU TRYPANOTHION EST REPRESENTEE SUR LE SCHEMA SUIVANT D'APRES HENDERSON & FAIRLAMB (1987), *Parasitology today*, 3, 312-315.



Lignes courbes: site d'inhibition du DFMO; PUT= putrescine; SPD=spermidine; N1-GSH-SPD et N8-GSH-SPD sont les deux isomères de la glutathion-spermidine; T(SH)₂= dihydrotrypanothion; T(S)₂= trypanothion disulphide; SAM= S-adenosylméthionine; dSAM= S adenosylméthionine décarboxylée; MTA= méthylthioadénosine; PPi= pyrophosphate. P= phosphate inorganique; R-AsO= arsenic aromatique; R-As(S)₂-T= dérivé dithioarsane du dihydrotrypanothion.

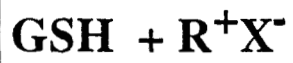
Fig. 9

cibles potentielles de drogues spécifiques du parasite (KRAUTH-SIEGEL L et coll.,1987); (KURIYAN J et coll.,1990).

Par ailleurs, une autre catégorie d'enzymes, les **glutathion S-transférases** ou GST, peuvent également intervenir dans les processus de détoxification (KETTERER B et coll.,1988). Ces enzymes ont été particulièrement bien étudiées chez les **vertébrés**. Ce sont pour la plupart des molécules cytosoliques, présentant de multiples facettes. D'une manière très générale, elles représentent une famille d'enzymes ubiquitaires et multifonctionnelles, impliquées dans la détoxification cellulaire de composés cytotoxiques ou génotoxiques, ainsi que dans la protection des tissus contre le stress oxydatif. Elles peuvent participer au développement de la résistance de certaines cellules (ou organismes) vis-à-vis de drogues électrophiles tels des anticancéreux, des pesticides ou des herbicides. En tant qu'enzyme, leur versatilité est remarquable. Elles catalysent l'addition du groupement thiol du glutathion sur une large variété de substrats électrophiles tels des époxydes ou des quinones. Les conjugués ainsi formés deviennent plus polaires, ce qui facilite leur élimination. Certaines transférases catalysent également des réactions de peroxydation indépendante du sélénium, ou encore des réactions d'isomérisation. En tant que ligands, elles facilitent le transport intracellulaire de nombreux composés hydrophobes tels la bilirubine ou des stéroïdes.

Les GST cytosoliques de mammifères peuvent être divisées en trois classes indépendantes α , μ et π . Composées en général de deux sous-unités d'environ **25 kDa**, de multiples formes homodimériques ou hétérodimériques

REACTIONS CATALYSEES PAR LES
GLUTATHION S-TRANSFERASES



OU

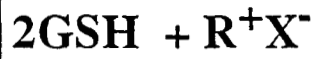


Fig. 10

sont retrouvées et sont le résultat de l'expression de plusieurs gènes. Les hétérodimères inter-classe ne se retrouvent pas *in vivo*. Les trois classes de GST semblent être constituées d'enzymes distinctes alors que les membres d'une même classe représentent des isoenzymes. Retrouvées principalement dans le rein, la muqueuse de l'intestin grêle et surtout le foie, ces enzymes possèdent deux sites actifs indépendants par dimère. Alors que leur structure tridimensionnelle est mal connue (REINEMER P et coll.,1991), le site actif potentiel fixerait le glutathion (G-SITE), et une région hydrophobe (H-SITE) jouerait le rôle d'accepteur pour les substrats électrophiles.

Chez les invertébrés, elles ont été identifiées chez plusieurs espèces dont plusieurs espèces de parasites. (Fig. 11) Leur rôle dans la protection du parasite vis-à-vis de drogues a été démontré dans certains cas (KAWALEK JC et coll.,1984).

Dans notre laboratoire, le rôle immunoprotecteur de la GST, antigène majeur de *Schistosoma mansoni*, a largement été démontré dans divers modèles animaux (CAPRON A et coll.,1989). De même, des études récentes suggèrent que ces enzymes peuvent être utilisées lors de la vaccination contre *Fasciola hepatica* chez le mouton (SEXTON JL et coll.,1990). En revanche, aucun travail n'a mentionné l'existence de telles enzymes chez les protozoaires, à l'exception d'une étude faisant état d'une protéine du stade épimastigote de *Trypanosoma cruzi*, ayant un poids moléculaire de 37 kDa, et exprimant une activité de type GST (YAWETZ A et coll.,1981).

Il semble donc que *Trypanosoma cruzi* possède à la fois des enzymes de détoxification à la fois classiques, ainsi qu'une enzyme tout à fait originale, la

PRINCIPALES GST PARASITAIRES

CLASSE	ESPECE	REFERENCE
<u>Némahelminthes</u>	<i>Dirofilaria diminuta</i>	JAFFE et coll., 1986
	<i>Brugia pahangi</i>	JAFFE et coll., 1986
	<i>Onchocerca gutturosa</i>	PEMBERTON et coll., 1989
	<i>Ascaris suum</i>	DOUCH et coll., 1978
	<i>Haemonchus contortus</i>	KAWALEK et coll., 1984
	<i>Schistosoma japonicum</i>	SMITH et coll., 1986
	<i>Schistosoma mansoni</i>	TAYLOR et coll., 1988 TROTTEIN et coll., 1989
	<i>Schistosoma haematobium</i>	GORILLOT, 1990
<u>Plathelminthes</u>	<i>Echinococcus granulosus</i>	MORELLO et coll., 1982
<u>Cestodes</u>	<i>Hymenolepis diminuta</i>	BROPHY et coll., 1990
<u>Plathelminthes</u>	<i>Fasciola hepatica</i>	HOWEL et coll., 1988
<u>Trématodes</u>		
<u>Trypanosoma-</u> <u>-tidés</u>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	YAWETZ et coll., 1981

FIG. 11

trypanothion-réductase. Ces enzymes n'avaient jusqu'ici été décrites qu' au seul stade épimastigote, exclusivement en vue de cibler des drogues utilisables en prophylaxie humaine.

D. Biologie moléculaire du parasite.

a. Etude du génome.

LANAR DE et coll.,(1981) ont montré que *Trypanosoma cruzi* était un organisme **diploïde**, que le contenu de l'ADN nucléaire faisait environ **2,5 x 10⁸** paires de nucléotides ($2,8 \times 10^{-13}$ g), alors que l'ADN kinétoplastique en contenait **4,9 x 10⁷** paires ($5,4 \times 10^{-14}$ g). En faisant des expériences de réassociation avec des fragments de 0,4 kb, ils ont montré que l'ADN nucléaire serait composé de motifs répétés avec une fréquence de $5,1 \times 10^3$, présents dans 9% des fragments, de motifs peu répétés avec une fréquence de 32, présents dans 51% des fragments, enfin de structures "uni-copie", présentes dans 23% des fragments.

68% de l'ADN présent en une seule copie serait représenté dans l'ARN polysomal. Cet ARN comprendrait **12000** espèces différentes dont 9000 seraient polyadénylées. L'ARN poly A⁺ serait composé de 3 classes d'importance différentes: 2 séquences présentes 3000 fois dans la cellule, 750 présentes 20 fois, et 15000 présentes 1 à 2 fois. Le poids de l'ADN par cellule a été confirmé par KOOY RF et coll.,(1989).

La diploïdie a été confirmée en 1986 par GIBSON WC et coll., par

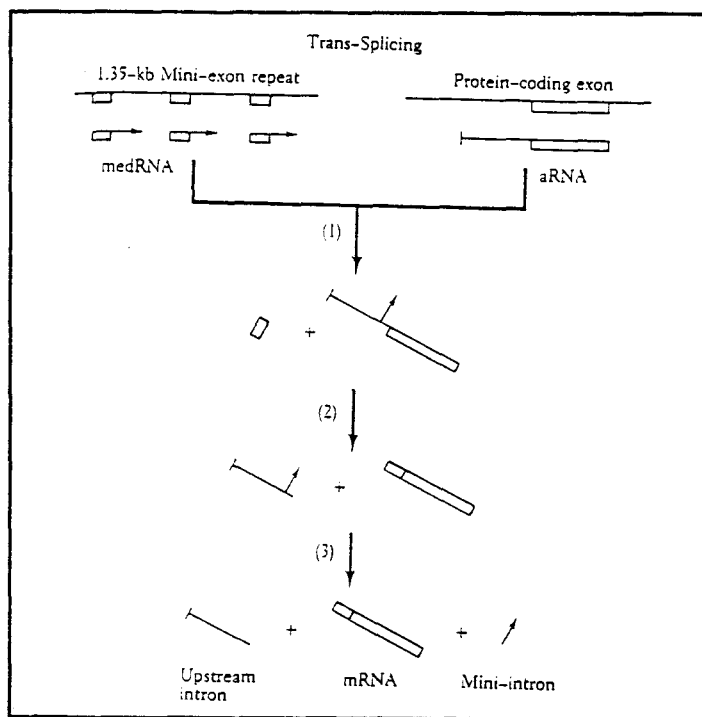
LES CARACTERISTIQUES ORIGINALES DE L'EXPRESSION DES GENES NUCLEAIRES CHEZ LES TRYPANOSOMATIDES

1) BEAUCOUP DE GENES CODANT POUR DES PROTEINES SONT ORGANISES EN TANDEM ET SONT PROBABLEMENT TRANSCRITS SOUS FORME DE LONGS ET MULTIGENIQUES PRE-mARN.

2) UN MINI-EXON DE 39 NUCLEOTIDES OU SL "LEADER", NON TRADUIT, EST PRESENT SUR TOUS LES ARN MATURES.

3) DEUX MOLECULES TRANSCRITES INDEPENDEMMENT SONT JOINTES, LORS D'UNE REACTION BIMOLECULAIRE POUR FORMER UN ARN MATURE.

4) LES SITES D'INITIATION DE LA TRANSCRIPTION DES ARN SONT PERDUS LORS DE LA MATURATION DES ARN.



Modèle de TRANS-SPLICING: une séquence répétée de mini-exons dirige la synthèse des ARN dérivés des mini-exons (med ARN); l'exon codant pour la protéine dirige la transcription de l'ARN accepteur (ARNa). La première étape du TRANS-SPLICING implique la formation d'espèces "branchées", comprenant la portion de l'intron du med ARN, un ARNa, et un mini-exon libre. Dans une seconde étape, les deux exons sont joints de telle manière que les deux introns soient libérés, en espèce "branchée" également. La troisième étape comprend le "débranchement" des espèces "branchées" en deux introns. Cette réaction donne trois produits finaux.

Fig. 12

analyse des gènes de ménage en électrophorèse en champ pulsé. Selon ces auteurs, contrairement à *Trypanosoma brucei* et à ce qui avait été signalé par (GONZALEZ, et coll.,1984), *Trypanosoma cruzi* ne posséderait pas de mini-chromosome. Il aurait environ 250 chromosomes (donc 125 paires), ce qui est le même nombre que *Trypanosoma brucei* en incluant les mini-chromosomes.

b. Caractéristiques originales de l'expression des gènes nucléaires.

Chez tous les trypanosomatidés, et *Trypanosoma cruzi* en particulier, de nombreux gènes codant pour des protéines sont organisés en tandem et sont probablement transcrits sous forme de longs et multigéniques pré-ARNm; on parle d'ARN polycistroniques. D'autre part, un mini-exon de 39 nucléotides ou SL "leader", non traduit est présent sur tous les ARN matures (McCARTHY-BURKE C et coll.,1989). La formation de ces ARN matures est représentée sur la **fig. 12** . Il est à noter en particulier que les sites d'initiation de la transcription de ces ARN sont perdus lors de leur maturation. Bien que certains lui supposent une fonction dans la stabilité des messagers, on ne connaît pas le rôle exact de ce mini-exon, qui est d'ailleurs retrouvé dans une certaine proportion des ARN d'helminthes en particulier (DONELSON JE et coll.,1990) .

c. Antigènes clonés.

Depuis une quinzaine d'années, les gènes codant pour un certain nombre de protéines de *Trypanosoma cruzi* ont été clonés et en partie séquencés

LES ANTIGENES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* CLONES ET SEQUENCES

Référence	Molécules	Criblage	Caractéristiques
Lizardi <i>et coll.</i> 1985	24 kDa	Bq d'ADNc en PUC13	Molécule homologue avec une protéine de porc fixant le calcium.
Peterson <i>et coll.</i> 1986	85 kDa	Criblage d'une bq g. avec un sérum de lapin polyclonal	Exprimée uniquement à la surface des trypomastigotes. Séquence partielle révélant la présence d'un nonapeptide, répété 5 fois (D K K E S G D S E)
Dragon <i>et coll.</i> 1986	85 kDa	Criblage avec un sérum chagastique	Exprimée constitutivement à tous les stades parasitaires. Séquence homologue à une protéine de choc thermique de levure et de drosophile.
Ibanez <i>et coll.</i> 1987	?	Criblage d'une bq g. λ gt11 par des sérums chagastiques	Obtention de divers clones reconnus différemment par des sérums chagastiques et des sérums de lapins infectés.
Beard <i>et coll.</i> 1988	90 kDa	Anticorps monoclonal anti 90 kDa	Molécule exprimée spécifiquement à la surface des trypomastigotes, reconnue par des sérums chagastiques et appartenant à une famille multigénique.
Ibanez <i>et coll.</i> 1988		Criblage d'une bq g. λ gt11 avec des sérums de chagastiques	Obtention de 9 clones dont 7 codent pour des ag contenant des séquences répétées, uniques par clone, allant de 5 à 68 AA.
Requena <i>et coll.</i> 1988	HSP70	Bq g. criblée avec sonde g. HSP70 de drosophile	Molécule possédant 88% d'homologie avec une protéine de choc thermique de <i>T. brucei</i> , et un térapeptide GMFG répété 9 fois en région C terminale.
Engmann <i>et coll.</i> 1989	24 kDa	Bq d'ADNc en λ gt11 et λ ZAP	Protéine flagellaire fixant le calcium.
Engmann <i>et coll.</i> 1989	HSP70		Comparaison des HSP70 de deux souches de <i>T. cruzi</i> : 95% d'identité au niveau des acides aminés.
Requena <i>et coll.</i> 1989	HSP70		Séquence complète d'une HSP70.
Lafaille <i>et coll.</i> 1989	300 kDa (FRA) 220 kDa (CRA)	Criblage d'une bq λ gt11 avec un sérum anti-trypomastigotes	"Flagellar repetitive antigen", possédant une séquence répétée de 204 pb, présente environ 14 fois dans le génome, localisée au niveau du flagelle. "Cytoplasmic repetitive antigen", possédant 23 copies d'un motif de 42 pb, présent une fois dans le génome, uniquement chez les épimastigotes.
Takle <i>et coll.</i> 1989	85 kDa	Bq g. dans λ gt10	Aucune homologie de séquence avec les autres 85 kDa présente à la surface des trps, dont il existe plusieurs copies par génome.

Fig. 13

Peterson <i>et coll.</i> 1989	85 kDa	Etudes génomiques	La 85 kDa de surface des trps appartient à une famille multigénique.
Hoft <i>et coll.</i> 1989	de 180 à 250 kDa	Criblage d'une bq λ ZAP	Clonage de divers antigènes possédant des séquences répétées, dont le rôle dans l'évasion de la réponse immune est discuté.
Lévin <i>et coll.</i> 1989	diverses	Criblage d'une bq λ gt11 avec sérum de patient chronique cardiopathique	En particulier, une molécule de 38 kDa, présente à tous les stades parasitaires, possédant une homologie avec la protéine ribosomale P, impliquée dans la réponse immune dans le SLE.
Van Woorhis <i>et coll.</i> , 1989	160 kDa	Criblage d'une bq λ gt11 avec un sé- -rum de souris réa- -gissant avec les tissus de mammifères	Présente au niveau du flagelle des trps, dont les anti- corps réagissent avec les tissus nerveux de mammifè- -res au niveau de 48 kDa, candidate à l'implication dans des processus auto-immuns.
Affranchino <i>et coll.</i> 1989	SAPA		Antigènes excrétés par les trps lors de la phase aiguë et possédant des séquences répétées.
Cazzulo <i>et coll.</i> 1989	58-60kDa 30-35 kDa	séquence N term	32 AA en position N terminale possédant une homo- -logie avec des cathepsines.
Paranhos <i>et coll.</i> 1990	234 kDa	Criblage d'une bq g. avec sérums cha- -gasiques	Obtention d'un clone reconnu par IgM et IgG de sé- -rums chagasiques aigus, congénitaux et chroniques, codant pour une molécule présente sur les amastigotes et les trps, mais pas sur les épimastigotes de plusieurs souches.
Health <i>et coll.</i> 1990	?	Hybridation soustractive	Clone TC26 dont l'expression est induite par l'AMPc, dont le gène est présent en de multicopies dans le génom, dont l'ARN fait 5 kb, et qui ne présente pas d'homologie particulière.
Krieger <i>et coll.</i> 1990	CRA	Analyse du poly- -morphisme géno- -mique	Le gène codant pour le CRA serait exprimé préférenti- -ellement par les épimastigotes en état de stress et serait polymorphique dans diverses souches.
Eakin <i>et coll.</i> 1990	diverses	PCR	Obtention de plusieurs fragments de cystéine protéases dont celle de <i>T. cruzi</i> .
Gonzales <i>et coll.</i> 1990 kDa	KAP 175	Criblage d'une bq. λ gt11 faite en PCR	Obtention d'un clone codant pour une protéine asso- -ciée au flagelle des épimastigotes et des amastigotes, présente sur les trps, et codée par un seul gène, possé- -dant 4 blocks répétés d'un motif de 9 AA.
Kahn <i>et coll.</i> 1990	85 kDa	Criblage d'une bq d'expression en glutagène par un sérum de souris infectée	Des familles de gènes codent pour les 85 kDa se trouvant en surface des stades présents chez les vertébrés. Une sous-famille est télomérique, les autres pas. Il y a au moins 100 gènes ou pseudogènes dont au moins 9 sont transcrits. Plusieurs 85 Kda sont exprimées à la surface d'un même trp.

Fig. 13 suite

Schijman <i>et coll.</i> 1990			Séquence complète de la protéine ribosomale P.	
Reyes <i>et coll.</i> 1991	SAPA	Etude sérologique sur ag recombinant.	Les sérums de nouveaux-nés infectés congénitalement possèdent des IgG et des IgM spécifiques du SAPA, alors que les sérums de leurs mères ne les possèdent pas.	
Bua <i>et coll.</i> 1991	?	Criblage d'une bq λ gt11 avec un ac monoclonal "protecteur"	Obtention d'un clone codant pour 19 AA, dont le peptide induit une réponse cellulaire et humorale chez la souris.	
Aslund <i>et coll.</i>	20kDa	PCR	Clonage par PCR d'un fragment d'une cysteine fraction d'auto-protéolyse de la 57/51 kDa décrite par Murta <i>et al.</i> , 1990.	1991
Sullivan <i>et coll.</i> 1991	54 kDa	PCR en utilisant des amorces de TR de <i>T. congolense</i>	Trypanothion réductase (TR) de 492 AA, possédant 79% d'homologie avec TR de <i>T. congolense</i> , avec résidus impliqués dans le site catalytique conservés par rapport aux glutathion-réductases, mais résidus impliqués dans le site de fixation au glutathion absents.	
Takle <i>et coll.</i> 1991	85 kDa	PCR	Une des famille de 85 kDa code pour des polypeptides homologues à des neuraminidases.	
Kahn <i>et coll.</i> 1991	85 kDa		Une des famille de 85 kDa est une famille de sialidases, pouvant ainsi contribuer à la pathologie durant l'infection.	
Pollewick <i>et coll.</i> 1991	SAPA	Criblage d'une sous-bq g.	Séquence complète de l'antigène SAPA.	
Ouaissi <i>et coll.</i> 1992	24 kDa	Criblage d'une avec un anti-corps monoclonal	Séquence homologue à la 24 kDa déjà clonée.	

(FRASCH ACC et coll.,1991). Hormis des molécules de structure (SWINDLE J et coll.,1988), ce sont surtout des antigènes qui ont été étudiés par criblage de banques d'expression avec des sérums d'infection, plus rarement avec des sérums polyclonaux monospécifiques ou des anticorps monoclonaux. En consultant la **Fig. 13**, on peut remarquer que parmi les antigènes clonés, beaucoup possèdent des séquences répétées, appartiennent à des familles multigéniques, et/ou sont des molécules majeures. Jusqu'ici, les seules séquences complètes d'ADNc dont nous disposons sont celles d'une cystéine protéase, d'une protéine de choc thermique, de la protéine ribosomale P, d'un antigène excrété en phase aiguë (SAPA), d'une protéine de 24 kDa fixant le calcium et tout récemment la trypanothione-réductase.

3.IMMUNOLOGIE DE LA MALADIE DE CHAGAS.

Concernant les maladies parasitaires, les situations d'immunité stérilisante conduisant à la guérison clinique et à la résistance à la réinfection sont très rares puisque seules la leishmaniose cutanée et la toxoplasmose donnent lieu à une immunité protectrice durable.

L'infection chagasique conduit à une réponse immunitaire qui contrôle le niveau de parasitémie lors de la phase aiguë (ainsi que l'apparition d'une nouvelle phase aiguë). Cependant, cette réponse est inefficace pour enrayer la maladie dont il n'est signalé à ce jour aucun cas de guérison complète. Comme on le verra, cette réponse immune pourrait même être à l'origine des manifestations

cliniques observées en phase chronique.

A. Modèles expérimentaux.

Plusieurs animaux de laboratoire ont été utilisés comme hôtes expérimentaux (souris, rats, cobayes, chiens, lapins et primates). Les travaux menés chez ces divers modèles ont montré que le cours de l'infection est influencé par l'espèce de l'hôte. De plus, les études d'infections expérimentales ont été réalisées en utilisant des stades infectants provenant de diverses sources: trypomastigotes sanguicoles, métacycliques ou de culture. Le **cours typique biphasique de l'infection chagastique** est détectable chez la plupart des modèles animaux. Néanmoins, pour que l'infection chronique ressemble suffisamment à celle de l'homme, il faut que le modèle permette l'isolement du parasite, induise des anticorps détectables par des méthodes sérologiques fiables, développe une pathologie cardiaque et des lésions gastrointestinales, enfin qu'il induise des anticorps réagissant avec des composants tissulaires de l'hôte. Pour ANDRADE ZA (1984), le chien est le modèle le plus proche de l'homme .

Cependant, le modèle expérimental chagastique idéal n'existe pas; ce sont donc les **modèles murins**, en particulier le modèle souris, d'utilisation plus facile, qui ont servi et continuent de servir le plus fréquemment lors des études immunologiques portant sur l'animal.

B. Résistance naturelle.

a. Chez diverses espèces.

Nous avons déjà signalé que les oiseaux et les amphibiens sont complètement réfractaires à l'infection par *Trypanosoma cruzi* (DIAS E,1944). Chez les oiseaux, le mécanisme de résistance est indépendant des anticorps et lié à l'activation du complément par la surface des trypomastigotes sanguicoles. L'activation de la voie alterne *in vitro* par des trypomastigotes dans du sérum de poulet conduit à une lyse des parasites. Des trypomastigotes sanguicoles injectés par voie intraveineuse à des poulets sont détruits en 1 min., ce qui n'est pas le cas si ces derniers sont traités au préalable par le venin de cobra (KIERSZENBAUM F et coll.,1976).

Plus de 100 espèces de mammifères au moins sont susceptibles d'être infectées (BRENER Z,1973).

La résistance naturelle au parasite chez les humains n'a pas été démontrée. Cependant, l'existence d'individus non infectés en haute zone d'endémie demeure troublante.

Chez le rat, il est parfois difficile de détecter des parasites circulants, bien que des moyens, sérologiques par exemple, permettent d'affirmer leur présence.

Diverses souches de souris se comportent de manière différente quant à leur résistance naturelle à l'infection, l'âge et le sexe influant sur cette résistance (KIERSZENBAUM & HOWARD,1976).

b. Bases génétiques de la résistance naturelle chez la souris.

Les bases génétiques de la résistance naturelle de la souris lors de l'infection par des protozoaires ont été étudiées chez plusieurs d'entre elles (ARAUJO FG et coll.,1976; BRADLEY DJ,1977; MORRISON WI et coll.,1978). Dans le cas de *Trypanosoma cruzi*, la souche C3H est hautement susceptible alors que la souche C57BL/10 est réputée pour être beaucoup plus résistante. Il a été clairement établi avec des souris congéniques infectées, que l'haplotype H-2 influençait le déroulement de la maladie. L'haplotype H2k (C3H) est associé à une plus grande sensibilité à l'infection que l'haplotype H2b (C57BL/10) (TRISCHMANN TM et coll.,1982). Des expériences réalisées avec une souche B.10.S (H-2s), qui est une souche exceptionnellement résistante, suggèrent que le faible taux de parasitémie présent chez ces souris (du même ordre que celui de la souche C57BL/10) est influencé par de multiples gènes hors de la région H-2, alors que la survie serait associée à l'haplotype H-2s. Les loci autres que ceux de la région H-2 qui pourraient également être impliqués n'ont pas été étudiés (WRIGHTSMAN R et coll.,1982).

Les mécanismes de défense anti-parasitaire, contrôlés ou non par le complexe majeur d'histocompatibilité, ne sont pas encore élucidés, mais il ne fait aucun doute que les perturbations immunologiques de la phase aiguë sont sous contrôle génétique et sont capitales quant au devenir de la maladie.

C. Résistance durant la phase aiguë.

Comment un hôte infecté arrive-t-il à enrayer la **prolifération parasitaire**, principale caractéristique de la phase aiguë? Si de nombreux points restent à élucider, les récents progrès dans le domaine de l'immunologie ont néanmoins permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes pouvant être impliqués dans la résistance lors des premiers jours ou des premières semaines d'infection.

a. Populations lymphocytaires.

Le rôle de l'immunité à médiation cellulaire bien que non clairement établi et encore controversé, apparaît de plus en plus comme essentiel. Afin de mieux cerner le rôle des lymphocytes dans l'immunité lors de la phase aiguë, il convient de tenir compte des diverses sous-populations lymphocytaires cellulaires, notamment des sous-populations T.

a.1 Premières mises en évidence de la contribution des lymphocytes.

Des travaux déjà anciens ont montré qu'un sérum anti-thymocyte ou une **thymectomie** néonatale augmentaient la parasitémie des souris (SCHMUNIS GA et coll.,1991). De même, KUHN RE et coll.,(1977) ont montré que des **cellules spléniques** de souris en phase aiguë étaient capables de lyser des fibroblastes infectés par *Trypanosoma cruzi* alors que des fibroblastes sains ne sont pas affectés.

a.2 Populations lymphocytaires B et T.

En 1974, ROBERSON EL et coll., montraient qu'un transfert de lymphocytes T ou B pouvait conférer un certain degré de protection chez des receveurs murins susceptibles. D'autres travaux soulignaient la meilleure efficacité protectrice d'une population déplétée en lymphocytes T qu'une population T totale (TRISCHMANN TM,1980). En 1981, SCOTT MT montrait qu'un transfert de cellules spléniques immunes pouvait être partiellement protecteur. La capacité de protection des cellules spléniques était abolie par une déplétion en lymphocytes B, alors qu'elle était pratiquement inchangée lors d'une déplétion en lymphocytes T, suggérant ainsi le **rôle prédominant des lymphocytes B**, le rôle des T étant accessoire.

En revanche, en 1980, REED SG, montrait que le transfert d'une **sous-population enrichie en lymphocytes T** conférait une meilleure protection que celui d'une population enrichie en B. Ces travaux ont été confirmés par BURGESS DE et coll.,(1980) et NOGUEIRA N et coll.,(1981). En 1983 et 1984 TRISCHMANN a effectué des expériences démontrant le rôle prédominant de l'immunité cellulaire T dépendante puisqu'il a en particulier montré que durant les premiers jours de l'infection de souris dépourvues de lymphocytes B, le taux de parasitémie était similaire à celui de souris normales (TRISCHMANN TM,1983; TRISCHMANN TM,1984).

Ces travaux peuvent paraître contradictoires. Cependant, il faut souligner qu'ils ont été réalisés avec des souches parasitaires et des souches de

souris différentes, dans des conditions expérimentales très diverses. D'autre part, les enrichissements ou les déplétions en sous-populations sont imparfaits, ce qui pourrait contribuer à expliquer en partie la variabilité des résultats obtenus.

a.3 Sous populations lymphocytaires T.

Les études des sous-populations T impliquées dans ce phénomène sont très récentes. En 1991, TARLETON RL, a montré que la déplétion en cellules **CD8+** au début de l'infection expérimentale de souris C57/BL hautement résistantes dans des conditions normales, conduisait alors à une incapacité de ces souris à contrôler la parasitémie, cet effet étant beaucoup plus important que lorsque la déplétion est réalisée sur la sous-population **CD4+**. De même, la déplétion en **CD8+** augmente également la susceptibilité de souches plus sensibles. D'autre part, elle annule la protection conférée par une immunisation. Elle est inactive chez des souris en phase chronique, ce qui **restreint le rôle protecteur des lymphocytes T CD8+ à la seule phase aiguë.**

La capacité des cellules **CD8+** à fonctionner comme des **lymphocytes cytotoxiques** pour des cellules infectées par *Trypanosoma cruzi* a été démontrée (RIBEIRO DOS SANTOS R et coll.,1980). Pour être reconnu par un lymphocyte T **CD8+**, l'antigène présent dans le cytoplasme de la cellule présentatrice doit être exposé dans le contexte des antigènes du **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I**, exprimés à la surface de toutes les cellules mononucléées. Le parasite *Trypanosoma cruzi* réside librement dans le cytoplasme de la cellule hôte et certains de ces antigènes sont relargués dans ce

même cytoplasme (ANDREWS NW et coll.,1988). Les antigènes parasitaires peuvent donc être dégradés et présentés par le CMH de classe I. ARAUJO FG (1985) a en effet démontré la présence d'antigènes parasitaires à la surface de cellules infectées, ainsi qu'une cytotoxicité lymphocytaire vis-à-vis de ces cellules.

L'ensemble de ces observations suggèrent donc que les **cellules infectées pourraient servir de cibles aux lymphocytes T CD8+**, dans le contexte du CMH de classe I, et expliquent que cette sous-population lymphocytaire joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection. Pour TARLETON RL (1991), le rôle des populations T dans la résistance à l'infection par *Trypanosoma cruzi* (**Fig. 14**) se limite donc aux **30 premiers jours de l'infection** chez la souris.

b. Anticorps.

b.1 Induction de la réponse humorale.

L'infection aiguë par *Trypanosoma cruzi* est caractérisée par une splénomégalie, ainsi qu'une augmentation de la taille des ganglions, liées en particulier à une **augmentation du nombre de cellules B**. Le taux et la nature des immunoglobulines - spécifiques ou non spécifiques - produites lors de la phase aiguë ont fait l'objet de nombreuses controverses. Néanmoins il est sûr que très tôt, des **anticorps spécifiques** vis-à-vis du parasite sont détectables (FRASCH ACC,1989). Les résultats concernant les taux d'immunoglobulines dans les sérums d'infection sont encore contradictoires. Cependant, chez l'homme on

RELATIONS ENTRE L'ACTIVITE DES CELLULES T, LA PRODUCTION D'ANTICORPS, LA PARASITEMIE ET LA PATHOGENESE DANS L'INFECTION PAR *T. CRUZI* CHEZ LA SOURIS.

Les cellules CD4 et CD8 sont nécessaires durant le tout début de la phase aiguë mais contribuent de moins en moins à la résistance immunitaire au fur et à mesure que s'installe la réponse anticorps. La stimulation du compartiment T pourrait induire des réponses qui contribuent à la pathogénèse. La diminution de l'activité T dans la phase post-aiguë devrait normalement jouer en faveur d'une diminution de cette pathogénèse. Les hôtes pour qui la balance entre la régulation de la charge parasitaire et le régulation des mécanismes immunopathologiques s'établit dans le bon sens devraient survivre à l'infection aiguë sans développer de lésions chroniques trop importantes.

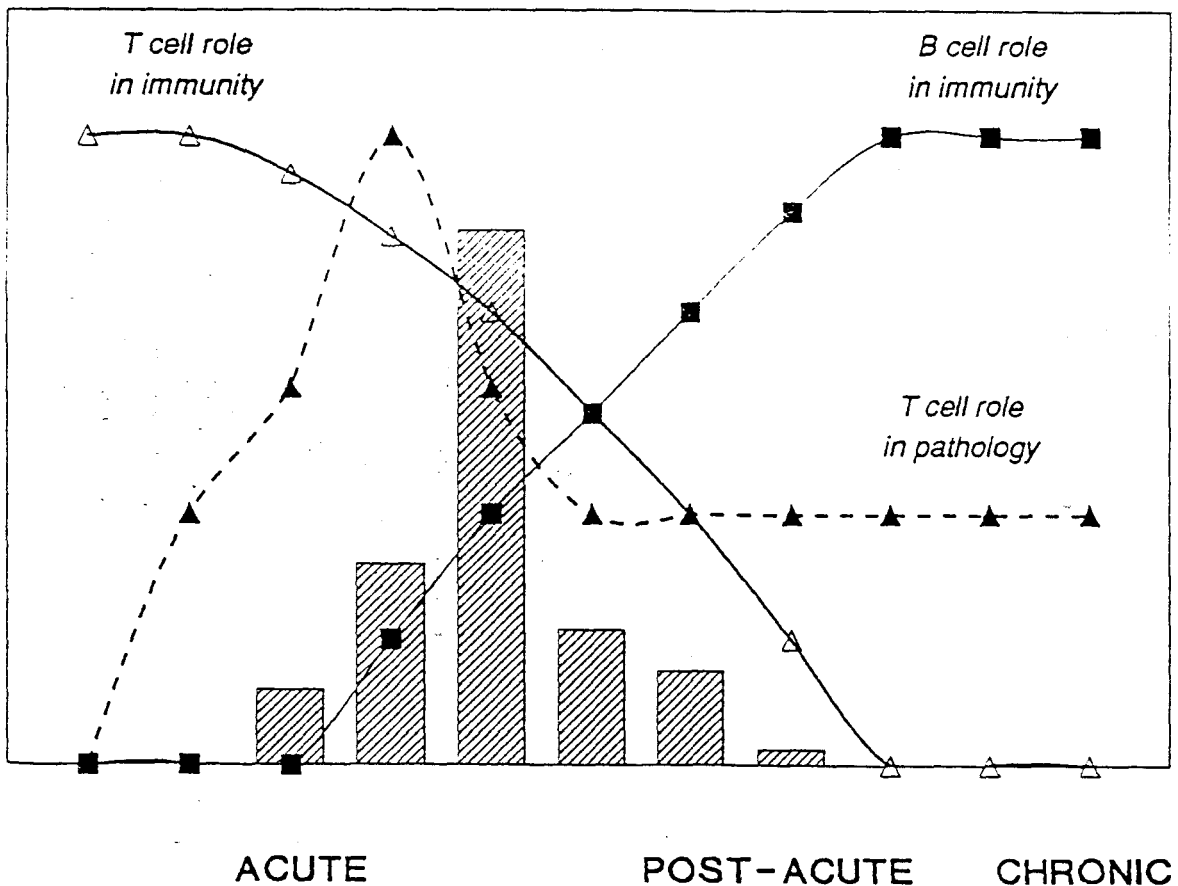


Fig. 14

note une augmentation des IgG et IgM lors de cette phase, alors que chez la souris on assiste à une augmentation des IgG2 et IgG1 (CAPBERN A et coll.,1974).

b.2 Rôle des anticorps.

Il a été démontré très tôt que le transfert de sérums de souris en phase **aiguë** ne protège que très **faiblement** vis-à-vis d'une infection par *Trypanosoma cruzi* (HAUSCHKA TS et coll.,1950). En effet, les anticorps anti-parasitaires définis comme protecteurs n'apparaîtraient qu'après 4 semaines (KRETTLI AU et coll.,1976); (KRETTLI AU et coll.,1984). Les IgM et IgG spécifiques synthétisées dès la première semaine d'infection ne tueraient pas le parasite. Ceci signifierait que le **contrôle initial de l'infection serait indépendant des anticorps** alors que 4 à 5 semaines après, plus de 90% des parasites réinjectés sont éliminés de la circulation en 3 à 10 min.

Par contre, le développement progressif d'une réponse anticorps efficace, la diminution des activités lymphocytaires T dues à la prolifération polyclonale et à l'immunosuppression qui en découle, pourraient expliquer le fait que le rôle "bénéfique" des lymphocytes dans la résistance à l'infection soit limité dans le temps, comme nous allons le voir dans les chapitres suivants.

c. Phagocytes mononucléés.

c.1.Macrophages activés.

Les **monocytes et macrophages**, cellules d'origine mésenchymateuse, jouent un double rôle dans l'infection chagasique, en étant à la fois des cellules hôtes préférentielles et des cellules effectrices de la réponse immune.

En 1955, TALIAFERRO WH et coll., montraient que les macrophages d'animaux immuns pouvaient mieux détruire les parasites que des macrophages d'animaux non immuns.

In vivo, l'administration de particules de silice, spécifiquement toxique pour les macrophages, augmente la parasitémie et la mortalité de souris infectées, alors que l'administration de BCG ou de *Corynebactérium parvum* fixé à la formaline diminue la sévérité de l'infection (KIERSZENBAUM F,1975).

Il a ensuite été établi que les récepteurs Fc des macrophages ne sont pas essentiels pour leur infection. En effet, des trypomastigotes sanguicoles provenant de souris immunodéprimées, non recouverts d'immunoglobulines sont ingérés par des macrophages, bien que l'opsonisation augmente la phagocytose.

Des macrophages péritonéaux normaux de souris saines et des macrophages induits par le thioglycolate, sont des cellules à l'intérieur desquelles le parasite se multiplie. Par contre, des macrophages de souris immunisées avec du BCG (HOFF R,1975), ou infectées par *Toxoplasma gondii* (WILLIAMS DM et coll.,1976) ou *Besnoitia jellisoni* ne peuvent servir à la mise en culture de trypomastigotes et inhibent leur réplication.

L'ensemble de ces travaux montrent donc que des **macrophages activés peuvent tuer les parasites intracellulaires.**

c.2. Lymphokines

Dans ce contexte, l'activité trypanocide des macrophages peut également être induite par incubation avec certaines **lymphokines** pouvant être libérées par stimulation de lymphocytes T sensibilisés par des parasites tués, ou bien secrétées par des lymphocytes T stimulés à la ConA (NOGUEIRA N et coll.,1978; NOGUEIRA, et al.,1981). Ceci a été montré par WIRTH JJ et coll.,(1985), qui ont observé l'augmentation de l'activité trypanocide *in vitro* de macrophages en présence d'IFN γ exogène. Ces travaux ont été confirmés par REED SG (1988), puisqu'il a montré qu'*in vivo* l'injection d'IFN γ recombinant à des souris réduisait à la fois leur parasitémie et leur taux de mortalité. De même, KIERSZENBAUM F et coll. (1984) ont montré que l'IFN β inhibait l'infection *in vitro* de macrophages. Le rôle positif du TNF a également été montré *in vitro* et *in vivo* (de TITTO EH et coll.,1986; BLACK CM et coll.,1989). Enfin, le GMCSF semble avoir également une activité potentialisatrice de l'activité trypanocide des macrophages, à un degré moindre cependant que l'IFN γ (REED SG et coll.,1987).

c.3 Mécanismes de destruction intracellulaire des parasites.

Les mécanismes de destruction intracellulaire de *Trypanosoma cruzi* par des macrophages activés ont longtemps été attribués aux **métabolites**

toxiques de l'oxygène (NATHAN C et coll.,1979), comme cela a également été montré pour d'autres parasites (ROITT I et coll.,1985), destruction inhibée par la catalase par exemple. Ceci est aujourd'hui remis en question puisque McCABE RE et coll.,(1990) ont récemment montré que les stades infectants de *Trypanosoma cruzi* n'induisaient pas d'"explosion respiratoire" au cours de l'infection de macrophages et que des "piégeurs" des métabolites toxiques de l'oxygène ne permettaient pas la multiplication parasitaire dans ces macrophages activés. Ces travaux ont ensuite récemment été confirmés par VRAY B et coll.,(1991). Des **mécanismes de type non oxydatifs** interviendraient donc pour limiter l'infection.

D. Résistance lors de la phase chronique .

Certaines études montrent qu'une partie des mécanismes effecteurs lors de la phase chronique peuvent être à médiation cellulaire. Par exemple, ARAUJO (1985) a montré que des lymphocytes de souris chroniquement infectées peuvent détruire des cellules infectées. Cependant, la plupart des études mettent en évidence que la **résistance immune lors de cette phase serait due à des mécanismes dépendant d'anticorps.**

a. Mise en évidence du rôle protecteur des anticorps.

Des transferts passifs de sérums immuns ou de leur fraction **IgG**

provenant d'animaux infectés **chroniquement** protègent partiellement des souris vis-à-vis d'une infection létale. De plus, la préincubation de trypomastigotes avec du sérum de phase chronique diminue leur infectivité (MacHARDY N,1977). La parasitémie et la mortalité sont beaucoup plus élevées chez des souris de BIOZZI mauvaises répondeuses en anticorps que chez des souris de BIOZZI bonnes répondeuses (KIERSENBAUM & HOWARD,1976).

Des études isotypiques ont montré que ce sont les IgG de souris spécifiques de *Trypanosoma cruzi*, en particulier les **IgG1 et IgG2**, et non les IgM, qui seraient impliquées dans la résistance à l'infection par *Trypanosoma cruzi* (TAKEHARA HA et coll.,1981).

b. Prise en compte des diverses souches parasitaires.

Les différentes souches parasitaires varient quant à l'induction d'une réponse humorale protectrice. En effet, des trypomastigotes de souche Y sont agglutinés par des sérums de souris anti-trypomastigotes Y, par des sérums de souris anti-trypomastigotes CL, ainsi que par des sérums de patients chagasiques. Inversement des trypomastigotes de souche CL ne sont pas agglutinés par des antisérums homologues ou hétérologues. De plus, l'incubation de trypomastigotes Y avec du sérum immun les rend avirulents chez la souris, ce qui n'est pas le cas pour des trypomastigotes CL.

Dans ce contexte, l'injection de sérum de souris chronique à des souris saines diminue la parasitémie et la mortalité lors d'une infection d'épreuve par la souche Y mais non par la souche CL. Les trypomastigotes Y sont facilement lysés

par du sérum immun en présence de complément, ce qui n'est pas le cas pour les parasites CL (KRETTLI & BRENER,1976). Donc ces deux souches auraient des comportements radicalement opposés quant à leur susceptibilité à la réponse humorale. Ceci peut probablement être extrapolé à d'autres souches si l'on tient compte de **l'extrême diversité des souches naturelles.**

c. Anticorps lytiques versus anticorps conventionnels.

Certains travaux soulignent que le mode d'induction des anticorps est capital et font apparaître une dichotomie entre deux types d'induction.

Il a été montré en effet que l'immunisation avec des parasites atténués, des homogénats ou des fractions parasitaires, induisent une forte réponse spécifique composée d'**anticorps conventionnels** (CSA pour conventional serological antibodies). Cependant la résistance à l'infection en vaccinant des souris avec des parasites fixés ou des fractions parasitaires est partielle ou absente.

A l'inverse, selon KRETTLI AV et coll.,(1982), les **anticorps protecteurs** (LA pour lytic antibodies) reconnaissent à la **surface des trypomastigotes vivants**, des molécules cibles des mécanismes de lyse dépendant du complément. Ce type d'anticorps ne pourrait être **induits que par immunisation avec des parasites vivants ou par infection naturelle.** Leur détection peut s'effectuer par diverses techniques: lyse de parasites vivants par les anticorps en présence du complément, immunofluorescence sur des parasites vivants, efficacité lors d'un transfert passif....Un traitement "efficace" contre la maladie de Chagas arrêterait la production de ces anticorps LA, alors

qu'il serait sans effet sur celle des anticorps CSA qui peuvent persister de nombreuses années.

Ces travaux n'expliquent pas le pourquoi de cette dichotomie entre anticorps LA et CSA, ils ont en plus le désavantage d'offrir peu de perspectives à un éventuel vaccin. Par ailleurs, ils ont été contredits par d'autres équipes. En effet, YOSHIDA N,(1986) a montré que l'immunisation avec des antigènes de surface pouvait induire l'apparition d'anticorps lytiques, et SEGURA EL et coll.,(1986) et RUIZ AM et coll.,(1990) ont obtenu des anticorps monoclonaux non lytiques *in vitro* bien que protecteurs par transfert passif.

d. Mécanismes de la lyse des parasites par l'intermédiaire du complément.

Les **épimastigotes** activent la voie alterne du complément en absence d'anticorps. Les **amastigotes** sont par contre résistants à la lyse par l'intermédiaire du complément (JOINER K et coll.,1986). Les **trypomastigotes** sont également résistants, à moins d'être exposés à la trypsine, chauffés ou incubés au préalable avec des sérums de patients en phase chronique. De même, des anticorps d'animaux infectés (ou immunisés) peuvent lyser des formes de culture ou des formes sanguicoles de *Trypanosoma cruzi* en présence de complément (BUDZKO DB et coll.,1975); (KIERSZENBAUM & HOWARD,1976).

Des F(ab')₂ ou des Fab sont capables de faire activer la voie alterne par les trypomastigotes. Dans le cadre des travaux de BRENER, les anticorps lytiques interfèrent avec la cascade du complément qui a lieu à la surface des

trypomastigotes et la lyse ne requiert pas la présence de la portion Fc (KRETTLI AU et coll.,1985).

f. Autres modes d'action des anticorps.

La plupart des cellules possédant un récepteur Fc notamment les éosinophiles (SANDERSON CJ et coll.,1977; KIPNIS TL et coll.,1981), les neutrophiles (KIPNIS, et al.,1981), les macrophages, les lymphocytes (OKABE K et coll.,1980) et les basophiles (TAMBOURGI DV et coll.,1989) ont été décrites comme étant des cellules effectrices intervenant dans des **mécanismes d'ADCC** (antibody-dependant-cell-cytotoxicity) vis-à-vis des formes trypomastigotes ou épimastigotes. Seuls les anticorps lytiques seraient susceptibles d'induire des mécanismes d'ADCC (LIMA-MARTINS MVC et coll.,1985). Il faut également souligner qu'une synergie a été observée *in vivo* entre l'IFN γ et des anticorps spécifiques (PLATA F et coll.,1987).

Il a déjà été mentionné l'existence de récepteurs parasitaires à la surface des trypomastigotes, qui permettent au parasite d'adhérer et de pénétrer dans la cellule hôte. Certains travaux montrent que des anticorps anti-récepteurs parasitaires peuvent bloquer l'infection de cellules *in vitro* (ALVES MJM et coll.,1986). La pertinence de ce mode d'action des anticorps n'a pourtant pas été démontrée *in vivo*.

E. Evasion des défenses de l'hôte.

La **localisation intracellulaire** des amastigotes est certainement un facteur clé quant à la survie du parasite au cours de l'infection. Les mécanismes par lesquels les amastigotes **échappent aux défenses de l'hôte** et se multiplient dans une **cellule phagocytaire** sont loin d'être connus. Il semble que le lysosome macrophagique fusionnerait avec la vacuole parasitophore contenant le parasite, qui sécréterait alors une protéase, active à pH acide appelée hémolysine qui détruirait le phagolysosome, permettant la libération du parasite dans le cytoplasme où il se multiplierait (ANDREWS N et coll.,1989).

Par quels **mécanismes d'évasion des trypomastigotes sanguicoles** arrivent-ils à survivre dans un environnement hostile et à échapper aux mécanismes effecteurs de la réponse immune?

Les récents travaux de caractérisation biochimique et de biologie moléculaire laissent apparaître une **incroyable diversité des antigènes parasitaires**, alors qu'ils écartent pour l'instant l'hypothèse d'une variation antigénique, bien qu'elle ait été discutée.

La diversité antigénique joue certainement un rôle dans ces mécanismes d'échappement, ainsi que la présence à la surface des trypomastigotes de nombreuses protéines de l'hôte (WOOD JN et coll.,1982). Il s'agirait alors du phénomène de "**masquage antigénique**" entraînant une modification des antigènes du soi, phénomène grâce auquel le parasite serait alors capable d'induire une réponse auto-immune, dont certains auteurs suggèrent qu'elle serait importante dans la pathogénèse de la phase chronique (PETRY K et coll.,1989).

L'**acquisition d'antigènes de l'hôte**, décrite pour les trypomastigotes (CHESS Q et coll.,1983), pourrait également jouer un rôle dans

la déviation de la réponse immune de l'hôte.

De plus, le parasite peut fixer les parties Fc des IgG et cette fixation pourrait interférer avec des mécanismes de lyse par l'intermédiaire du complément ou des mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. Les trypanostigotes sanguicoles peuvent de plus cliver les IgG fixées à leur membrane par l'action d'une protéase parasitaire, libérant les fragments Fc, les parties Fab restant à la surface et permettraient au parasite d'échapper aux mécanismes de défense mettant en jeu les portions Fc. Ce phénomène est connu sous le nom de "**FABulation**".

Enfin, l'échappement peut se produire par "**capping**" et libération d'antigènes d'excrétion-sécrétion pouvant conduire à la formation de complexes immuns circulants.

F. Immunopathologie de la phase aiguë.

L'infection chagasique provoque un **dysfonctionnement du système immunitaire** de l'hôte. Nous verrons que les altérations immunologiques se déroulant lors de la phase aiguë peuvent avoir des conséquences sur l'immunopathologie de la phase chronique et conduire ainsi à une maladie auto-immune.

Il faut ici rappeler que durant cette phase, les parasites sont détectables dans la circulation et les tissus, accompagnés d'infiltrats cellulaires inflammatoires.

a.: Activation polyclonale.

Les réponses immunes à la fois humorale et cellulaire sont en partie dirigées spécifiquement vis-à-vis du parasite (CLINTON BA et coll.,1975; ROWLAND EC et coll.,1987; FRASCH,1989).

On assiste cependant à une **prolifération** massive de **toutes les classes de lymphocytes** (MINOPRIO P et coll.,1986b; MINOPRIO P et coll.,1986a) qui se traduit par une augmentation de la taille de la rate et des ganglions (O'DALY JA et coll.,1984). L'activation polyclonale lymphocytaire B serait dépendante des lymphocytes T "**helper**" (d'IMPERIO LIMA MR et coll.,1985); (RITTER DM et coll.,1990) chez la souris puisque qu'elle est abolie par l'élimination de cette sous-population suite à l'administration d' anticorps anti-CD4 (MINOPRIO P et coll.,1987).

Une activation et une prolifération lymphocytaire T s'observent également chez la souris en phase aiguë infectée par la souche CL, accompagnées d'une activité CTL (MINOPRIO, et al.,1986a) pouvant être abolie par un traitement avec des anticorps anti-CD2 et du complément, par une thymectomie de souris, et enfin par un traitement par des anticorps anti-CD4 et du complément. Cette prolifération de CTL se produit *in vitro* mais non *in vivo*, puisque des souris infectées sont incapables de rejeter des tumeurs induites par le virus de Gross.

Donc, on peut dire qu'au cours de cette phase, la prolifération et l'activation polyclonale de toutes les classes de lymphocytes serait en partie spécifique, mais également plus **largement dirigée au hasard** et complètement aspécifique.

b.: Immunosuppression.

En même temps, apparaissent les phénomènes d'**immunosuppression**, c'est à dire une incapacité à répondre aux antigènes hétérologues. Observée à la fois dans le modèle humain et le modèle souris lors de la phase aiguë, elle est supposée faciliter la dissémination du parasite chez l'hôte et ainsi **contrebalancer** les mécanismes effecteurs de la réponse immune.

C'est l'**activation polyclonale** elle même, qui pourrait être à l'origine de l'immunosuppression observée car elle conduirait à un épuisement de cellules réactives, qui seraient incapables de répondre aux stimuli antigéniques, comme cela a été démontré dans le cas de l'infection par *Trypanosoma brucei* (CORSINI AC et coll.,1977)

Cependant d'autres phénomènes pourraient expliquer cette immunosuppression. Il s'agirait selon les auteurs de l'existence de **populations** macrophagiques (CUNNINGHAM DS et coll.,1980; KIERSZENBAUM F,1982 ; HAREL-BELLAN A et coll.,1983; RITTER and KUHN,1990) et lymphocytaires T **suppressives** (TARLETON RL et coll.,1987;TARLETON RL,1988) , ou bien encore de l'existence de **substances** immunosuppressives d'origine parasitaire (MALEKAR JR et coll.,1983) ou cellulaire (CUNNINGHAM & KHUN,1980; LIEW FY,1988; SERRANO LE et coll.,1987).

Les études réalisées sur **l'IL2**, cytokine jouant un rôle central dans la

régulation du système immunitaire et son récepteur (IL2-R), concernant les mécanismes pouvant expliquer cette immunosuppression illustrent de manière claire qu'il faut se garder de généraliser les observations faites sur le modèle murin.

*c.: Altération de la production d'IL2
chez la souris.*

Comme cela a également été observé pour la leishmaniose viscérale murine (REINER NE et coll.,1983), chez la souris infectée par *Trypanosoma cruzi* en phase aiguë, on assiste à une **diminution de la production d'IL2**, cytokine libérée par les lymphocytes activés et requise pour initier une réponse immune (SMITH KA,1980). En effet, des cellules T spléniques de souris en phase aiguë stimulées par la ConA ne produisent pas d'IL2, et ne répondent pas non plus à de l'IL2, ce phénomène n'étant pas aboli par l'addition d'IL1, et étant probablement dû à une population Thy1-, c'est à dire à une population non T probablement **macrophagique** (HAREL-BELLAN A, et coll.,1983).

Au contraire, d'autres travaux ont montré que l'**addition d'IL2 exogène restaurait en partie la prolifération lymphocytaire** induite par la ConA (TARLETON RL et coll.,1984). Des études *in vivo* ont également montré que l'injection d'IL2 et de globules rouges de moutons (GRM) à des souris infectées permettait en partie de restaurer la réponse vis à vis de ces GRM.

Par ailleurs, l'injection de multiples doses d'IL2, toujours chez des souris infectées, induit une réduction de la parasitémie et une augmentation de la

survie des animaux (CHOROMANSKI L et coll.,1985). Cette **immunothérapie utilisant l'IL2** chez la souris infectée a également permis d'obtenir une diminution de l'infection des cellules du myocarde (HULSEBOS LH et coll.,1989).

d.: Altération de l'expression de certains marqueurs lymphocytaires chez l'homme.

Dans le modèle humain, l'effet de *Trypanosoma cruzi* sur la capacité de cellules mononucléées du sang périphérique à répondre à des agents connus pour activer de manière différente les cellules T, a été étudié. En présence de parasites et d'une variété de mitogènes (PHA, ConA, ou pokeweed mitogen), **une suppression des réponses prolifératives non-spécifiques** est observée dans tous les cas (BELTZ LA et coll.,1987). Une telle suppression est également retrouvée lorsque les cultures sont réalisées en présence d'anticorps monoclonal anti-CD3 ou anti-CD2 (BELTZ LA et coll.,1990). La possibilité que **l'expression du récepteur à l'IL2 (IL2-R)** soit altérée découle du fait que l'addition d'IL2 exogène est incapable de restaurer cette incapacité des lymphocytes à répondre à la PHA (BELTZ & KIERSZENBAUM,1987). Des expériences de cytométrie de flux, réalisées dans tous les systèmes d'activation utilisés ont confirmé cette hypothèse (BELTZ LA, et coll.,1990; BELTZ LA et coll.,1988) en mettant en évidence à la fois une réduction du pourcentage de cellules exprimant l' IL2-R, ainsi qu'une réduction du nombre moyen de molécules d'IL2-R à la surface des lymphocytes.

Le **récepteur de haute affinité pour l'IL2** sur les lymphocytes est formé d'un complexe d'au moins deux protéines: la **p55** et la **p70** (WEISSMAN AM et coll.,1986). Alors que ces deux chaînes peuvent fixer indépendamment l'IL2 avec respectivement une affinité faible et intermédiaire, l'hétérodimère formé des deux chaînes fixe l'IL2 avec une haute affinité et est responsable de l'internalisation de l'IL2 et du signal de transduction requis pour l'activation des lymphocytes. Les expériences de cytométrie de flux ont été réalisées en utilisant un anticorps monoclonal **anti-TAC** (pour T Activated Cell), reconnaissant un épitope de la p55 (UCHIYAMA T et coll.,1981).

Cependant ces premiers travaux n'ont pas permis de savoir si l'expression de la seule p55 ou bien des deux chaînes était altérée. Donc, dans un premier temps, des expériences de fixation de l'IL2 sous des conditions de haute affinité ont permis de montrer l'existence d'une inhibition de cette fixation par des lymphocytes périphériques cultivés en présence de parasites et stimulés par la PHA (KIERSZENBAUM F et coll.,1989). Dans un second temps, des expériences de "cross-linking" ont démontré que l'expression des deux chaînes était bien altérée (KIERSZENBAUM, et coll.,1989).

L'ensemble de ces résultats confirment donc que la **suppression** associée avec la phase aiguë chez l'homme résultait en partie de **l'altération de l'IL2-R**. Des travaux précédents avaient montré que l'effet suppresseur de *Trypanosoma cruzi* n'était pas dû à la consommation par le parasite de nutriments essentiels du milieu de culture, ni à une absorption de mitogène, ni à une toxicité du parasite vis-à-vis des lymphocytes (BELTZ & KIERSZENBAUM,1987).

Le parasite pouvait induire normalement la sécrétion d'IL1, cytokine produite par les macrophages et les monocytes, potentialisant les réponses T, ce qui suggère que cette molécule n'intervenait pas dans la suppression observée (BELTZ, et coll.,1988).

De plus, la voie d'activation lymphocytaire passant par la molécule **CD2**, indépendante de la présence de macrophages est également supprimée par *Trypanosoma cruzi* (BELTZ, et coll.,1990).

Un certain nombre de molécules de surface lymphocytaires T, telles que l'**IL2-R** ou le **récepteur à la transferrine** sont exprimées seulement après **activation** et sont indispensables à l'engagement des lymphocytes dans leur cycle de division.

D'autres molécules en revanche, telles les molécules **CD3**, **CD4**, et **CD8**, sont exprimées aussi bien sur des lymphocytes au repos que sur des lymphocytes activés mais jouent cependant un rôle dans l'activation de ces derniers.

La molécule **CD3** est un composant du **récepteur T** et est impliquée dans la transduction du signal généré par l'antigène (ALLISON JP et coll.,1987).

Les molécules **CD4** et **CD8** contribuent à la fois à l'**adhésion** des lymphocytes T aux cellules présentatrices d'antigènes et à l'**activation** lymphocytaire en interagissant avec le complexe CD3-récepteur T (PARNES JR,1989; SCHREZENMEIER H et coll.,1988).

Une corrélation entre l'altération de l'expression de l'IL2-R et de ces molécules a été démontrée (SZTEIN MB et coll.,1990). En effet, des expériences de cytométrie de flux ont montré que l'altération de l'expression de l'IL2-R se

produisait à la fois chez les sous-populations CD4+ et CD8+ et était accompagnée de l'altération de l'expression de ces mêmes molécules, qui ne se produisait qu'en présence de mitogène et de parasite mais pas en présence du seul parasite. Ceci suggère que l'**activation lymphocytaire** est nécessaire pour que le parasite exerce son effet **immunosuppresseur**. Il faut noter aussi que l'expression d'un autre marqueur d'activation lymphocytaire, le **récepteur à la transferrine** (TfR) est également supprimée par *Trypanosoma cruzi* alors que l'expression du marqueur EA-1 n'est pas altérée (BELTZ, et coll.,1990).

L'ensemble de ces observations indique donc que les altérations causées par *Trypanosoma cruzi* sont **sélectives quant à l'expression des marqueurs d'activation lymphocytaires**.

Les phénomènes que nous venons de décrire pour la phase aiguë, à savoir activation polyclonale et immunosuppression ne sont pas restreints à cette phase. De même, nous allons voir que les prémices d'une pathologie auto-immune peuvent se rencontrer dès la phase aiguë chez la souris. En effet, (RIBEIRO DOS SANTOS & HUDSON,1980) ont montré que dès le 15^o jour d'infection, les souris BALB/c possédaient des lymphocytes cytotoxiques vis-à-vis des antigènes parasitaires et qu'à partir du 60^ojour, apparaissaient des lymphocytes cytotoxiques pour des lignées syngéniques de muscle ou de neurone, lymphocytes par ailleurs incapables de tuer des cellules HeLa. De la même manière, (VELGE, et coll.,1991) ont montré que les lymphocytes T pouvaient être infectés par le parasite et qu'ils étaient des cibles potentielles de mécanismes d'ADCC, du fait qu'ils exprimaient des antigènes parasitaires à leur surface.

G. Immunopathologie de la phase chronique.

Les causes exactes entraînant la pathologie que nous avons déjà décrite ne sont pas totalement élucidées, mais de plus en plus d'évidences tendent à prouver qu'elle est d'origine **auto-immune** (Fig. 15). Plusieurs explications peuvent être avancées pour expliquer l'apparition de cette auto-immunité.

L'infection chagastique perturbant comme nous l'avons vu la réponse immune de l'hôte, en entraînant des dérégulations des fonctions cellulaires T et B, notamment avec une **stimulation polyclonale** suivie d'une **immunosuppression**, pourrait conduire à une perte de tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. D'autre part, l'existence d'épitopes "cross-réactifs" entre le parasite et son hôte vertébré - "**mimiquerie moléculaire**" - pourrait, elle aussi, conduire à des phénomènes auto-immuns. Enfin, un autre type de mimiquerie pourrait intervenir, à savoir la "**mimiquerie**" **fonctionnelle**, concernant les protéines parasitaires qui possèdent des fonctions analogues à des molécules de l'hôte.

a.: Réponse cellulaire.

Tout d'abord, il semble que l'**activation polyclonale des lymphocytes B** persiste dans les phases tardives de l'infection expérimentale

**TRYPANOSOMA CRUZI: HYPOTHESE D'UNE
MALADIE AUTO-IMMUNE.**

**ENTREE DES TRYPOMASTIGOTES DANS LA CIRCULATION,
SUIVIE DE L'INFECTION DES CELLULES HÔTES, DE LA DISSE-
MINATION DU PARASITE DANS TOUT L'ORGANISME AVEC UN
TROPISME CARDIAQUE PARTICULIEREMENT MARQUE S'AC-
COMPAGNANT DE LA LIBERATION D'ANTIGENES
PARASITAIRES.**



AU DEBUT DE L'INFECTION,

**ON ASSISTE A UNE PROLIFERATION POLYCLONALE DES
LYMPHOCYTES B ET T, SUIVIE D'UNE IMMUNOSUPPRESSION,
ET D'UNE ALTERATION SOIT DE LA PRODUCTION D'INTER-
LEUKINES (IL2 CHEZ LA SOURIS), SOIT DE L'EXPRESSION DE
CERTAINS MARQUEURS LYMPHOCYTAIRES (RECEPTEUR à
L'IL2 CHEZ L'HOMME).**



PLUS TARDIVEMENT,

**IL Y AURAIT L'APPARITION DE CELLULES T ANTI-SOI
(EX:ANTI-CELLULES CARDIAQUES) ET D'AUTO-ANTICORPS
(EX:ANTI-CELLULES MUSCULAIRES, ANTI-NEURONES)**



LORS DE LA PHASE CHRONIQUE,

**L'ENSEMBLE DE CES PERTURBATIONS DU SYSTEME IMMUNI-
TAIRE CONDUIRAIT AUX MANIFESTATIONS
PATHOLOGIQUES OBSERVEES.**

Fig. 15

chez la souris (d'IMPERIO LIMA MR et coll.,1986).

Par ailleurs, REED SG et coll.,(1989) ont montré que l'immunosuppression observée chez la souris en phase aiguë se poursuivait également en **phase chronique**.

a.1. Macrophages.

L'addition d'**IL1** exogène et de **GMCSF** (pour granulocyte macrophage colony stimulating factor) restaure la capacité T helper des lymphocytes de ces souris, leur permettant ainsi de monter une réponse anticorps (REED, et coll.,1987), comme cela avait été observé pour l'**IL2** en phase aiguë. Ces résultats suggèrent que les **macrophages** pourraient être impliqués dans le dysfonctionnement de la fonction T helper.

a.2. Lymphocytes.

Il a été montré que des lymphocytes de **lapins** chagasiques chroniques peuvent fixer et à la fois détruire des cellules cardiaques de lapin sain et des cellules cardiaques de lapin infecté (SANTOS-BUCH CA et coll.,1974) et que l'injection de fractions subcellulaires de *Trypanosoma cruzi* provoquerait des lésions cardiaques chez des lapins sains.

Le transfert de cellules spléniques non adhérentes de **souris** infectées à des souris saines syngéniques est également capable d'induire une pathologie similaire à la pathologie cardiaque chronique (LAGUENS RP et coll.,1981).

Chez l'**homme**, il a été montré que des lymphocytes T de patients

chagasiques, prélevés en phase aiguë, et dans un moindre degré en phase chronique, étaient capables de lyser des cellules cardiaques humaines infectées et non infectées. Ces résultats suggèrent que des mécanismes auto-immuns peuvent survenir en phase aiguë de l'infection (TEIXEIRA ARL et coll.,1978).

a.3. Sous-populations lymphocytaires CD4 chez la souris.

En utilisant le modèle de la souris infectée chroniquement par la souche CL , SAID G et coll.,(1985) ont observé l'apparition de **lésions du système nerveux périphérique**, notamment semblables à celles qui ont été décrites récemment chez l'homme (PALMIERI JR et coll.,1984), où des granulomes inflammatoires accompagnés de démyélinisation ont été mis en évidence le long du nerf sciatique.

Des cellules T, **CD4+** de souris chroniquement infectées, sont capables de **transférer une pathologie** au niveau du nerf sciatique, une fois inoculées par voie intraveineuse à des souris saines (HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M et coll.,1987). De même, des **lignées CD4+**, provenant de souris infectées, mises en culture en présence de l'antigène parasitaire ou en présence d'un extrait de nerf sciatique de souris, peuvent induire 48 heures après leur injection intra-neurale chez des souris saines, des granulomes inflammatoires ayant les mêmes caractéristiques que ceux observés durant la phase chronique. Elles peuvent provoquer une réaction d'hypersensibilité retardée chez une souris saine lorsqu'elles sont injectées dans le coussinet plantaire en même temps que

l'antigène qui a été utilisé lors de leur culture (BEN YOUNES-CHENNOUFI A et coll.,1988).

a.4. Rôle des cellules Th2.

Une de ces lignées a été caractérisée en terme de production de lymphokines (SPINELLA S et coll.,1989). Elle sécrétait à la fois de l'**IL4**, de l'**IL5** et de l'**IL6**, à activités potentiatrices sur les cellules B, (mais ne sécrétait ni d'**IL2** ni d'**IFN γ**), ce profil étant caractéristique d'une **lignée Th2** (MOSMANN T et coll.,1989). De plus, cette lignée, ou son surnageant, induisait *in vivo* une activation polyclonale des lymphocytes B similaire à celle observée chez des animaux infectés, avec un même profil de production d'IgG2a et d'IgG2b. L'ensemble de ces résultats suggérait que les **cellules Th2** pouvaient être impliquées dans l'**immunopathologie** observée chez les souris chroniquement infectées. De manière classique, ce sont plutôt les cellules Th1 qui induisent une hypersensibilité retardée. A ce titre, la possibilité d'existence d'autre sub-divisions à l'intérieur des sous-populations Th1 et Th2 n'est pas à exclure (WONG RL et coll.,1988).

a.5. Rôle des cellules B CD5.

Dans le contexte de la dichotomie existante dans la population CD4, l'**IL10** a été décrite comme sécrétée par les Th2 et comme inhibant la prolifération des Th1 (FIORENTINO D et coll.,1989). Il a été montré récemment

que durant la phase aiguë chez la souris, on assistait à une expansion des cellules **B CD5⁺**, cellules qui sont prédominantes durant la vie pré-natale, mais qui sont minoritaires chez l'adulte (MINOPRIO P,1991). Ces cellules semblent jouer un rôle dans la **sélection du répertoire lymphocytaire** et dans des phénomènes d'**auto-immunité** (HERZENBERG LA et coll.,1986b). Les cellules B CD5⁺ naturellement activées chez la souris saine, et impliquées dans la production d'auto-anticorps, sont stimulées de manière polyclonale chez des souris présentant des désordres de type auto-immuns (HAYAKAWA K et coll.,1983). Lorsqu' une déplétion en CD5 est obtenue après une irradiation de souris adultes, et une reconstitution avec une moelle osseuse autologue, ces souris infectées par *Trypanosoma cruzi* ne développent que de très faibles réponses lymphocytaire B (MINOPRIO P et coll.,1989).

Cependant la réponse polyclonale B chez les animaux normaux ne peut être attribuée directement aux cellules CD5, parce qu'elle n'est pas restaurée chez des souris irradiées qui ont reçu des cellules B. Cette restauration des réponses B n'est obtenue que lorsque les souris reçoivent en plus des **lymphocytes T périphériques**. Ces résultats suggèrent donc qu'une population T, sensible à l'irradiation est requise pour obtenir une réponse B satisfaisante.

Ces observations ont été confirmées après l'utilisation de souris portant la mutation *Xid*, liée au chromosome X, qui conduit à un blocage du développement des cellules B CD5 (HERZENBERG LA et coll.,1986a). En effet alors que ces animaux répondent de manière polyclonale au parasite, les taux d'anticorps spécifiques et non spécifiques sont 10 fois plus faible que chez des souris normales. De manière surprenante, ces souris *Xid* contrôlent aussi bien



leur parasitémie que le développement de leurs lésions chroniques.

Donc, les cellules B CD5 semblent être importantes dans l'établissement des réponses lymphocytaires vis-à-vis du parasite. (MINOPRIO P,1991) suggère que ces cellules sont impliquées dans la potentialisation des réponses lymphocytaires B, ou dans l'augmentation de l'**activité Th2**, comme cela a déjà été décrit (GO NF et coll.,1990). L'hypothèse est donc que les **cellules B CD5, capables de produire de l'IL10, augmentent les réponses des lymphocytes CD4+ Th2, qui à leur tour, suppriment les activités des CD4+ Th1**, conduisant ainsi à une forte activation des lymphocytes B conventionnels et la production d'IgG2a et d'IgG2b.

b: Rôle des anticorps.

Quand aux **auto-anticorps** observés lors de l'infection chagasique, sont-ils un épiphénomène ou bien ont-ils un réel rôle dans la pathogénèse?

Pendant longtemps, les anticorps EVI (pour endothelial vascular interstitiel auto-antibodies) réagissant avec la membrane plasmique des muscles striés et des cellules endothéliales ont été suspectés d'être à la base de l'immunopathogénèse de la maladie de Chagas (RIBEIRO DOS SANTOS R et coll.,1979). Retrouvés chez 95% des malades cardiopathiques et 45% des malades asymptomatiques (COSSIO PM et coll.,1974), ils ont ensuite été détectés lors d'**autres parasitoses, (leishmanioses)** (TOWBIN H et coll.,1987), présents dans

la laminine de souris, mais absents dans la laminine humaine. De plus, on sait que des anticorps de ce type sont induits par des bactéries gastrointestinales ou pulmonaires. Le taux de ces anticorps pourrait être augmenté dans l'hypothèse plausible où le trypomastigote posséderait une structure de ce type à sa surface.

Quoiqu'il en soit, l'implication de ce type d'auto-anticorps dans la spécificité de la pathogénèse chagasique est aujourd'hui écartée.

Par ailleurs, des anticorps cross-réactifs avec une protéine de 25 kDa trouvée dans le **sarcoleme des muscles cardiaque et striés** ont été associés avec la pathologie cardiaque (ACOSTA AM et coll.,1983).

La production de plusieurs **anticorps monoclonaux** générés soit à partir de tissus nerveux soit d'antigène parasite a montré l'existence de **structures communes au parasite et à son hôte**.

En effet, en WOOD, et coll.(1982), ont obtenu un anticorps monoclonal de classe IgM réagissant, par la technique d'immuno-empreinte, avec de nombreux antigènes de *Trypanosoma cruzi* ainsi qu'avec plusieurs tissus de l'hôte (nerveux, cardiaque, foie...). En revanche, en utilisant la technique d'immunoprécipitation, cet anticorps monoclonal ne réagissait qu'avec une seule molécule parasite de 88 kDa (HUDSON L,1983).

En SNARY D et coll.,(1983) ont caractérisé un anticorps monoclonal de classe IgM, reconnaissant deux protéines parasites de **58 et 38 kDa**, ainsi que deux protéines des tissus nerveux de **58 et 37 kDa**.

L'équipe de H. EISEN & K. PETRY a produit des anticorps monoclonaux qui réagissent vis-à-vis du **parasite** et du **cerveau de souris**. Des structures de type **sulfolipides** ainsi que des structures **protéiques** présentes à la fois à la surface du trypanosome et des tissus nerveux (PETRY K et coll.,1987); (PETRY K et coll.,1988) ont pu être caractérisées.

Ces travaux démontrent donc l'existence de déterminants antigéniques communs portés par le parasite et son hôte. D'autres études vont également dans le même sens.

En effet, par criblage de **banques d'expression** de *Trypanosoma cruzi* et de cerveau de mammifère avec des sérums de souris en phase chronique, plusieurs structures parasitaires possédant des communautés antigéniques avec les tissus de l'hôte ont pu être identifiées.

Cette stratégie a conduit à l'identification d'une protéine de surface (**Fl-160**) de 160 kDa, associée au flagelle (VAN WOORHIS WC et coll.,1989). Des anticorps dirigés contre cette protéine parasitaire reconnaissent un composant de **48 kDa** des tissus nerveux de plusieurs mammifères. Le titre en anticorps dirigés contre la Fl-160 présent dans les sérums de patients en phase chronique ne semble pas être en relation avec la pathologie chronique. Concernant cette réactivité croisée, des travaux récents montrent que la région impliquée est limitée à seulement 7 à 9 acides aminés (PETRY K et coll.,1991). Cependant des résultats préliminaires montrent que des lymphocytes de souris infectées ou immunisées avec la Fl-160 prolifèrent en réponse à une stimulation par la Fl-160 recombinante. Ceci indique que cette molécule est capable d'induire une réponse cellulaire T par immunisation ou lors d'une infection expérimentale. Des

expériences sont en cours pour savoir si des lignées de lymphocytes T anti-F1160 sont capables de **transférer une pathologie nerveuse** (PETRY & VAN WOORHIS,1991).

D'autre part, plusieurs clones d'ADNc d'une banque d'expression de **cerveau de rat** reconnus par des anticorps de souris infectées chroniquement ont été obtenus (PETRY & VAN WOORHIS,1991). Des anticorps dirigés contre plusieurs protéines recombinantes présentent une réaction croisée avec des antigènes d'amastigotes et de trypomastigotes ayant de hauts poids moléculaires, mais également avec le complexe majeur de surface des trypomastigotes, groupe de protéines de poids moléculaire de 85 kDa (KAHN S et coll.,1991). Ces observations suggèrent que les antigènes de la famille 85 ka pourraient participer à l'induction de l'autoimmunité dans la maladie de Chagas (PEYRY & VAN WOORHIS,1991). La diversité de cette famille de molécules (voir chapitre sur les molécules de surface) pourrait stimuler la production d'auto-anticorps et de cellules auto-réactives lors de la phase aiguë et contribuer à générer des processus auto-immuns.

En conclusion, si de nombreux exemples démontrent l'existence de molécules possédant des structures antigéniques communes, portées à la fois par le parasite et son hôte, la contribution de la réponse immune vis-à-vis de ces déterminants dans le cadre de l'hypothèse faisant de la maladie de Chagas une maladie auto-immune, n'est pas clairement établie.

c.: Mimiquerie fonctionnelle.

Comme nous l'avons souligné précédemment, les mécanismes impliqués dans la réplication intracellulaire du parasite sont mal connus. Mentionnés par ailleurs dans l'exposé, trois groupes de protéines, exprimées par les amastigotes et les trypomastigotes et libérées par ces parasites pourraient intervenir dans ce que l'on nomme la "**mimiquerie**" fonctionnelle.

Tout d'abord, la protéine TC TOX, identifiée comme une molécule de 75 kDa, à activité hémolysine (ANDREWS & WHITLOW,1989) et qui possède une réactivité croisée avec le composant C9 du complément humain (ANDREWS N et coll.,1990). Comme le C9, la protéine TC TOX peut provoquer des pores dans la membrane cellulaire; active à pH acide, elle permettrait au parasite de s'échapper de la vacuole parasitophore.

D'autre part, la protéine CCI de 87 kDa interfère avec la formation et accélère la dégradation de la C3 convertase alterne du complément en augmentant la dissociation du facteur Bb du C3bBb (JOINER KA et coll.,1988). Sa fonction est analogue à celle du DAF (decay-accelerating factor), qui prévient la destruction des cellules par le complément (NICHOLSON-WELLER A et coll.,1982). La fixation du facteur B est affectée par un composant excrété-sécrété par le parasite (SHER A et coll.,1986); (RIMOLDI, et coll.,1988) qui est la protéine CCI, immunogène lors de l'infection chagasique (JOINER, et coll.,1988). On ne sait pas si cette molécule présente des réactions croisées avec les composants de la cascade du complément humain. D'autres protéines parasitaires peuvent aussi interférer avec la cascade d'activation du système

complémentaire (FISCHER E et coll.,1988).

Enfin, les **sialidases parasitaires**, décrites par PEREIRA MEA, (1983b) sont des protéines présentes chez les stades trypomastigotes et amastigotes, et qui sont libérées de la surface parasitaire (LIBBY P et coll.,1986). Récemment, il a été montré que les molécules de la famille 85 kDa possédaient des homologues de séquence avec des sialidases bactériennes. La production par le parasite de nombreuses sialidases pourrait être en relation avec la grande variété d'espèces qu'il peut infecter.

Les "mimiqueries", fonctionnelle et moléculaire, ne sont donc pas forcément exclusives l'une par rapport à l'autre et là encore, la preuve de l'implication de ces processus dans la genèse de l'immunopathologie de la maladie de Chagas n'est pas établie.

4. LES ANTIGENES PROTECTEURS.

Plusieurs travaux montrent que le parasite est vulnérable et que des protocoles d'immunisation peuvent au moins protéger contre la phase aiguë (ANDREWS NW et coll.,1985). Il faut souligner que pour l'instant les données font cruellement défaut quant à la modulation des atteintes chroniques par une faible parasitémie en phase aiguë. En d'autres termes, on ne sait pas si en protégeant des souris de la phase aiguë, on les protège au moins partiellement de la phase chronique. Il est généralement établi que pour être optimal, un vaccin contre la maladie de Chagas ne doit pas induire ni de phénomène d'immunosuppression, ni de phénomène d'auto-immunité. C'est pour cette raison

que les recherches se sont focalisées sur l'obtention de préparations immunoprotectrices les plus pures possibles. Les chapitres qui suivent tentent de faire le point sur les antigènes parasitaires déjà caractérisés, en mentionnant ce que l'on sait en particulier concernant leur pouvoir protecteur.

A. Molécules de surface.

Les molécules présentes à la surface du parasite, suspectées d'être impliquées dans les **relations hôte-parasite** ont été les cibles de nombreuses études portant sur leur éventuel pouvoir protecteur. Quelques unes de ces protéines sont de bons **immunogènes** durant l'infection chagasique. Cependant, elles se sont révélées dans bien des cas de **mauvais candidats vaccinnants**, comme nous allons le voir. On peut d'ores et déjà dire qu'une molécule **majeure** induisant une forte réponse humorale et cellulaire, mais insuffisante pour protéger l'hôte vis-à-vis de l'infection, peut difficilement être considérée comme un bon candidat. D'autre part, l'expression en surface de molécules essentielles au parasite, serait un processus suicidaire pour ce dernier s'il ne disposait pas de toute une stratégie pour contrecarrer la réponse immune de l'hôte (CAPRON & DESSAINT, 1989). En revanche, des protéines **mineures**, dont le rôle pourrait être essentiel dans les interactions hôte-parasite, ou dans la survie du parasite chez son hôte, si elles sont rendues artificiellement immunogènes, pourraient être prises en compte lors de l'élaboration d'une stratégie vaccinale. Ainsi, des protéines cytoplasmiques peuvent être considérées comme des candidats vaccinnants dans certaines maladies parasitaires. C'est le cas notamment de la

paramyosine de *Schistosoma mansoni*, qui semble efficace dans l'induction d'une immunité protectrice vis-à-vis du parasite (PEARCE EJ et coll.,1983).

Malgré toutes les réserves concernant les molécules de surface, plusieurs d'entre elles ont été largement étudiées chez *Trypanosoma cruzi*. Nous tenterons de faire le point sur l'état des connaissances actuelles sur leur pouvoir protecteur.

a. Identification de molécules de surface.

L'identification des composants de surface se fait par **iodination** des parasites vivants suivie d'une lyse, d'un gel SDS-PAGE, et d'une exposition à des films autoradiographiques. Leur immunogénicité s'apprécie par la technique d'**immunoprécipitation** avec différents sérums chagasiques, qu'ils soient humains ou d'animaux infectés par *Trypanosoma cruzi*. L'utilisation d'**anticorps monoclonaux** provenant de souris immunisées avec des parasites fixés à la glutaraldéhyde a également permis de mettre en évidence de telles molécules. Pour déterminer si elles étaient glycosylées, différentes **lectines** ont été utilisées. Plus rarement, des **déglycosylations** chimiques ou enzymatiques ou encore l'utilisation de **produits de traduction *in vitro*** ont permis d'identifier la nature protéique ou glycanique des parties antigéniques ou immunogéniques de ces glycoprotéines.

b. GP 60.

Parmi les glycoprotéines de *Trypanosoma cruzi* les mieux étudiées, on peut citer la **GP 60**, très immunogénique chez l'homme, dont l'utilisation a été proposée en diagnostic et qui est présente au niveau des trypomastigotes et des épimastigotes, et qui enfin contient environ 40% de glycanes dont beaucoup de galactose. Un de ces produits de clivage donnerait naissance à une **GP 25**, dont l'utilisation a été également proposée en diagnostic (SCHARFSTEIN, et coll.,1985).

c. GP 90.

La **GP 90** est en fait constituée d'un groupe de molécules de pI allant de 5 à 7,5, présentes à tous les stades parasitaires (ARAUJO FG et coll.,1984; SNARY D et coll.,1979) et riches en mannose, ce qui les rend purifiables par chromatographie d'affinité sur lectine *Lens culinaris* (SNARY D et coll.,1980). Elle est partiellement protectrice chez des souris infectées par des trypomastigotes métacycliques ou sanguicoles, qu'elle soit injectée en présence d'adjuvant complet de Freund ou de saponine (SCOTT MT et coll.,1979).

d. LPPG.

Le **LPPG** ou lipopeptidophosphoglycane a également fait l'objet de plusieurs études. Possédant entre 40 et 60% de glycanes, ce complexe de poids moléculaires 24, 31, et 37 kDa est présent à la surface des épimastigotes mais

absent des trypomastigotes métacycliques (de LEDERKREMER RMM et coll.,1976). Des anticorps dirigés vis-à-vis de ce complexe réagissent avec des antigènes présents dans les sérums d'animaux infectés et vis-à-vis d' amastigotes, ce qui suggère que ce complexe pourrait être également excrété-sécrété par le parasite. Sa structure complète a récemment été établie (de LEDERKREMER RM et coll.,1991).

e. GP 160.

La **GP 160** est aussi une glycoprotéine, décrite comme pouvant jouer un rôle dans l'immunité vis-à-vis du parasite chez l'homme et les animaux d'expérience. Ceci est basé sur le fait que la GP160 est reconnue par des sérums humains chagasiques et des sérums de souris infectées par *Trypanosoma cruzi*. Par ailleurs, ces sérums sont capables de lyser des parasites vivants en présence de complément (MARTINS MS et coll.,1985).

f. GP 72.

La **GP 72** est une protéine abondante à la surface des épimastigotes et des trypomastigotes de culture, et dont on suspecte la présence sur les formes métacycliques (SNARY D et coll.,1981); (NOGUEIRA, et coll.,1981). Absente de la surface des amastigotes et des trypomastigotes sanguicoles, c'est une des glycoprotéines les mieux caractérisées chez *Trypanosoma cruzi*. Plusieurs fonctions semblent en effet être associées à cette molécule ou plutôt à ce complexe

de molécules. Contenant 50% de glycanes dont certains sont phosphorylés, ce complexe est riche en ribose et xylose. Identifié grâce à un anticorps monoclonal, le WIC 29-26, ce complexe est hautement immunogène (SNARY, et coll.,1981). Tous les clones et les souches de *Trypanosoma cruzi* ne réagissent pas de manière identique avec l'anticorps WIC 29-26, ce qui démontre un polymorphisme associé à ce complexe. L'expression de l'épitope reconnu par WIC 29-26 serait corrélée avec certains zymodèmes présentant des distributions géographiques distinctes. Il semble très improbable que la pathogénicité de telle ou telle souche soit liée à la seule présence ou absence d'un épitope. Néanmoins, sa contribution dans ce domaine reste à définir. La métacyclogénèse est inhibée par ce même anticorps monoclonal mais pas par d'autres, suggérant le rôle possible du complexe GP72 dans la différenciation du parasite. De plus, une lectine de *Rhodnius prolixus* se fixe au complexe GP 72, renforçant l'hypothèse de son intervention dans la morphogénèse du parasite (PEREIRA MEA et coll.,1981).

La participation de ce complexe dans l'activation du complément a également été démontrée. En effet il est à noter que les épimastigotes mais non les trypomastigotes sont sensibles à la lyse par du sérum frais normal. Ces deux stades activeraient donc de manière différente la voie alterne du complément. Durant cette activation, le complexe GP 72 est l'accepteur du C3 sur les épimastigotes (JOINER K et coll.,1985) et le C3b, à capacité lytique, est déposé sur ces derniers. En revanche, le C3 déposé à la surface des trypomastigotes est sous forme de C3bi inactif. Cette résistance des trypomastigotes à la lyse par l'activation du système complémentaire est probablement dépendante de l'expression de certaines molécules de surface. Le pouvoir protecteur de ces

molécules ne s'exerce que lors d'une infection utilisant uniquement des trypomastigotes métacycliques (SNARY, et coll.,1983) alors qu'elles ne sont pas protectrices lors d'une infection par des trypomastigotes sanguicoles et uniquement en employant des adjuvants inutilisables chez l'homme.

g. Neuraminidases.

Les **neuraminidases** sont des enzymes qui coupent les acides sialiques des glycoconjugués. Le parasite *Trypanosoma cruzi* possède une activité enzymatique de type neuraminidase très élevée chez les trypomastigotes, 10 à 15 fois plus faible chez les épimastigotes, indétectable chez les amastigotes (PEREIRA MEA,1983a). Les souches et les clones ont des niveaux d'activité enzymatique différents, la présence d'une activité forte serait corrélée à un myotropisme. Ces enzymes, présentes sur la membrane externe ne semblent pas être excrétées-sécrétées (SOUTO-PADRON T et coll.,1990). Des anticorps dirigés contre la fraction possédant l'activité neuraminidase réagissent différemment avec des parasites vivants, ne marquant en immunofluorescence qu'une **sous-population de trypomastigotes**. De même, ces anticorps peuvent induire une lyse *in vitro* des parasites possédant ces enzymes, alors qu'ils ne lysent pas les parasites qui en sont dépourvus. Il a également été démontré que les trypomastigotes possédant l'activité neuraminidase sont plus infectants qu'une population mixte (CAVALLESCO R et coll.,1988). Cependant, les anticorps "anti-neuraminidase" réagissent vis-à-vis d'un grand nombre de protéines parasitaires de hauts poids moléculaires. Aucune étude n'a été réalisée sur leur

éventuel pouvoir protecteur.

h.GP 85

Les **GP 85** ont été décrites comme initialement présentes spécifiquement à la surface des trypomastigotes. Identifiées et isolées grâce à une lectine, la "wheat germ agglutinin" ou **WGA**, la composition exacte en sucres de ce complexe est inconnue. Il pourrait interagir avec la WGA par ses résidus N-acétylglucosamine puisque sa fixation n'est pas abolie par un traitement à la neuraminidase. Le poids moléculaire de sa partie protéique serait d'environ **45 kDa** (GOLDENBERG S et coll.,1983). Plusieurs études suggèrent le rôle clé de ce complexe dans les **interactions hôte-parasite**, au cours du processus d'invasion. En effet, la fixation et la pénétration des trypomastigotes dans des cellules en culture est inhibée par des anticorps dirigés vis-à-vis de ce complexe (ALVES, et coll.,1986). D'autre part, il pourrait jouer le rôle de **récepteur de la fibronectine** (OUAISSI, et coll.,1986). Contrairement aux diverses protéines citées précédemment, de nombreux travaux de clonage des molécules appartenant à ce complexe ont été réalisés. (PETERSON DS et coll.,1986) ont les premiers, identifié un clone "85 kDa" possédant une séquence de 9 acides aminés répétée 5 fois, dont le rôle est jusqu'ici inconnu. En effet, des travaux effectués dans notre laboratoire ont attribué un rôle protecteur à un peptide dérivé de cette séquence (DEFOORT JP et coll.,1989). Cependant, des études ultérieures ont montré que l'immunisation avec cette séquence peptidique couplée à une protéine porteuse induisait une activation polyclonale. Par ailleurs, ce peptide couplé était capable

de stimuler de façon non spécifique des cellules lymphocytaires T provenant d'animaux immunisés par divers antigènes (PESTEL J et coll.,1992). Plusieurs équipes ont ensuite décrit et séquencé des ADNc codant pour ces protéines de 85 kDa (DRAGON EA et coll.,1987; TAKLE GB et coll.,1989). La seule analyse des profils bidimensionnels de protéines de trypomastigotes iodées laissait supposer l'existence de **nombreuses molécules ayant un poids moléculaire de 85 kDa** (ANDREWS NW et coll.; OUAISSI MA et coll.,1990b). Certaines études de biologie moléculaire (MANNING JE et coll.,1987) vont également dans ce sens. Plus récemment, KAHN SA et coll.,(1990) ont montré qu'en fait le parasite possède au moins une **centaine de gènes ou pseudogènes** codant pour cette famille de molécules, et qu'au moins 13 de ces gènes étaient exprimés. En utilisant diverses approches, il a montré que plusieurs protéines de 85 kDa étaient **exprimées en même temps à la surface** d'un même parasite et non pas de manière séquentielle comme c'est le cas pour les VSG des trypanosomes africains (BORST & CROSS,1982; PAYS & STEINERT,1980). Par ailleurs, une activité **neuraminidase** a été associée à ce groupe de protéines (KAHN, et coll.,1991; TAKLE GB et coll.,1991)). Pour notre part, nous avons montré que certaines de ces molécules de poids moléculaire 85 kDa étaient excrétées-sécrétées par le parasite (OUAISSI, et coll.,1990b). De plus, certaines d'entre elles sont immunogènes au cours de la phase aiguë. Il est raisonnable de penser que la **poursuite du travail de biologie moléculaire** et notamment la possibilité de disposer de protéines recombinantes permettra de mieux comprendre le rôle de ces molécules et de tester leur efficacité en immunoprophylaxie.

B. Antigènes flagellaires.

Les études sur la fraction flagellaire de *Trypanosoma cruzi* ont débuté à la fin des années 1970 lorsque l'équipe d'Elsa SEGURA a caractérisé (SEGURA EL et coll.,1977) cette fraction et a montré qu'elle avait un **meilleur pouvoir protecteur** que la fraction membranaire ou qu'un sonicat total du stade épimastigote, ceci en présence de *Bordetella pertussis*, adjuvant utilisable chez l'homme.(RUIZ A et coll.,1985). Par ailleurs, l'injection d'antigène flagellaire à des souris en absence ou en présence d'infection, était **dépourvue d'effet immunoagressif**, en terme de myocardite ou d'inflammation musculaire (RUIZ, et coll.,1985). L'injection de cette même fraction induit chez des souris, la production d'anticorps, production amplifiée lors d'une infection expérimentale. Les propriétés immunoprotectrices de la fraction lyophilisée sont au moins égales à celle de la fraction fraîchement préparée (RUIZ AM et coll.,1986b). La production d'**anticorps monoclonaux anti-fraction flagellaire** a été entreprise et trois d'entre eux ont été testés sur les divers stades parasitaires (SEGURA, et coll.,1986). La réactivité de ces anticorps est très différente et il semble que les épitopes reconnus soient portés par différentes molécules. Néanmoins, transférés passivement à des souris, ils sont tous capables de conférer un certain degré de protection, ceci malgré leur pouvoir lytique variable en présence de complément, ce qui contredit certains travaux précédents (BRENER Z,1987).

Dans un autre travail plus récent, la même équipe a étudié un autre anticorps monoclonal (8-4) anti-fraction flagellaire, réagissant en

immuno-empreinte vis-à-vis de nombreux polypeptides de poids moléculaire compris entre 40 et 100 kDa présents dans un extrait d'épimastigotes, et deux molécules de 15 et 48 kDa présentes dans un extrait de trypomastigotes (RUIZ, et coll.,1990). Les protéines reconnues par l'anticorps monoclonal ont été purifiées sur colonne d'affinité à partir du stade épimastigote. Ces protéines sont immunogènes chez l'homme et possèdent des propriétés protectrices chez la souris.

Enfin, durant ces dernières années, des recherches ont abouti au **clonage moléculaire** d'une portion d'une des molécules reconnues par l'anticorps monoclonal 8-4 (BUA J et coll.,1991). Bien que l'ADNc obtenu soit très court puisqu'il code pour 19 acides aminés, le peptide dérivé de cette séquence est capable d'induire **une réponse humorale aussi bien que cellulaire** chez la souris. Quant à son pouvoir protecteur, il n'est pas encore établi.

Ce travail de longue haleine concernant les antigènes de la fraction flagellaire souffre néanmoins de l'absence de base moléculaire sérieuse, puisque (le ou) les antigènes protecteurs impliqués ne sont pas clairement identifiés. Il s'agit néanmoins du premier criblage de banque de *Trypanosoma cruzi* à l'aide d'un anticorps monoclonal. Ces travaux ont également permis de montrer que des anticorps non lytiques pouvaient avoir un pouvoir protecteur vis-à-vis du parasite.

C. Antigènes d'excrétion-sécrétion ou AES.

Les molécules parasitaires **excrétées-sécrétées** présentent un certain nombre d'activités enzymatiques, peuvent être hautement immunogènes, et peuvent induire une réponse immune protectrice dans au moins deux modèles parasitaires. Il s'agit tout d'abord de la **GP38** et de la **P28** de *Schistosoma mansoni* (GRZYCH JM et coll.,1985; BALLOUL JM et coll.,1987). Dans le domaine de la **toxoplasmose**, les antigènes excrétés-sécrétés (AES) induisent une réponse protectrice, dépendante d'anticorps contre une souche virulente de *Toxoplasma gondii* (DARCY F et coll.,1988).

Jusqu'à ces dernières années, peu de travaux concernent ce type de molécules chez *Trypanosoma cruzi*. Néanmoins, OUAISSI, et coll.,(1990b) ont caractérisé les **immunogènes majeurs de surface** du parasite et montré que ces derniers étaient également excrétés-sécrétés *in vitro*. D'autres études ont démontré que la libération de ces antigènes était indépendante de la présence de protéines ou sérum dans le milieu de culture, et que ces produits d'excrétion-sécrétion étaient libérés à la surface du parasite sous forme de **vésicules membranaires** (OUAISSI, et coll.,1990b; GONCALVES MF et coll.,1991). De plus, il a été démontré que le complexe **85 kDa** faisait partie de ces AES. Un transfert passif d'anticorps dirigés vis-à-vis de ce complexe était capable de protéger partiellement des rats Fischer contre une infection expérimentale létale, ce qui suggèrait le **rôle protecteur** de ces **85 kDa-AES**, dans l'immunité protectrice dépendante d'anticorps vis-à-vis de *Trypanosoma cruzi*.

Des travaux conduits par GRUPPI ont révélé que des anticorps humains présents dans les sérums chagasiques et dirigés vis-à-vis d' **exoantigènes plasmatiques**, c'est à dire des AES produits cette fois *in vivo* (GRUPPI A et coll.,1989) reconnaissent à la fois des antigènes de surface parasitaire mais aussi des composants des tissus cardiaques. Dans un autre travail, ce même auteur a montré que ces exoantigènes induisaient une réponse de type **IgE** dirigé contre deux molécules de 27 et 45 kDa (GRUPPI A et coll.,1990), réponse IgE anti-produits d'excrétion-sécrétion, qui a été montré comme **protectrice** dans d'autres modèles parasitaires (DAMONNEVILLE M et coll.,1986) (VERWAERDE C et coll.,1987) .

A propos des antigènes protecteurs et / ou antigènes impliqués dans la pathologie, des études sont en cours dans notre laboratoire pour identifier les molécules et les mécanismes effecteurs impliqués dans l'immunoprotection expérimentale par *Trypanosoma cruzi* à la fois chez le rat et la souris, en ayant soin de vérifier qu'aucune réactivité croisée avec les composants de l'hôte n'est observée dans nos modèles.

5. A LA RECHERCHE d'UNE STRATEGIE VACCINALE ORIGINALE.

Comme nous venons de le voir, jusqu'ici aucune molécule protectrice satisfaisante n'est à ce jour disponible dans le contexte de la maladie de Chagas.

En effet concernant les différentes molécules de surface, si pour certaines d'entre elles un pouvoir protecteur a été démontré, on ne connaît pas la

part des glycanes et des parties protéiques dans cette immunoprotection. Il est vraisemblable que certaines d'entre elles aient été écartées soit parce que les parties hautement immunogéniques étaient composées de glycannes, ce qui a fortement compromis leur clonage, soit parce que les parties protéiques seules ne protégeaient pas. En outre, un certain nombre d'entre elles, telles la 72 ou la 90 kDa, n'étaient pas immunoprotectrices en présence d'adjuvants utilisables chez l'homme. Enfin concernant les antigènes flagellaires qui eux sont protecteurs avec un adjuvant adéquat, les résultats de biochimie et de biologie moléculaire sont trop peu avancés pour que l'on puisse tirer une conclusion à ce jour.

Nous avons donc choisi de travailler sur des antigènes caractérisés non pas grâce à leur accessibilité à la surface du parasite, mais grâce à leur **fonction enzymatique**. Comme nous l'avons vu plusieurs enzymes de **détoxification**, dont certaines originales sont présentes chez *Trypanosoma cruzi*. Néanmoins, la mise en évidence de ces enzymes s'était jusqu'ici limitée au seul stade épimastigote. L'existence d'une **glutathion S-transférase** avait été démontrée sur ce même stade parasitaire. De plus, les résultats prometteurs ont été obtenus avec ces enzymes dans les infections à *Schistosoma mansoni* et à *Fasciola hepatica*. Nous avons voulu savoir si de telles molécules parasitaires liées au métabolisme du glutathion, n'auraient pas également chez un parasite protozoaire intra-cellulaire, un pouvoir protecteur.

Il s'agissait donc de tester les hypothèses suivantes:

Les molécules de *Trypanosoma cruzi* intervenant dans le métabolisme du glutathion peuvent-elles être antigéniques?

Si oui, ces enzymes ont-elles un pouvoir protecteur dans l'infection chagastique expérimentale?

Dans une **première partie**, nous allons décrire la caractérisation biochimique de protéines parasitaires fixant le glutathion, en montrant qu'elles sont immunogènes à la fois chez l'homme et dans deux modèles expérimentaux.

Dans une **seconde partie**, nous détaillerons les expériences d'immunoprotection chez la souris, réalisées avec ces mêmes protéines.

Enfin dans une **troisième partie**, nous exposerons les travaux de biologie moléculaire concernant le clonage ces molécules.

**TRAVAUX
PERSONNELS**

Article 1

ARTICLE 1

Les protéines de Trypanosoma cruzi fixant le glutathion sont immunogènes durant les infections chagasiennes humaine et expérimentale.

Le point de départ de notre étude était les travaux de YAWETZ et AGOSIN (1981), qui avaient montré en utilisant plusieurs étapes de chromatographie successives, l'existence d'une glutathion S-transférase (GST), de 37 kDa, au niveau du stade épimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

Contrairement à ces auteurs, nous avons utilisé la technique plus simple de chromatographie d'affinité sur colonne de glutathion agarose, puisqu'elle avait déjà permis la purification de plusieurs GSTs, dont certaines d'origine parasitaire.

Les principaux messages de cet article sont les suivants:

1) Trois protéines de 45, 30 et 25 kDa du stade épimastigote de *Trypanosoma cruzi* se fixaient à une telle colonne. Elles ont été nommées TcGBP pour "*Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins". En utilisant le CDNB comme second substrat, une activité GST de 70 nmoles par min/mg de protéine était détectée dans la fraction parasitaire fixant le glutathion.

2) Une augmentation de l'expression des TcGBP et de l'activité totale de type GST était observée après incubation des épimastigotes par du **phénobarbital**, qui est un inducteur de la synthèse de plusieurs GSTs.

3) Des expériences d'immunofluorescence et de microscopie électronique, conduites à l'aide d'un antisérum dirigé contre ces trois protéines, ont permis de démontrer que les TcGBP étaient exprimées par **tous les stades de développement parasitaire**, en particulier par les formes intracellulaires.

Des études en immunoblotting, ont montré que les trois protéines étaient présentes sur les formes trypomastigotes.

4) Les résultats obtenus en immunoprécipitation de produits de traduction *in vitro*, utilisant des anticorps anti-TcGBP, suggéraient que ces trois polypeptides n'étaient **pas glycosylés**.

5) De plus, des anticorps anti-TcGBP étaient détectés dans une forte proportion de sérums de patients chagasiques en phase chronique et de sérums de souris chroniquement infectées. En revanche, des sérums de patients ou de souris en phase aiguë étaient faiblement immunoréactifs vis-à-vis de ces molécules. Ceci montrait que ces antigènes étaient **immunogènes** lors de l'infection.

6) Des sérums de patients infectés par d'autres parasites, connus pour présenter des réactions croisées avec le parasite *Trypanosoma cruzi*, ne reconnaissaient pas les TcGBP, ce qui est en faveur d'une **spécificité** de ces antigènes.

Nos résultats permettaient donc d'identifier une nouvelle classe d'antigènes cibles de la réponse immune, pouvant être essentiels pour le développement du parasite chez son hôte.

Trypanosoma cruzi glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas' disease

B. PLUMAS-MARTY*, C. VERWAERDE, M. LOYENS, P. VELGE, A. TAIBI, M.-F. CESBRON, A. CAPRON and M. A. OUAISSI

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

(Received 21 June 1991; revised 22 August 1991; accepted 23 August 1991)

SUMMARY

Following purification by affinity chromatography, three glutathione-binding proteins (TcGBP) of 45, 30, and 25 kDa were co-purified from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Using 1-chloro-2,4 dinitrobenzene as substrate, a glutathione S-transferase activity of 70 nmol/min/mg of proteins was detected in the GSH binding fraction. An increased expression of TcGBP and total GST activity was observed upon incubation of parasites with phenobarbital, which is an inducer of GST synthesis. Immunofluorescence and electron microscopic experiments demonstrated that TcGBP were expressed by all developmental stages of the parasite, including infective forms. The expression of these proteins by intracellular dividing amastigotes could be in favour of a potential defensive role of these molecules against host attack. Results obtained by immunoprecipitation of *in vitro* translation products using anti-TcGBP antisera suggested that these three polypeptides are not glycosylated. In addition, antibodies directed against the TcGBP were found in a high proportion of *T. cruzi*-infected chronic chagasic patients' sera and in sera of chronically infected BALB/c mice. In contrast, acute chagasic patients' sera and acute-phase mouse sera were found to be poorly reactive with these proteins. Our results identify a new class of potential target antigens, which may be essential for the development of *T. cruzi* in its host. Their protective role in experimental models deserves to be investigated.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, glutathione, immunogens, phenobarbital, *in vitro* translation products.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the causative agent of American trypanosomiasis (Chagas' disease) affecting more than 20 million people in Central and South America (Schofield, 1985). The parasite replicates as an epimastigote in the midgut of its insect vector and transforms to metacyclic infective trypomastigotes in the hindgut. In the mammalian host cells, dividing amastigotes are found which transform into infective trypomastigotes prior to release into the bloodstream (Brenner, 1973). The importance of *T. cruzi* in human health has focused research on the identification of target antigens which could be used for diagnostic tests (Orozco *et al.* 1982; Dragon *et al.* 1985; Scharfstein *et al.* 1985; Lemesre *et al.* 1986) or vaccine components (Scott & Snary, 1979; Snary, 1983; Ouaisi *et al.* 1990; Gonzales, Araguth & Yoshida, 1991). Many of the contributions during recent years have also attempted to improve chemotherapy. The two available drugs (nifurtimox and benznidazole) present some toxic effects and cure a very low percentage of chronic cases (Morello, 1988), probably due to the resistance of some strains. The

resistance of *T. cruzi* to chemotherapeutic agents as well as its capacity to survive intracellularly in phagocytic cells could involve an active defence metabolism. *T. cruzi* lacks catalase, is supposed to be deficient in selenium-dependent peroxidase activity and presents a low level of superoxide dismutase (Boveris *et al.* 1980). However, some data indicate that epimastigotes possess other detoxification systems, including cytochrome P450 (Agosin *et al.* 1976, 1984) and epoxide hydrazase (Yawetz & Agosin, 1979). The presence of glutathione S-transferase (GST) activity in the cytosolic fraction of *T. cruzi* epimastigotes has been reported by Yawetz & Agosin (1981) and several *T. cruzi* glutathione-requiring enzymes have been studied (Fairlamb & Cerami, 1985; Repetto *et al.* 1986; Krauth-Siegel *et al.* 1987). On the other hand, inhibition of glutathione synthesis has been first proposed as a chemotherapeutic strategy for african trypanosomiasis (Arrick, Griffith & Cerami, 1981) and recently, Moncada *et al.* (1989) have demonstrated that glutathione is also an important factor in the resistance of *T. cruzi* to drugs. Given the putative role of the parasite enzymes involved in the glutathione metabolism cycle, we attempted to look for the presence of some of these molecules in the different *T. cruzi* de-

* Reprint requests to B. Plumas-Marty.

velopmental stages and to evaluate their immunogenicity during natural and experimental Chagas' disease.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

The Y strain was used throughout this study. Trypomastigotes were maintained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as described elsewhere (Ouaissi, Cornette & Capron, 1986). Extracellular amastigotes were obtained according to the procedure previously described (Piras, Piras & Henriquez, 1982). Epimastigotes were cultured in Glucose Lactalbumin Serum Haemoglobin medium as reported elsewhere (Cornette, Capron & Ouaissi, 1988). In some experiments 5 mM phenobarbital (Coger, Paris) was added into the medium of the epimastigote culture at day 2. Under these conditions some decrease in cell growth was observed but without cytotoxic effect, as determined by the erythrosin B exclusion test (Jaffe, Grimaldi & McMahan-Pratt, 1984).

Preparation of Trypanosoma cruzi glutathione-binding proteins

During preparation the temperature was maintained at 4 °C. Five-day cultured epimastigotes were harvested from the culture medium by centrifugation at 2000 g for 10 min and washed 4 times in Hanks' balanced salt solution. They were then sonicated in an equilibration buffer (10 mM potassium phosphate, pH 7.0, containing 1 mM ethylene diamine tetracetic acid (EDTA), 1.15% KCl (w/v) and 0.5 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride (PMSF). The homogenate was clarified by centrifugation at 10000 rpm for 30 min in a Sorvall HB-4 rotor and loaded over two successive columns (10 ml): an agarose column, and then a glutathione-bound agarose column (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). After extensive washing with 200 ml of equilibration buffer, the columns were eluted separately by 20 ml of 50 mM Tris buffer, pH 9.1, containing 0.1 mM dithiothreitol (DTT) and 7 mM reduced glutathione (Simons & Vander Jagt, 1981). Eluates were dialysed against 10 mM potassium phosphate and concentrated on Aquacide II (Calbiochem Co., La Jolla, CA, USA). Protein concentration was determined according to the method of Lowry *et al.* (1951). After fractionation on SDS-PAGE (Laemmli, 1970) in the presence of β -mercaptoethanol, proteins were stained by Coomassie brilliant blue. When required, 5 μ g of purified TcGBP were labelled with ¹²⁵I using the Bolton-Hunter reagent (Bolton & Hunter, 1973) (Amersham Searle Corp., Sydney, Australia).

Detergent-soluble parasite extracts

Parasites were washed and lysed overnight at 4 °C in 10 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 1% Nonidet P-40 (NP-40), 100 kallikrein inhibitor units (KIU)/ml aprotinin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2 mM PMSF. Nuclei and cellular debris were removed by centrifugation at 3000 g for 15 min at 4 °C and the supernatant fraction was used for immunoblotting analysis.

In vitro translation products

Total RNA was purified from guanidinium-lysed parasites by caesium chloride gradient centrifugation (Chirgwin *et al.* 1979) and *in vitro* translated in the presence of [³⁵S]methionine in a rabbit reticulocyte system (BRL, Gaithersburg) as recommended by the manufacturer.

Animal antisera

Four-week-old male Fischer rats were immunized by intraperitoneal injection of 25 μ g of purified TcGBPs in the presence of 75 μ l of adjuvant (Vaxicoq, Institut Mérieux, France: 4 u.i. of *Bordetella pertussis* and 1.25 mg of aluminium hydroxide/500 μ l) diluted in 500 μ l of physiological saline. Two weeks later they were boosted in the same way and bled every week. Mouse anti-TcGBP antisera were obtained from 6-week-old male BALB/c mice by the same procedure except that the doses of antigen and adjuvant were respectively 10 μ g and 30 μ l for an injected volume of 300 μ l. Control sera were obtained by injection of animals with adjuvant alone diluted in the appropriate volume of physiological saline.

T. cruzi Y strain was maintained by serial passages in male BALB/c mice in order to obtain acute and chronic phase sera and in male Fischer rats in order to obtain infection sera.

Human sera

All chagasic and endemic control sera were a gift from Dr U. O. Martin (Ministeria de Salud y Media ambiente. Provincia de Sante Fe, Argentina). Serum samples were obtained from 13 patients (10 months to 13 years old) with acute *T. cruzi* infections and from 19 patients (20 to 43 years old) with chronic *T. cruzi* infections. The presence of the infection was demonstrated in all cases using serological and/or parasitological tests. Chronic patients were classified as asymptomatic or cardiopathic cases. Control sera were obtained from 3 healthy inhabitants of rural areas in Argentina and from 3 healthy European individuals. Sera from a group of 18 patients with other protozoan infections taken from the serum bank of our Institute (5 patients infected by

Leishmania donovani chagasi, 5 patients infected by *Leishmania braziliensis braziliensis*, 8 patients infected by *Trypanosoma gambiense*) were also used in this study.

Enzyme assay

The glutathione S-transferase activity of the TcGBP (15–25 µg) was measured spectrophotometrically (Beckman Model 24) at 340 nm in a final volume of 1 ml of 0.1 M potassium phosphate, pH 6.5, at 25 °C. The concentrations of reduced glutathione and 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB) were respectively 5 and 1 mM. An extinction coefficient of mm^{-1} 9.6 cm^{-1} was used (Habig, Pabst & Jakoby, 1974).

Immunoprecipitation experiments

Immunoprecipitation analyses were carried out using a standard method with minor modifications. Briefly, aliquots of iodinated TcGBP (1×10^6 cpm) were diluted with 500 µl of TNENS buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% NP-40, 100 KIU/ml aprotinin, 2 mM PMSF and 0.3% sodium dodecyl sulphate (SDS)). Aliquots of [^{35}S]methionine-labelled *in vitro* translation products (5×10^5 cpm) were diluted with TNETS buffer (same as TNENS buffer except that NP-40 was replaced by 1.7% Triton X-100 (v/v)). In each case samples were incubated for 4 h at 4 °C with 30 µl of the appropriate serum. Immune complexes were then adsorbed on 10 mg (dry weight) of Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) by rocking overnight at 4 °C. After extensive washing, reactive antigens were eluted by boiling for 4 min with 40 µl of 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 3% SDS, 10% glycerol and 0.1 mM DTT before electrophoretic separation by SDS-PAGE.

Immunoblotting analysis

NP-40 trypomastigote extracts (50 µg/test) or purified TcGBP (5 µg/test) were fractionated by SDS-PAGE, electro-blotted onto nitrocellulose (Towbin, Staehelin & Gordon, 1979), and then incubated with various antisera. The antigens were detected with specific peroxidase-labelled anti-mouse IgG (Diagnostics Pasteur, Marnes la-Coquette, France) or anti-rat IgG (Biosys, Paris, France).

Indirect immunofluorescence assay (IFA)

IFA was performed on methanol-fixed parasites or on *in vitro*-infected murine fibroblasts as described in a previous report (Ouaissi *et al.* 1990). Briefly, slides were treated as follows: (a) anti-TcGBP antisera diluted 1/40 in phosphate-buffered saline (PBS: 10 mM potassium phosphate, pH 7.2, 0.15 M

NaCl) for 30 min at room temperature; (b) fluorescein-conjugated sheep anti-rat immunoglobulins (ICN, Lisle, IL, USA) diluted 1/40 in PBS for 30 min; (c) Evans blue diluted 1/1000 in PBS for 10 min.

Immunoelectron microscopy

Freshly released trypomastigotes and extracellularly differentiated amastigotes were fixed in 2% paraformaldehyde–0.1% glutaraldehyde, dehydrated in ethanol, and embedded in Lowicryl K₄M at –30 °C (Roth *et al.* 1981). Ultrathin sections were collected on carbon parlodion-coated nickel grids and floated for 30 min on PBS-OA (1% ovalbumin in PBS). They were then incubated for 1 h with anti-TcGBP antisera (diluted 1:5 in PBS-OA). After 3 washings in PBS-Tween 0.1%, the grids were incubated for 1 h with rabbit anti-rat IgG antibodies (Biosys, Paris, France) diluted 1:200 in PBS-OA. They were then washed and incubated for 1 h on 5 nm protein A-gold prepared according to Slot & Geuze (1985) diluted in PBS-OA (o.d. 525 nm = 0.05). After successive washings with PBS-Tween (4 times), PBS (twice) and distilled water (twice) sections were observed employing a Phillips electron microscope.

ELISA

Microtitration plates (Dynatech Laboratories, Inc.) were coated overnight at 4 °C with 0.1 µg of purified TcGBP/well in PBS. After saturation with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature, 100 µl of 1/500 diluted human sera were added into wells for 3 h at 37 °C. After 3 washes with PBS-Tween 0.1%, wells were incubated at 37 °C for 1 h with 100 µl of alkaline phosphatase-labelled either anti-human IgG or anti-human IgM immunoglobulins (Biosys, Compiègne, France) diluted respectively 1/1000 and 1/2000 in PBS-BSA. After 3 washes with PBS-Tween the presence of antibodies was detected with 100 µl or 1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate disodium salt (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) diluted in 0.5 M Na₂CO₃, 1 mM MgCl₂, for 1 h at 37 °C. The enzymatic reaction was stopped with 50 µl of 2 M NaOH. The absorbance was read at 405 nm using a Titertek Multiskan reader (Flow Laboratories, Baar, Switzerland).

RESULTS

Purification of the TcGBP

Affinity chromatography on glutathione-agarose has been widely used to purify glutathione S-transferases (GST) (Simons & Vander Jagt, 1981). This procedure was used to identify the putative *T. cruzi* glutathione binding proteins. The material eluted

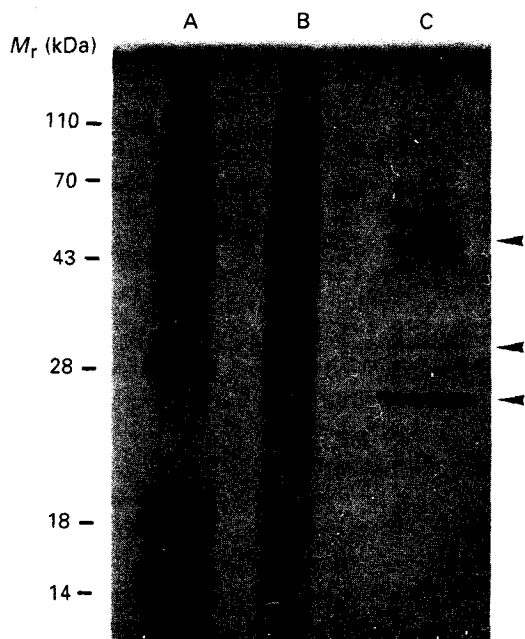


Fig. 1. Coomassie Blue-stained SDS-PAGE of molecular weight markers (BRL, Gaithersburg) (A), *Trypanosoma cruzi* epimastigote sonicate profile (B), epimastigote glutathione-binding proteins (C).

Table 1. Recovery of TcGBP in the absence (a) or presence (b) of 5 mM phenobarbital

Number of parasites	Amount of TcGBP obtained (μg)	Amount of TcGBP/ 10^9 parasites (μg)
Experiment 1		
(a) 18.4×10^9	360	19.5
(b) 5×10^9	307	61.4
Experiment 2		
(a) 20×10^9	308	15.4
(b) 18×10^9	550	30.5

from the glutathione agarose column (TcGBP) yielded 0.20% of the total loaded proteins. SDS-PAGE analysis of the GSH-binding fraction, performed under reducing conditions, revealed 2 major molecular species of 45 and 26 kDa and a less intense 30 kDa band (Fig. 1: lane C). Minor bands were also revealed at high molecular weights, corresponding to a non-specific binding as controlled by the agarose column eluate profile (data not shown). A comparative analysis of the TcGBP with the total profile of epimastigote sonicate (Fig. 1: lane B) clearly showed that these molecules were not major components.

Enzymatic activity of the TcGBP fraction

GST activity of TcGBP preparations was tested using 1-chloro-2,4 dinitrobenzene as substrate. It is noteworthy that no activity was detected in the epimastigote sonicate, possibly due to the low

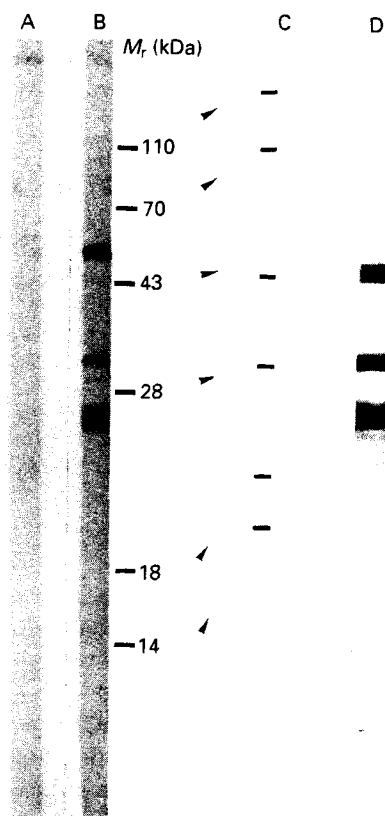


Fig. 2. Immunoblotting analysis of purified TcGBP antigens with serum of a mouse immunized with Bp adjuvant alone (A), serum of a mouse immunized with Bp and purified TcGBP (B), serum of a rat immunized with Bp adjuvant alone (C), serum of a rat immunized with Bp and purified TcGBP (D).

concentration of TcGBP in this crude material. By contrast, the GST activity could be easily measured when using purified TcGBP. The calculated enzymatic activity was 70 ± 28 nmol/min/mg of proteins (mean value of 9 experiments).

Effect of phenobarbital on TcGBP expression

Phenobarbital is known to be an inducer of GST synthesis (Pickett, 1989). As shown in Table 1, treatment of the parasites with 5 mM phenobarbital led to a 2 to 3-fold increase in TcGBP synthesis. The profile of the GSH-binding proteins and the specific GST activity from phenobarbital-induced epimastigote lysate were similar to those obtained in the absence of the drug (data not shown).

TcGBP expression by all parasite developmental stages

Antisera were obtained by immunization of rats and mice with the TcGBP in the presence of *Bordetella pertussis* plus aluminium hydroxide as adjuvant. By immunoblotting using the TcGBP as antigen, the three components of 45, 30 and 26 kDa were revealed by these antisera (Fig. 2: lanes B and D). The same proteins, as well as additional bands of higher

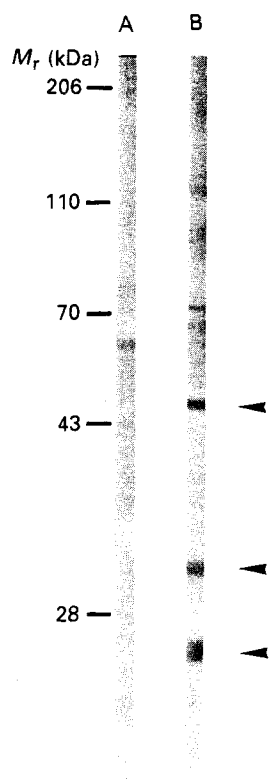


Fig. 3. Immunoblotting analysis of NP-40 trypomastigote antigen with control serum of a rat immunized with Bp adjuvant alone (A), serum of a rat immunized with Bp and purified TcGBP (B).

molecular weights were also detected in NP-40-soluble antigens from tissue culture-derived trypomastigotes (Fig. 3: lane B).

Using an indirect immunofluorescence assay, we further explored the expression of the TcGBP by different developmental stages of *T. cruzi*. Positive reactions were obtained on epimastigotes, and also on trypomastigotes, extracellular and intracellular amastigotes (Fig. 4). The most intense reaction was observed with extracellularly differentiated amastigotes. However, a variable reactivity was noticed within the trypomastigote population since anti-TcGBP antibodies did not react with all trypomastigotes.

Complementary investigations, using electron microscopy, were done in order to localize the immunoreactive material during the *in vitro* differentiation of trypomastigotes. As shown in Fig. 5A, recently released trypomastigotes were poorly stained whereas a stronger labelling was associated with both surface and internal structures of amastigote-like forms (Fig. 5B).

Immunoprecipitation of *in vitro* translation products

In vitro translation products of epimastigote mRNA were immunoprecipitated with anti-TcGBP rat antisera (Fig. 6: lane C). The immunoprecipitated

polypeptides presented apparently the same molecular weight as the purified polypeptide subunits (45, 30 and 26 kDa), suggesting an absence of post-translational processing of these molecules including glycosylation. No other bands were visualized using this technique. The same profile was obtained with trypomastigote *in vitro* translation products (data not shown).

Immunogenicity of TcGBP during human and experimental chagasic infection

IgG antibody levels directed against TcGBP in chagasic patients sera were first assessed by an ELISA test using TcGBP-coated plates. Statistically higher O.D. values ($P = 1 \times 10^{-5}$) were obtained with chronic chagasic sera (0.671 ± 0.17) (Fig. 7F) than with control sera (0.153 ± 0.07) (Fig. 7A). Among chronic chagasic sera, no significant difference between the O.D. values was obtained between patients presenting an asymptomatic or a cardiopathic form of the disease. Moreover, no significant difference was observed between the O.D. values of the acute phase (Fig. 7E) and control sera (0.206 ± 0.112 and 0.153 ± 0.07 , respectively). Considering the upper limit of normal values as four standard deviations above the mean of the control group, 17 chronic sera among the 19 tested were positive. No acute-phase serum among the 13 tested gave a significant positivity. Control sera and all the 18 sera from patients presenting other protozoan infections were negative in this test (Fig. 7B, C, D). However, preliminary studies revealed that TcGBP specific IgM antibodies were present in some acute phase sera (3/5) which were negative in the IgG ELISA test (data not shown).

In order to investigate antigens recognized by chagasic sera among the TcGBP molecules, immunoprecipitation experiments were then performed using iodine-labelled TcGBP since this technique requires the use of small amounts of antigen. Mention should be made that neither Iodogen nor Chloramine T methods were able to label these proteins. The reason remains unknown but this observation could be related to the work of Tiu *et al.* (1988) who reported similar results concerning the *Schistosoma japonicum* 26 kDa GST. This might be due not to an absence of tyrosine in the molecules but rather to the non-accessibility of such residues during labelling. By contrast, the use of the Bolton-Hunter reagent, which reacts with the polypeptide amino groups, led to successful labelling of TcGBP. Results shown in Fig. 8a (lanes B, C, D, E) demonstrated that the two proteins of 45 and 26 kDa induced a strong antibody response in the course of chronic human Chagas' disease. The 30 kDa molecule which was the least abundant in TcGBP, was recognized by 1 serum among the 4 studied in this

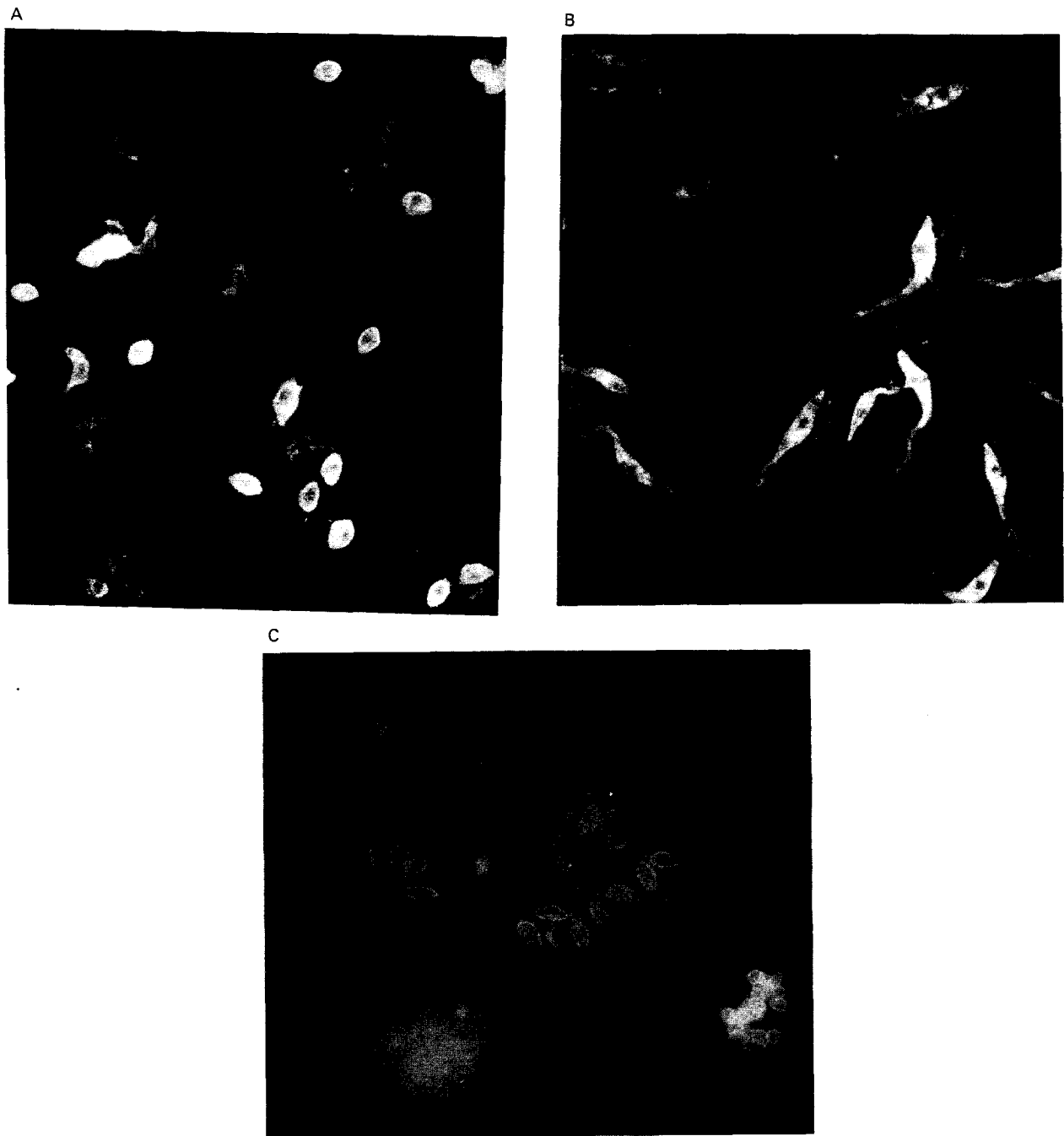


Fig. 4. Indirect immunofluorescence studies using an anti-TcGBP rat antiserum performed on methanol fixed material. (A) Heterogenous population comprising trypomastigotes and extracellular amastigotes, (B) epimastigotes and (C) intracellular amastigotes. No positive reaction was detected with serum obtained after immunization of a rat with adjuvant alone (not shown).

experiment. The acute-phase serum tested weakly recognized only the 45 kDa protein (Fig. 8a, lane A).

Complementary investigations were done by this same technique to detect the antibody response against TcGBP during the experimental infection of BALB/c mice. As shown in Fig. 8b the three TcGBP are immunogenic during the chronic phase of the disease (lanes C and D) whereas the 45 kDa molecule is slightly recognized by the mouse acute-phase sera (lanes E, F). Additional higher bands around 70 kDa were also weakly visualized with

immunization and infection sera, in both immunoprecipitation experiments.

DISCUSSION

Glutathione S-transferases (GSTs) have been studied in such phylogenetically unrelated organisms as mammals, insects, plants and helminth parasites. Protection experiments performed with *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica* GST suggested that these enzymes could be a component of anti-parasite



Fig. 5. Electron micrographs of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes (A) and extracellularly differentiated amastigotes (B) showing the reactivity of rat serum directed against the TcGBP. *k*, Kinetoplast; *n*, nucleus.

vaccines (Taylor *et al.* 1988; Mitchell, 1989; Capron *et al.* 1990; Sexton *et al.* 1990). In protozoan parasites no attention has been devoted to the study of these enzymes apart from the work of Yawetz & Agosin (1981) on the *T. cruzi* epimastigote stage.

The present work was undertaken to isolate the putative glutathione S-transferases of *T. cruzi* using

immobilized glutathione affinity chromatography. Three epimastigote polypeptides of 45, 30, and 25 kDa (named TcGBP) bound specifically to GSH. The two proteins of 30 and 26 kDa are in the molecular weight range of GST subunits (Ketterer, Meyer & Clark, 1988), whereas the molecular weight of the third component was unexpected. However,

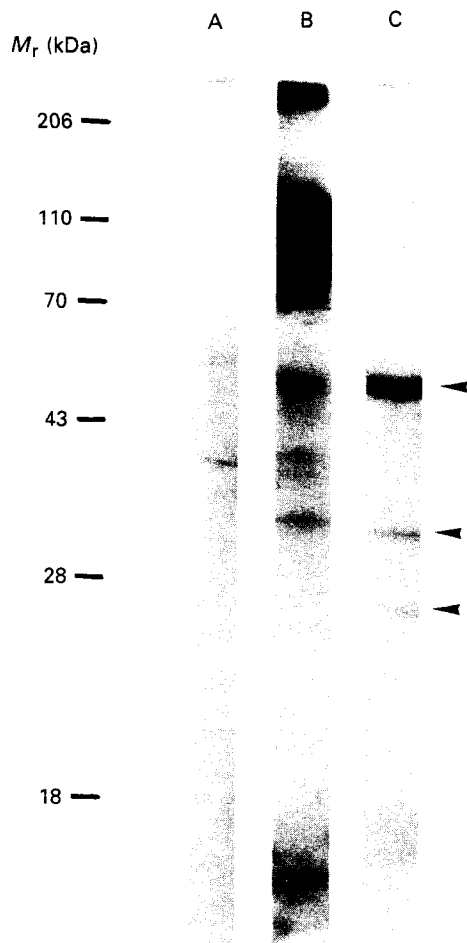


Fig. 6. SDS-PAGE analysis of the immunoreactive molecules from ^{35}S -labelled epimastigote *in vitro* translation products using (A) control serum of a rat immunized with Bp adjuvant alone, (B) infected rat serum and (C) a serum of a rat immunized with purified TcGBP and Bp as adjuvant.

unusual molecular weights of GST subunits have been reported particularly in the case of non-vertebrate enzymes (Clark, 1989).

Immunoprecipitation of *in vitro* translation products with anti-TcGBP antisera suggested an absence of post-translational processing. This is in agreement with the holoproteic nature previously described for all known GSTs (Pickett, 1989).

TcGBP expressed a glutathione S-transferase activity as demonstrated using CDNB as second substrate. The specific GST activity obtained (70 nmoles of CDNB/min/mg) is similar to those reported by Yawtez & Agosin (1981). These authors described a *T. cruzi* enzyme at 37 kDa, purified by several steps of chromatography and presenting a GST activity of 86.8 nmoles of CDNB/min/mg. Nevertheless, in both cases, this specific activity is very low when compared to those reported with other purified parasite GSTs. For instance, *Schistosoma mansoni* 28 kDa GST presents a GST activity of 124 μ moles of CDNB/min/mg (Taylor *et al.* 1988). It is important to note that CDNB is usually

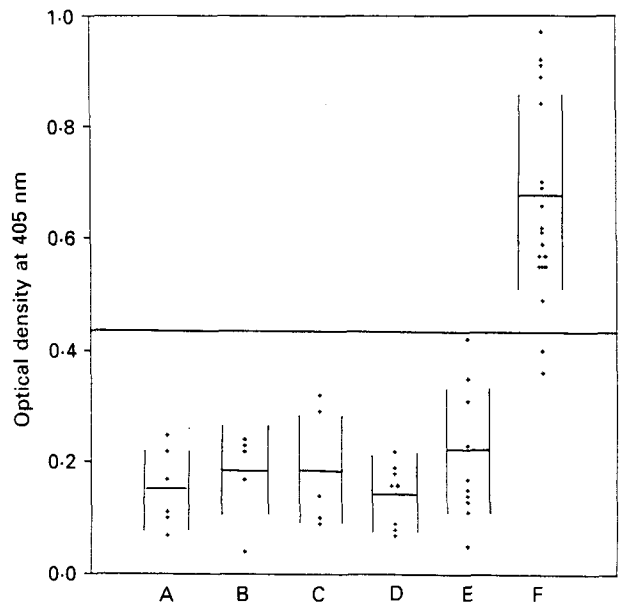


Fig. 7. Reactivity of human sera with purified TcGBP antigens using an ELISA test performed as described in the Materials and Methods section. (A) Control sera (6); (B) *Leishmania donovani chagasi*-infected patients sera (5); (C) *Leishmania braziliensis braziliensis*-infected patients sera (5); (D) *Trypanosoma gambiense*-infected patients sera (8); (E) acute chagasic sera (13); (F) chronic chagasic sera (19). (*) is the number of samples studied.

considered as the universal substrate for unfractionated GSTs but that some GST subunits (rat GST subunits 5 and 9 for example) fail to use this compound (Ketterer *et al.* 1988). Experiments with various substrates are now in progress to test if this is the case for *T. cruzi* glutathione-binding proteins. It could also be possible that the TcGBP might need a cofactor to express its optimal GST activity. Indeed, it was shown that the trypanosomatid glutathione reductase needs a novel glutathione-spermidine conjugate, also named trypanothione (Fairlamb & Cerami, 1985; Krauth-Siegel *et al.* 1987). In addition, the nature of the polypeptide(s) among the TcGBP which support(s) this enzymatic activity remains to be determined.

Various drugs, including phenobarbital, have been shown to induce the expression of rat liver detoxifying enzymes. Pickett, Wells & Lu (1981) have demonstrated that phenobarbital could induce rat hepatic B GST messenger RNA. Moreover, Agosin *et al.* (1976) have shown that *T. cruzi* cytochrome P-450 activity was increased by this xenobiotic and it has been suggested that many GST substrates could be metabolites of the cytochrome P-450 dependent, monooxygenase system (Ketterer *et al.* 1988). We have shown that TcGBP expression was increased after incubation of epimastigotes with phenobarbital. Moreover, no variation in the specific GST activity was detected in the presence or in the absence of the drug, indicating an induction in GST synthesis. In

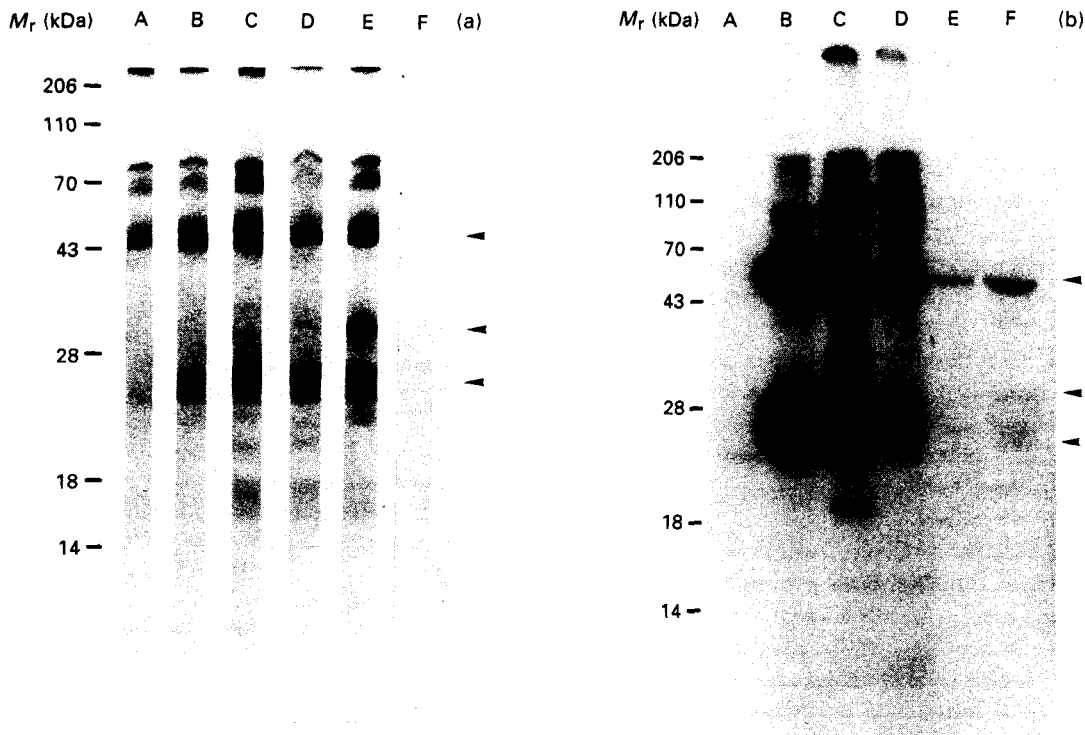
T. cruzi glutathione-binding proteins

Fig. 8. (a) SDS-PAGE analysis of the immunoreactive molecules from iodine-labelled TcGBP using different human sera. (A) Acute-phase serum; (B-E) chronic chagasic sera; (F) normal serum. (b) SDS-PAGE analysis of the immune precipitate from iodine-labelled TcGBP using different mouse antisera. (A) Serum of a mouse immunized with Bp adjuvant only; (B) serum of a mouse immunized with TcGBP and Bp as adjuvant; (C, D) chronic chagasic mouse sera; (E, F) acute chagasic mouse sera.

the case of *T. cruzi* it will be of interest to determine the regulatory pathways (transcription, mRNA induction) which lead to such increases in TcGBP synthesis.

TcGBP purification was performed with epimastigotes which are poorly infective for vertebrates. It was then essential to look for the presence of the glutathione binding-molecules in parasite developmental stages which are more relevant in the course of infection. A heterogeneous reactivity was noticed among the trypomastigotes by IFA studies since anti-TcGBP antibodies reacted only with some of these forms. This observation needs to be related to previous work which suggested that morphologically similar trypomastigotes differentially display relevant antigens. Cavallesco & Peirera (1988) have demonstrated that antibodies to the neuraminidase of infective forms identify a subpopulation of trypomastigotes and that this enzyme seems to modulate negatively the *in vitro* infection of host cells. Concerning the TcGBP, the biological significance of this phenomenon needs to be explored further. Moreover, immunofluorescence and immuno-electron microscopical studies using anti-TcGBP immune sera revealed a strong labelling associated with the surface of extracellular differentiated amastigotes. This is of particular interest since these forms have been shown to initiate *in vitro* infection (Piras *et al.* 1982) and have been detected in

the bloodstream of infected mice (Andrews *et al.* 1987). On the other hand, the mechanisms whereby protozoan parasites survive in phagocytes are controversial (Mauel, 1984). McCabe & Mullins (1990) have recently shown that *T. cruzi* failed to trigger the respiratory burst of activated macrophages and suggested that oxygen-independent mechanisms might be involved in the intracellular destruction of parasites. The molecular basis of the ability of *T. cruzi* amastigotes to survive inside the cell is still unknown. The elevated expression of TcGBP by intracellular amastigotes is in favour of the defensive role of these proteins against host attack.

The antibody response elicited by TcGBP during the natural and experimental Chagas' disease clearly demonstrated that these antigens were exposed to the host immune system during infection, mainly during the chronic phase. Indeed, in the acute-phase human sera, anti-TcGBP specific IgG was not detected although preliminary results suggested the presence of specific IgM. This early immune response during the infection was confirmed by the immunoprecipitation method, using *Staphylococcus aureus* Protein A, which was able to partially bind human IgM. The detection of a specific antibody response directed against the 45 kDa molecule, in acute-phase mouse sera could be explained by the high sensitivity of this technique. The poor immunogenicity of the TcGBP during the acute phase could

be related to their weak expression at the surface of the trypomastigote which is the predominant stage during the first weeks of infection. By contrast, the immunogenicity of these molecules during the chronic phase was demonstrated by the ELISA test and by the immunoprecipitation study. In spite of some differences in the immunoprecipitation profiles, it is clear that the three TcGBP of 45, 30, and 25 kDa are able to elicit a strong antibody response during this phase in the natural and experimental disease.

In addition, sera from patients with other protozoan infections which commonly present cross-reactivity with Chagas' infection showed no reactivity with TcGBP, clearly demonstrating the species specificity of these molecules and suggesting their possible use in diagnosis.

Minor molecules of high molecular weight, due to non-specific glutathione binding, were present in the GSH-agarose eluate and, in some experiments, immune reactivity against these molecules of high molecular weight were also weakly visualized. Nevertheless, only the 45, 30, and 25 kDa proteins were detected in immunoprecipitation of *in vitro* translation products, suggesting that the proteic moieties of the high molecular weight molecules were slightly or not immunogenic. The one-step purification procedure used to obtain TcGBP antigens needs to be improved by further chromatographic steps to perform both complementary enzymatic and immunological studies.

During the last few years, studies concerning potential protective antigens of *T. cruzi* have been principally focused on major trypomastigote surface glycoproteins (Goldenberg *et al.* 1983). This vaccine strategy would aim to induce an immune response able to block the very early parasite invasion process (Scott & Snary, 1979; Snary, 1983; Yoshida, 1986; Ouaisi *et al.* 1990). The possible importance of the amastigote stage has been largely neglected, as underlined by Andrews *et al.* (1987) and Ley *et al.* (1988). We are therefore attempting to follow an alternative strategy based on the identification of target antigens essential for the development of the parasite in its host. The fact that TcGBP were expressed by all developmental stages including dividing forms, that they may play a key role in parasite survival, and that they induce an immune response in the host during infection, all encourage us to evaluate their potential protective role in murine Chagas' disease. Finally, the antibody probes clearly directed against polypeptidic structures will be useful to undertake the molecular cloning of these molecules.

The authors would thank Dr J. Y. Cesbron and Dr R. J. Pierce for helpful comments about this work. This work was supported by INSERM U167-CNRS 624 and the MERIEUX Foundation.

REFERENCES

- AGOSIN, M., CHERRY, J., PEDEMONTI, J. & WHITE, R. (1984). Cytochrome P-450 in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **78C**, 127-32.
- AGOSIN, M., NAQUIRA, C., PAULIN, J. & CAPDEVILA, J. (1976). Cytochrome P-450 and drug metabolism in *Trypanosoma cruzi*: effects of phenobarbital. *Science* **194**, 195-7.
- ANDREWS, N. W., HONG, K. S., ROBBINS, E. S. & NUSSENZWEIG, V. (1987). Stage specific surface antigens during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* **64**, 474-84.
- ARRICK, B. A., GRIFFITH, O. W. & CERAMI, A. (1981). Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. *Journal of Experimental Medicine* **153**, 720-5.
- BOLTON, A. E. & HUNTER, W. M. (1973). The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I containing acylating agent. *The Biochemical Journal* **133**, 529-39.
- BOVERIS, A., SIES, H., MARTINO, E. E., DOCAMPO, R., TURRENS, J. F. & STOPPANI, A. O. M. (1980). Deficient metabolism utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal* **188**, 643-8.
- BRENER, Z. A. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology* **27**, 347-83.
- CAPRON, A., BALLOUL, J. M., GREZEL, D., GRZYCH, J. M., WOLOWCZUK, I., AURIAULT, C., BOULANGER, D., CAPRON, M. & PIERCE, R. J. (1990). Progress towards vaccination against schistosomiasis. In *Molecular Aspects of Immune Response and Infectious Diseases* (ed. Kiyono, H., Jirillo, E. & DeSimone, C.), pp. 183-91. New York: Raven Press Ltd.
- CAVALLESCO, R. & PEREIRA, M. E. A. (1988). Antibody of *Trypanosoma cruzi* neuraminidase enhances infection *in vitro* and identify a subpopulation of trypomastigotes. *Journal of Immunology* **140**, 617-25.
- CHIRGWIN, J. M., PRZYBYLA, A. E., MACDONALD, R. J. & RUTTER, W. J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18**, 5294-9.
- CLARK, A. G. (1989). The comparative enzymology of the glutathione S-transferases from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* **92B**, 419-46.
- CORNETTE, J., CAPRON, A. & OUAISSI, M. A. (1988). *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **86**, 139-46.
- DRAGON, E. A., BROTHERS, V. M., WRIGHTSMAN, R. A. & MANNING, J. (1985). A Mr 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for Chagas' disease diagnostic antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**, 213-29.
- FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. (1985). Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology* **14**, 187-98.

T. cruzi glutathione-binding proteins

- GOLDENBERG, S., CONTRERAS, V. T., SALLES, J. M., FRANCO, M. P. A. L., BONALDO, M. C., VALLE, D., CONCALVES, A. M. & MOREL, C. L. (1983). Perspectives for vaccinations against Chagas' disease through biotechnology. II. Gene expression in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and cell free translation of mRNA coding for relevant antigens. In *New Approaches to Vaccine Development. Proceedings of a Meeting organized by the W.H.O.* 442.
- GONZALEZ, J., ARAGUTH, M. F. & YOSHIDA, N. (1991). Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90-kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Infection and Immunity* **58**, 863-7.
- HABIG, W. H., PABST, M. J. & JAKOBY, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-9.
- JAFFE, C. L., GRIMALDI, G. & McMAHON-PRATT, D. (1984). The cultivation and cloning of *Leishmania*. In *Genes and Antigens of Parasites: a Laboratory Manual*, 2nd Edn (ed. C. M. Moser), p. 47. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.
- KETTERER, B., MEYER, D. J. & CLARK, A. G. (1988). Soluble glutathione transferase enzymes. In *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (ed. Sies, H. & Ketterer, B.), pp. 73-135. London: Academic Press.
- KRAUTH-SIEGEL, L., ENDERS, B., HENDERSON, G. B., FAIRLAMB, A. H. & SCHIRMER, R. H. (1978). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry* **164**, 123-8.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680-5.
- LEMESRE, J. L., AFCHAIN, D., OROZCO, O., LOYENS, M., BRENIERE, F. S., DESJEUX, P., CARLIER, Y., MARTIN, U., NOGUEIRA-QUEIROZ, A., 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. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**, 86-93.
- LEY, V., ANDREWS, N. W., ROBBINS, E. S. & NUSSENZWEIG, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine* **168**, 649-59.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, J. R. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-75.
- MAUEL, J. (1984). Mechanisms of survival of protozoan parasites in mononuclear phagocytes. *Parasitology* **88**, 579-92.
- MCCABE, R. E. & MULLINS, B. T. (1990). Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. *Journal of Immunology* **144**, 2384-6.
- MITCHELL, G. (1989). Glutathione S-transferases-potential components of anti-schistosome vaccines? *Parasitology Today* **5**, 34-7.
- MONCADA, C., REPETTO, Y., LETELIER, M. E. & MORELLO, A. (1989). Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comparative Biochemistry and Physiology* **94**, 87-91.
- MORELLO, A. (1988). The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90**, 1-12.
- OROZCO, O., AFCHAIN, D., RODRIGUEZ, C., OVLAQUE, G., LOYENS, M. & CAPRON, A. (1982). Production d'un anticorps monoclonal anti-antigène 5 de *Trypanosoma cruzi*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris* **295**, 783-5.
- OUAISSI, M. A., CORNETTE, J. & CAPRON, A. (1986). Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. *Molecular and Biochemical Parasitology* **19**, 201-11.
- OUAISSI, M. A., TAIBI, A., CORNETTE, J., VELGE, P., MARTY, B., LOYENS, M., ESTEVA, M., RIZVI, F. S. & CAPRON, A. (1990). Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. *Parasitology* **100**, 115-24.
- PICKETT, C. B. (1989). Glutathione S-transferases: gene structure, regulation and biological function. *Annual Review of Biochemistry* **58**, 743-64.
- PICKETT, C. B., WELLS, W. & LU, A. Y. H. (1981). Induction of translationally active rat liver glutathione S-transferase B messenger RNA by phenobarbital. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **99**, 1102-10.
- PIRAS, M. M., PIRAS, R. & HENRIQUEZ, D. (1982). Changes in morphology and infectivity of cell-culture derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **6**, 67-81.
- REPETTO, Y., LETELIER, M. E., ALDUNATE, J. & MORELLO, A. (1986). The γ -glutamyltranspeptidase of *Trypanosoma cruzi* (1986). *Comparative Biochemistry and Physiology* **87B**, 73-8.
- ROTH, J., BENEDAYAN, M., CARLEMALM, E., VILENGER, W. & GARAVITO, M. (1981). Enhancement of structural preservation of immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **29**, 663-71.
- SCHARFSTEIN, J., LUQUETTI, A., MURTA, A. C. M., SENNA, M., REZNDÉ, J. M., RASSI, A. & MENDOÇA-PREVIATO, L. (1985). Chagas' disease: serodiagnosis with purified GP25 antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **34**, 1153-60.
- SCHOFIELD, C. J. (1985). Control of Chagas' disease vectors. *British Medical Bulletin* **41**, 187-94.
- SCOTT, M. T. & SNARY, D. (1979). Protective immunization in mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature, London* **73**, 282-3.
- SEXTON, J. L., MILNER, A. R., PANACCIO, M., WADDINGTON, J., WIJFFELS, G., CHANDLER, D., THOMPSON, C., WILSON, L., SPITHILL, T. W., MITCHELL, G. F. & CAMPBELL, N. J. (1990). Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* in sheep. *Journal of Immunology* **145**, 3905-10.
- SIMONS, P. C. & VANDER JAGT, D. L. (1981). Purification of glutathione S-transferase by glutathione-affinity chromatography. *Methods in Enzymology* **77**, 235-7.
- SLOT, J. L. & GEUZE, H. J. (1985). A new method of preparing gold probes for multiple-labelling

B. Plumas-Marty and others

- cytochemistry. *European Journal of Cell Biology* **38**, 87-93.
- SNARY, D. (1983). Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **77**, 126-9.
- TAYLOR, J. B., VIDAL, A., TORPIER, G., MEYER, D. J., ROITSCH, C., BALLOUL, J. M., SOUTHAN, C., SONDERMEYER, P., PEMBLE, S., LECOCQ, J. P., CAPRON, A. & KETTERER, B. (1988). The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned M₁28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *The EMBO Journal* **7**, 465-72.
- TIU, W. U., DAVERN, K. M., WRIGHT, M. D., BOARD, P. G. & MITCHELL, G. F. (1988). Molecular and serological characteristics of the glutathione S-transferases of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **10**, 693-706.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350-4.
- YAWETZ, A. & AGOSIN, M. (1979). Epoxide hydrolase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochimica et Biophysica Acta* **585**, 210-19.
- YAWETZ, A. & AGOSIN, M. (1981). Purification of the glutathione S-transferase of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **68B**, 237-43.
- YOSHIDA, N. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. *Experimental Parasitology* **61**, 184-91.

Article 2

ARTICLE 2***Les protéines de Trypanosoma cruzi fixant le glutathion induisent une immunoprotection lors de l'infection expérimentale de la souris***

Nous avons ici voulu évaluer le **pouvoir protecteur** des trois antigènes TcGBP dans le modèle de l'infection expérimentale de la souris.

La première expérience a été effectuée en utilisant les antigènes TcGBP en présence de deux adjuvants puissants, l'**adjuvant complet de Freund** (FCA/IFA), ainsi qu'une préparation commerciale utilisable chez l'homme composée de *Bordetella pertussis* et d'**alun** (hydroxide d'aluminium) (BpAl). Des souris BALB/c immunisées, ainsi que des souris contrôle, ont été infectées par 5000 trypomastigotes sanguicoles. Seules les souris immunisées par les TcGBP en présence de BpAl présentaient une très faible parasitémie. En revanche, les souris immunisées par les mêmes antigènes, mais en présence d'ACF/AIF n'étaient pas protégées, de même que les souris de tous les groupes contrôle. Seize jours après l'infection, toutes les souris TcGBP-CFA/IFA étaient mortes. Par contre, toutes les souris TcGBP-BpAl étaient vivantes 24 jours après l'infection et deux d'entre elles vivaient encore 54 jours après l'infection.

Seuls les sérums des souris immunisées par TcGBP-BpAl étaient capables de **lyser** des parasites vivants en présence de **complément**, ce qui n'était pas le cas pour les sérums des souris immunisées par les mêmes antigènes en présence de CFA/IFA.

La seconde expérience de protection a été réalisée sur un plus grand nombre de souris, en n'utilisant que **BpAl** comme adjuvant. L'infection a été effectuée avec une plus faible dose de parasites (2000), ceci pour optimiser les taux de protection. Nous avons ici confirmé le rôle protecteur des antigènes **TcGBP** puisque les animaux immunisés présentaient à nouveau des taux de parasitémie beaucoup plus faible que les animaux témoins. De la même manière, tous les animaux contrôles mourraient en 40 jours alors que toutes les souris ayant reçu les antigènes **TcGBP** en présence de **BpAl** survivaient 4 mois après l'infection.

La réponse humorale spécifique des **TcGBP** chez les souris immunisées et infectées a été étudiée. De l'analyse des divers profils isotypiques, il ressortait que:

1- Les anticorps spécifiques de type **IgG1** étaient détectés chez les souris immunisées en présence de l'un ou l'autre des adjuvants utilisés.

2- Par contre, seuls les animaux immunisés en présence de **BpAl**, présentaient dans les deux expériences, des taux significatifs d'**IgG2a**, d'**IgG2** et d'**IgE** spécifiques des **TcGBP**, taux augmentés après l'infection.

Les résultats obtenus ici montraient donc que d'une part, les antigènes **TcGBP** induisaient une immunité protectrice chez la souris, la protégeant contre la phase aiguë et que d'autre part, cette réponse immunoprotectrice était liée à la nature de l'adjuvant utilisé.

**TRYPANOSOMA CRUZI GLUTATHIONE BINDING PROTEINS
(TcGBP):
PROTECTION INDUCED BY NATIVE PROTEINS IN AN
EXPERIMENTAL MODEL AND ANALYSIS OF THE ANTIBODY
RESPONSE.**

RUNNING TITLE: *T. cruzi* glutathione-binding molecules protect mice from an acute chagasic infection.

By

Béatrice Plumas-Marty *¹, Ali Taibi ¹, Héléosina Pessoa ², Claudie Verwaerde ¹ Marc
Loyens ¹, Valérie Pommier ¹, Philippe Velge ³, Ali Ouaiissi ¹
& André Capron ¹.

From the 1: Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité Mixte INSERM U.167
CNRS 624, Institut Pasteur, 59019 Lille, France; 2 : Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade do Estado de Rio de Janeiro, Brazil; 3: Institut National de la Recherche
Agronomique, Nouzilly, France.

Address correspondence and reprint request to:

Béatrice PLUMAS-MARTY, C.I.B.P., Institut Pasteur, 1, rue du Pr. Calmette, BP.245,
59019 LILLE (France)

Abbreviations used in this paper: Bp: *Bordetella pertussis*; CFA: Complet Freund's adjuvant; IFA: Incomplet Freund's adjuvant; Al: alum; *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*; TcGBP: *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins.

Summary

Three glutathione-binding proteins (TcGBP) of 45, 30, and 25 kD, presenting a GST activity, were characterized from *T.cruzi* epimastigotes. We have shown here that immunization of mice using TcGBP and Freund Complete Adjuvant (FCA) did not protect the animals against a challenge with bloodstream trypomastigotes. In contrast, immunization of mice using TcGBP in association with *Bordetella pertussis* plus alum (BpAl) resulted in a greatly diminished parasitemia and significantly protected the animals from a lethal infection. Using TcGBP mixed with BpAl, and a lower challenge dose, we obtained a strongly diminished parasitemia and 100% of protection in term of survival. Only sera from mice immunized with TcGBP plus BpAl were able to kill trypomastigotes in a complement mediated lysis, comparatively with sera from mice immunized with TcGBP plus FCA. Interestingly, sera from mice immunized with TcGBP plus BpAl presented a significant level of IgE, IgG2a, IgG2b specific antibodies whereas these isotypes were not detected in sera from mice immunized with TcGBP in presence of FCA. These levels of specific IgE, IgG2a and IgG2b were all increased in sera of protected animals. These results demonstrated that TcGBP antigens can confer resistance to mouse *T.cruzi* acute infection and suggested the possible functional role of both IgE and IgG2 isotypes in the induction of the induced protective immunity.

1. Introduction

The importance of *T. cruzi* in human health has focused research on the improvement of the existing chemotherapeutic approach since until now the possibility of developing an effective vaccine against Chagas' disease is still controversial (1). Biological and immunological studies have revealed the complexity of the relationships between *T. cruzi* and its vertebrate host (2). Since it is supposed that different preparations of whole parasites could induce both immunosuppression and autoimmunity, identification of potential purified protective antigens is considered as the only suitable strategy in order to obtain an active vaccine (3). No correlation has been yet demonstrated between the intensity of the acute phase and the severity of the chronic phase of the disease. However, it is generally assumed that even a mild acute phase leads to severe chronic disorders. Thus, only molecules affording total protection in experimental models can be retained as candidate vaccines.

Up today, some surface glycoproteins have shown to be partially protective in the murine model. A 90 kD antigen, expressed by all developmental stages of the parasite was shown to be protective against both metacyclic and bloodstream trypomastigote challenges (4) whereas a 72 kD protein specific for insect stages was found to induce protection only against metacyclic trypomastigote infection (5). Several antigens presenting a flagellar localization in epimastigotes have also been described as potentially protective (6, 7). More recently, interesting results have been obtained using a 90 kD antigen, specific for metacyclic trypomastigotes in combination with alum as adjuvant (8). Partial protection has also been achieved in rats by passive transfer of antibodies directed against a trypomastigote excretory-secretory antigen (9). Moreover, recent investigations have shown that parasite plasmatic exoantigens could protect mice in terms of parasitemia, against a lethal *T. cruzi* infection (10).

In all these cases, the contribution of the proteic or glucidic moieties of the protective antigens was not established. Moreover, despite the fact that a number of cloned *T. cruzi* antigens is available (11), no clear evidence has been established concerning the

immunoprotective properties of such recombinant proteins in experimental models.

Using affinity chromatography, we have characterized three glutathione-binding proteins of 45, 30, and 25 kD, named TcGBP (12). These molecules were demonstrated to be not glycosylated, to present a glutathione S-transferase activity and to be expressed by all developmental stages of the parasite, including dividing intracellular amastigotes. In addition, immunocytochemical studies showed that they were highly expressed by extracellular amastigotes. Antibodies directed against TcGBP were found in a high proportion of chronic phase patients' sera and in sera of chronically infected BALB/c mice, whereas their immunogenicity during the acute phase seemed to be weaker.

These results led us to evaluate the potentially protective role of these molecules. In the present work, we present evidence indicating that these proteins were not protective when administered in combination with Freund's adjuvant (CFA/IFA) but could induce a significant degree of protection against lethal *T. cruzi* infection in the murine model, when administered with *Bordetella pertussis* plus alum (BpAl). Moreover, the analysis of anti-TcGBP specific antibody response in the sera of immunized/protected mice revealed a significant difference in the isotype profiles when using either CFA/IFA or BpAl. Results are discussed in terms of possible immune effector mechanisms induced by the TcGBP antigens.

2. Material and methods

2.1 Parasites

T. cruzi Y strain was used throughout this study. Bloodstream trypomastigotes were maintained by serial passages in male BALB/c mice. Trypomastigotes were also maintained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as previously described elsewhere (13). Epimastigotes were cultured in Glucose Lactalbumin Serum Haemoglobin medium as reported before (14).

2.2 Preparation of TcGBP antigens

TcGBP antigens were prepared from *T. cruzi* epimastigotes using glutathione affinity chromatography (12). Each preparation was checked by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining. Protein concentration was determined according to the method of Lowry (15). TcGBP antigens were kept at -70°C until used.

2.3 Immunization of mice with TcGBP

Four week old male BALB/c mice were inoculated intraperitoneally with three doses of 20 µg of TcGBP antigens, at 15-day intervals, in the presence of either 100 µl of complete Freund's adjuvant (CFA) for the first injection or 100 µl of incomplete Freund's adjuvant (IFA) for the two following boosts.

In an alternative protocol, mice received three doses of 20µg antigen by the same route in the presence of 30 µl of *Bordetella Pertussis* plus alum (BpAl) [Vaxicoq, Institut Mérieux, France: 4 U.I. of *Bordetella pertussis* and 1.25 mg of aluminium hydroxide / 500 µl].

Groups of sex- and age matched non immunized mice and animals injected with appropriate adjuvant alone were also used as controls. Two weeks after the last immunization, animals were bled from the retro orbital sinus and sera were stored at -70°C until used. Five days later, all groups were challenged with 5×10^3 or 2×10^3 bloodstream trypomastigotes. The course of parasitemia and survival were then followed. Sera of protected mice were also collected and kept at -70°C until used.

2.4 Lysis assay

The complement mediated lysis assay with culture-derived trypomastigotes was performed as described (16).

2.5 ELISA

Microtitration plates (Dynatech Laboratories, Inc.) were coated overnight at 4°C with 0.1 µg of purified TcGBP per well in PBS (10 mM potassium phosphate, pH 7.2, 0.15 M NaCl). After saturation with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 1 h at room temperature, mouse sera diluted 1/100 were added to the wells for 3 h at 37°C. After 3 washes with PBS-Tween 0.1%, wells were incubated with 100 µl of peroxidase-labelled anti-isotype antibodies, as described in Table 1. After 3 washes with PBS-Tween the presence of antibodies was revealed with 100 µl of enzyme substrate (P. nitrophenyl phosphate disodium salt, Sigma chemical Co., St Louis, MO) for 30 min at room temperature. The enzymatic reaction was stopped with 50 µl of 2 M NaOH. The optical density was read at 492 nm using a Titertek Multiskan reader (Flow Laboratories, Baar, Switzerland).

2.6 RIA

Microtiter plate wells (Microtest Flexible Assay Plate, Falcon, Oxnard, CA) were coated overnight at 4°C with 0.1 µg of TcGBP antigens in 100 µl of 0.015 M Na₂CO₃/0.035 M NaHCO₃ buffer pH 9.6 and then saturated at room temperature with 100 µl PBS 2% BSA. 100 µl of different mice sera diluted 1/20 were then added. The plates were incubated for 3 h at 4°C, then washed three times in PBS- Tween 0.1%. A final overnight incubation at 4°C with 10⁵ cpm ¹²⁵I labeled anti-mouse IgE (Chloramine T method, sp. ac. 503 kBq/µg) allowed detection of anti-TcGBP specific IgE. After three washes, as described above, the wells were cut out and counted in a gamma counter (LKB, Bromma, Sweden) with a counting efficiency of 60%.

3 Results

3.1 Comparison of the protective properties of TcGBP using two adjuvants

The first protection experiment was performed using TcGBP antigens and two different adjuvants, CFA/IFA and BpAl. Groups of 5 mice each were challenged with 5×10^3 bloodstream trypomastigotes. As shown in Fig. 1a, only mice which received TcGBP plus BpAl presented a very low parasitemia. In contrast, mice immunized with CFA/IFA were not protected since the number of circulating parasites was similar to that detected in mice from the three control groups.

At day 16, all the control and TcGBP-CFA/IFA mice had died. In contrast, all the TcGBP-BpAl mice survived up to day 24 and at day 54, two of them were still alive (Fig. 1b). These two mice were free of circulating parasites and were then sacrificed in order to perform preliminary immunological studies.

3.2 Trypanolytic activity of sera from mice immunized with TcGBP

Sera from the different groups of mice were tested in an *in vitro* complement mediated lysis assay in which chronically infected mice sera presented a maximal rate of lysis activity towards culture-derived trypomastigotes. As expected, neither normal mouse sera nor sera from mice injected with CFA/IFA or BpAl alone were able to lyse parasites. Sera from mice immunized with TcGBP-CFA/IFA did not exert any lytic activity on trypomastigotes, but interestingly, sera from mice immunized with TcGBP in association with BpAl presented a significant trypanolytic activity ($38.8 \pm 12.9\%$) (Table 2).

3.3 Effect of the challenge dose on the immunoprotection induced by TcGBP

The second protection experiment was performed on a greater number of mice, using only BpAl as adjuvant. The challenge was done with a reduced number of parasites (2×10^3) aiming to optimize the level of protection in comparison with the first experiment. In these conditions, TcGBP/BpAl vaccinated mice presented a very low number of bloodstream trypomastigotes when compared to the two control groups (Fig. 2a). From 34 to 120 days post infection (not shown on the parasitemia curve) no parasite was detected in

the bloodstream of the protected mice. Surprisingly in this second experiment, the level of parasitemia was higher in the mice immunized with BpAl alone than in the non-immunized mice.

All mice of these two control groups died within 40 days, whereas all six mice immunized with TcGBP-BpAl survived (Fig.2b) up to four months after infection.

3.4 ELISA analysis of the TcGBP specific antibody response of mice prior and after challenge

In the first protection experiment, sera from mice immunized with TcGBP antigens in presence of CFA/IFA presented a significant level of specific IgG1 antibodies, as well as sera from mice immunized with the same antigens but in the presence of BpAl. Specific IgG3 were also weakly detected in the two groups of immunized mice sera. However no specific IgG2a and IgG2b isotypes were detected in mice of the first group whereas sera from mice immunized with TcGBP mixed with BpAl presented significant levels of these two isotypes. Interestingly, after challenge, sera from protected mice presented unchanged levels of specific IgG1, but significantly higher levels of IgG2a IgG2b and IgG3 isotypes. No IgM response was detected and all control mouse sera were negative in this test (Table 3).

Complementary investigations were done using sera from the animals of the second protection experiment. Results obtained confirmed our previous observations, (Plumas-Marty et al.,1992) clearly demonstrating the weak immunogenicity of TcGBP during the acute infection in mice (Fig. 3 a - e: C), and the immunogenicity of these molecules during the mouse chronic phase in terms of IgG1, IgG2a and IgG2b (Fig. 3 a, b, c: D) isotypes. Mice immunized with TcGBP and BpAl as adjuvant also presented IgG1, IgG2a and Ig2b (Fig.3a, b, c: E) specific isotypes. The level of these three isotypes were all weakly increased in the protected mice sera, 80 days after the challenge (Fig. 3 a, b, c, : F), confirming therefore the results obtained in the first experiment where a challenge dose two and a half times greater was used. Neither TcGBP specific IgG3 nor IgM were detected in this test (Fig. 3 d,e).

3.5 RIA analysis of TcGbp specific IgE response of immunized and

protected mice

As shown in Table 4, in the first protection experiment, only mice immunized with TcGBP in presence of BpAl, but not in presence of CFA/IFA developed a significant specific IgE response. Two sera from protected mice (40 days after infection) were found to present higher levels of specific IgE than those of the mice before infection, indicating an enhancement of the IgE specific antibody response following challenge infection.

We also analysed the TcGBP specific IgE antibody response in the sera from mice of the second protection experiment. As expected, sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl as adjuvant presented a significant level of specific IgE antibodies and this level was increased after challenge. Interestingly, the specific TcGBP IgE antibody response was found to be persistent four months after infection (Fig. 4).

4. Discussion

In a previous study (12), we have characterized three *T. cruzi* glutathione-binding proteins of 45, 30 and 25 kD, presenting a glutathione S-transferase (GST) activity. These unglycosylated antigens were found to be expressed by all developmental stages of the parasite, and were immunogenic during human and experimental chagasic infections. Work performed on *Schistosoma mansoni* and *Fasciola hepatica* have demonstrated that parasite GSTs could be considered as vaccine candidates due to their significant protective properties (17-20). The present study was undertaken to test the potential protective value of the TcGBP antigens in the experimental mouse model.

In preliminary experiments, a dose of 1000 bloodstream Y trypomastigotes was found sufficient to kill male BALB/c mice within 30 days (not shown). In the first protection experiment, a larger infective dose was chosen in order to detect only significant protective effects. Two adjuvants, CFA/IFA and BpAl were used because they were known to induce a strong stimulation of both cellular and humoral immunity (21), and also because BpAl was licensed for human use. Before infection, we verified using immunoblotting experiments, that sera of mice immunized with TcGBP in presence of CFA/IFA or BpAl reacted with the three molecules of 45, 30 and 25 kD (not shown). Immunization with TcGBP in presence of CFA/IFA did not induce a protective immune response in mice whereas immunization with the same antigen but mixed with BpAl, partially protected the animals. Immunization of mice using TcGBP in association with BpAl result in a decrease in parasitemia, but total protection against the acute phase was not achieved. Indeed, the protective effect was clear during the first days after challenge, but incomplete since after 54 days only two of five immunized mice survived.

This protective effect was confirmed in a second experiment, performed with BpAl as adjuvant, and a lower infective dose of bloodstream trypomastigotes. Surprisingly, the level of parasitemia was higher in the mice injected with BpAl alone than in the normal mice. Consequently, mice injected with BpAl alone died before the non immunized animals. This could be due to the possible toxicity of aluminium hydroxide to macrophages (22), which are both target but also effector immune cells in the context of the chagasic infection. All the control mice died during the first four weeks following the challenge. As expected,

mice which had received TcGBP antigens mixed with Bp/Al were protected when compared to the control groups, in terms of parasitemia and survival. They were all alive 4 months after the challenge, and were free of detectable circulating parasites.

In future experiments, attempts will be made in order to verify by appropriate methods such as PCR (23), the effective clearance of the parasites from the blood, but also to perform histological studies in order to investigate putative damage to mouse tissues with respect to myocarditis. TcGBP antigens, presenting a glutathione S-transferase activity, could be implicated in the induction of auto-immune processes. In preliminary tests, we have verified using immunoblotting experiments that anti-TcGBP antibodies did not cross-react with commercially available mammalian GST or with several mouse organ extracts: heart, sciatic nerve, liver, spleen, brain and muscle (not shown).

In a previous study, the presence of TcGBP in *T. cruzi* trypomastigotes and amastigotes was demonstrated. The antibody response elicited by these molecules during the mouse acute phase was weak. However, the protection conferred in this present work, by TcGBP antigens plus BpAl during the acute phase, clearly indicated that infective trypomastigotes were potential targets of the anti-TcGBP immune response.

Purified and defined *T. cruzi* antigens have been used as immunogens in a limited number of experiments. Most of the antigens tested, were protective only when administered in the presence of adjuvants inappropriate to human vaccination (4, 9, 24, 25). Epimastigotes flagellar antigens purified with the use of a monoclonal antibody, was shown to protect BALB/c mice against a challenge with Telahuen strain metacyclic forms. In this report, 50% to 60% of control animals and 100% of immunized animals survived (7). Recently, a metacyclic trypomastigote specific glycoprotein of 90 kD was found to be protective when injected in mice with alum. In this case all the control mice died whereas all the vaccinated animals survived (8). These two examples and our present observations were very far from each others, leading to an incapacity to evaluate the protective effect of one antigen compared with others. However, it could be assumed that, in any case, reduction of parasitemia during the acute phase could reduce the mortality associated with the first weeks of childhood Chagas' disease. Further investigations are needed to evaluate the protective effect of the TcGBP on the severity of the chronic phase.

The most striking observation in this work, is the clear difference of the protection levels induced by the TcGBP antigens, when used with FCA/FIA or BpAl. We have first examined the lytic capacity of the different antisera from mice immunized with the TcGBP mixed with one or the other tested adjuvants. Results obtained showed that only sera from mice immunized with TcGBP plus BpAl were able to kill a significant percentage of alive trypomastigotes in a complement mediated lysis assay, whereas sera from mice immunized with the same antigen mixed with CFA/IFA were inefficient to lyse trypomastigotes *in vitro*. These results may suggest that the antibody complement mediated lysis could be partially implicated in the immunoprotection mechanisms induced by the TcGBP in mice. This aspect could be related to observations reported by other investigators (7, 26, 27) who pointed out the relative importance of this mechanism in the induction of protective immunity in mice.

The TcGBP antibody response was also analysed in term of isotypic profiles. Only sera from mice immunized with TcGBP plus BpAl presented significant levels of specific IgG2a, IgG2b and IgE antibodies. Moreover, an enhancement of these isotype levels was observed following challenge infection. In contrast, specific IgG1 antibodies were detected either with CFA/IFA or BpAl, and only a weak increase of IgG1 level could be detected after challenge in the sera from protected mice. Interestingly the above observations were made using two doses of infective trypomastigotes.

Taken together, these observations suggested that TcGBP specific IgG2a, IgG2b, IgE, but not IgG1 antibodies might be involved in the protective immune response of TcGBP immunized mice. These results could be related to the observations of (28) who have demonstrated that in the mouse model, protective antibodies were mostly of IgG2 but not of IgG1 classes.

The presence of TcGBP specific IgE antibodies in sera from immunized and protected mice is not surprising since alum and *Bordetella pertussis* are known to generate this antibody subclass (21). It is now well established that IgE plays an important role in the antibody-dependant-cellular cytotoxicity mechanisms against *Schistosoma mansoni* schistosomula. The cytotoxicity is mediated by macrophages, eosinophils and platelets (29) In addition, a monoclonal antibody of IgE subclass directed against a 26 kD antigen

present in excretion-secretion products of schistosomes have been shown to protect rats against a *Schistosoma mansoni* cercariae challenge (30). Moreover the protective role of specific IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis have been established (31). *T. cruzi* specific IgE antibodies have been detected in the sera from acutely infected children (32). In addition, specific IgE antibodies against *T. cruzi* plasmatic exoantigens have been detected in sera of mice immunized with these antigens (33). However, nothing is known about the functional role of this antibody subclass in the context of Chagas'disease. Among all of the immune responses, anti-TcGBP specific IgE, but also IgG2a and IgG2b antibodies could participate in the induction of an immunoprotection by different mechanisms, including the antibody complemented mediated lysis, ADCC mechanisms (34) (35) or inhibition of host cell infection (36). *In vitro* tests and passive transfers with sera depleted in immunoglobulin subclasses will be needed to answer this question.

The cellular immune response directed against the TcGBP antigens could also participate in the induction of the observed protective immunity. It is generally assumed that alum is not efficient in stimulating cell mediated immunity (21). However, in previous studies, it has been shown that the use of an epimastigote flagellar fraction and *Bordetella pertussis* as adjuvant could induce a delayed-type hypersensitivity response to parasite antigens and concanavalin A (37). Further investigations will be needed to evaluate the respective contribution of these cellular effectors mechanisms in our model.

The two protection experiments were performed undoubtedly on a limited number of mice and complementary experiments are needed to better analyse the anti-TcGBP immune response. However, our results clearly pointed out firstly that TcGBP antigens were immunoprotective in mice during the acute phase, and secondly that this protective immune response is closely related to the nature of the adjuvant used.

To our knowledge, this is the first time that unglycosylated molecules have been shown to be partially protective against the acute phase of murine Chagas'disease. To identify the protective(s) molecule(s) among the three TcGBP, work is now in progress to clone these antigens in order to evaluate their respective potential protective properties.

References

1. **BRENER, Z.** 1987. Why vaccines do not work in Chagas'disease. *Parasitol. Today.* 2: 196
2. **BRENER, Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347
3. **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 developement. Procceding of a meeting organized by the W.H.O..* 442
4. **SCOTT, M. T. and D. SNARY.** 1979. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein form *Trypanosoma cruzi*. *Nature.* 282: 73
5. **SNARY, D.** 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 126
6. **ARAUJO, F. G. and B. MOREIN.** 1988. A 45 kDa antigen isolated from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against the organism. *Mem. Inst. O. Cruz.* 83: 138
7. **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
8. **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
9. **OUAISSI, M. A., A. TAIBI, J. CORNETTE, P. VELGE, B. MARTY, M. LOYENS, M. ESTEVA, F. S. RIZVI and A. CAPRON.** 1990. Characterisation of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma*

- cruzi* trypomastigotes and identification of a protective antigen. *Parasitology*. 100: 115
10. GRUPPI, A., F. PISTORESI-PALENCIA, F. CERBAN and E. VOTTERO-CIMA. 1991. *Trypanosoma cruzi* exoantigens: can those recognized by sera from chagasic patients trigger a protective immune response in mice? *Res. Immunol.* 142: 821
 11. FRASCH, A. C. C., J. J. CAZZULO, L. ASLUND and U. PETTERSSON. 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol. today*. 7: 148
 12. PLUMAS-MARTY, B., C. VERWAERDE, M. LOYENS, P. VELGE, A. TAIBI, M. F. CESBRON, A. CAPRON and A. OUAISSI. 1992. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas'disease. *Parasitology*. 104: 87
 13. OUAISSI, M. A., J. CORNETTE, D. AFCHAIN, A. CAPRON, H. GRAS-MASSE and A. TARTAR. 1986. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*. 234: 603
 14. CORNETTE, J., A. CAPRON and M. A. OUAISSI. 1988. *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol.* 86: 139
 15. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and J. R. RANDALL. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 649
 16. 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
 17. TAYLOR, J. B., A. VIDAL, G. TORPIER, D. J. MEYER, C. ROITSCH, J. M. BALLOUL, C. SOUTHAN, P. SONDERMEYER, S. PEMBLE, J. P. LECOCQ, A. CAPRON and B. KETTERER. 1988. The glutathione transferase activity and tissue distribution of *Schistosoma mansoni* *EMBO J.* 7: 465
 18. MITCHELL, G. 1989. Glutathione S-transferases: potential components of anti-schistosome vaccines? *Parasitol. today*. 5: 34

19. CAPRON, A., J. M. BALLOUL, D. GREZEL, J. M. GRZYCH, I. WOLOWCZUK, C. AURIAULT, D. BOULANGER, M. CAPRON and R. J. PIERCE. 1990. Progress towards vaccination against schistosomiasis. In *Molecular Aspects of Immune Response and Infectious Diseases*. (ed. Kiyono, H., Jirillo, E. & DeSimone, C.), New York: Raven Press Ltd.
20. SEXTON, J. L., A. R. MILNER, M. PANACCIO, J. WADDINGTON, G. WIJFFELS, D. CHANDLER, C. THOMPSON, L. WILSON, T. W. SPITHILL, G. F. MITCHELL and N. J. CAMPBELL. 1990. Glutathione S-transferase. A novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.* 145: 3905
21. BOMFORD, R. 1989. Adjuvants for anti-parasite vaccines *Parasitol. today.* 5: 41
22. EDELMAN, R. 1980. Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Diseases.* 2: 370
23. 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
24. NEAL, R. A. and P. JOHNSON. 1977. Immunization against *Trypanosoma cruzi* using killed antigens and with saponin as adjuvant. *Acta Tropica.* 34: 87
25. SNARY, D. and M. T. SCOTT. 1980. A cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi* capable of inducing protective immunity. In: *The Host Invader Interplay*, Van den Bossche, H; (Editor), Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 253
26. KRETTLI, A. U. and Z. BRENER. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009
27. 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
28. 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
29. CAPRON, A. and J. P. DESSAINT. 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. *Science.* 238: 1065
 30. VERWAERDE, C., M. JOSEPH, M. CAPRON, R. PIERCE, M. DAMONNEVILLE, F. VELGE, C. AURIAULT and A. CAPRON. 1987. Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138: 4441
 31. RIDEL, P. R., C. AURIAULT, F. DARCY, R. J. PIERCE, P. LEITE, F. SANTORO, J. L. NEYRINC, J. P. KUSNIERZ and A. CAPRON. 1988. Protective role of IgE in uncompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* 141: 978
 32. MARTIN, U. O., D. AFCHAIN, J. Y. CESBRON, E. ARIAS and A. CAPRON. 1986. Immunoglobulina E y enfermedad de Chagas. *Medicina.* 46: 262
 33. GRUPPI, A., M. C. PISTORESINI-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. DIAS SA SILVA. 1980. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependant cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46: 344
 35. KIPNIS, T. L., S. L. JAMES, A. SHER and J. R. DAVID. 1981. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependant killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 47
 36. 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
 37. 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

Table 1. Anti-isotype antibodies used

Antibody specificity	Species ^a	Source	Dilution
Anti-mouse IgG1 (γ 1 chain specific) peroxidase labeled	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	1/2.000
Anti-mouse IgG2a (γ 2a chain specific) peroxidase labeled	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	1/500
Anti-mouse IgG2b (γ 2b chain specific) peroxidase labeled	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	1/1000
Anti-mouse IgG3 (γ 3 chain specific) peroxidase labeled	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	1/500
Anti-mouse IgM (μ chain specific) peroxidase labeled	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	1/200
Anti-mouse IgE (ϵ chain specific)	Rat mAb	Biosys (Compiègne, France)	b

^amAb, monoclonal antibody.

^b See materials and methods section.

Table 2. Trypanolytic activity of sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl (mean value of % lysis).

Normal mouse sera (4)	$0 \pm 0 \%$
Sera from mice injected with BpAl alone (2)	$6 \pm 5 \%$
Sera from mice injected with CFA/IFA alone (2)	$0 \pm 0\%$
Sera from mice immunized with TcGBP in presence of CFA/IFA (5)	$0 \pm 0\%$
Chronic phase mouse sera (2)	$100 \pm 0\%$
Sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl (5)	$38 \pm 12 \%$

(*) is the number of mice sera tested in each group

Table 3. ELISA analysis of TcGBP specific antibody response (first experiment).

	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
Normal mouse serum	0.19	0.29	0.19	0.32	0.21

Sera from mouse injected with BpAl alone	0.19	0.35	0.17	0.36	0.34

Sera from mice injected with CFA/IFA alone	0.12	0.25	0.14	0.29	0.20
	0.09	0.24	0.14	0.31	0.16

Sera from mice immunized with TcGBP in presence of CFA/IFA	2.17	0.29	0.32	0.36	0.15
	2.11	0.41	0.87	0.40	0.17
	2.77	0.34	0.39	0.42	0.21
	2.18	0.34	0.40	0.28	0.17
	2.58	0.28	0.32	0.28	0.21

Sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl	2.67	1.14	1.88	0.47	0.30
	2.59	0.65	1.07	0.40	0.21
	2.78	0.98	0.79	0.45	0.24
	2.80	1.04	0.77	0.33	0.28
	2.84	1.64	1.67	0.47	0.42

Sera from surviving mice (15 days post infection)	2.92	2.29	2.31	0.77	0.57
	2.68	2.06	1.80	0.72	0.39
	2.82	2.11	2.31	0.98	0.47
	2.73	2.05	2.22	1.04	0.53

Table 4. RIA analysis of TcGBP specific IgE response (first experiment).

Normal mouse sera**	288*
	337

Sera from mice injected with CFA/IFA alone	300
	351

Serum from mouse injected with BpAI alone	618

Sera from mice immunized with TcGBP in presence of CFA/IFA	612
	540
	654

Sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAI	1375
	1854
	2769

Protected mice sera (40 days post infection)	5202
	5101

* cpm

** Immunisation sera were collected 5 days prior challenge.

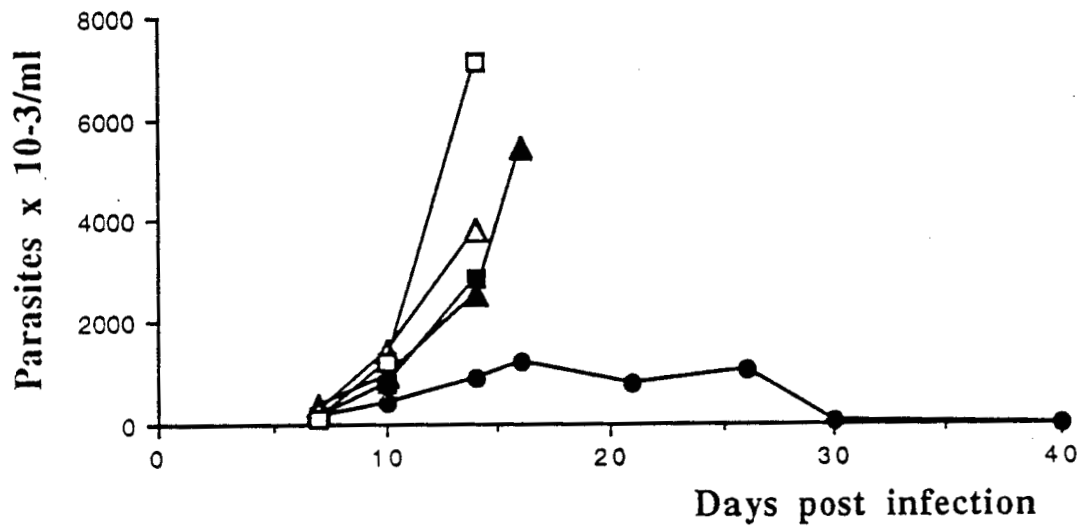


Figure 1a. Mean parasitemia of control group of non-immunized mice (▲); mice injected with CFA/IFA alone (△); mice immunized with TcGBP plus CFA/IFA (□); mice injected with BpAl alone (■); mice immunized with TcGBP plus BpAl (●) and challenged with $5 \cdot 10^3$ Y bloodstream trypomastigotes (five animals per group).

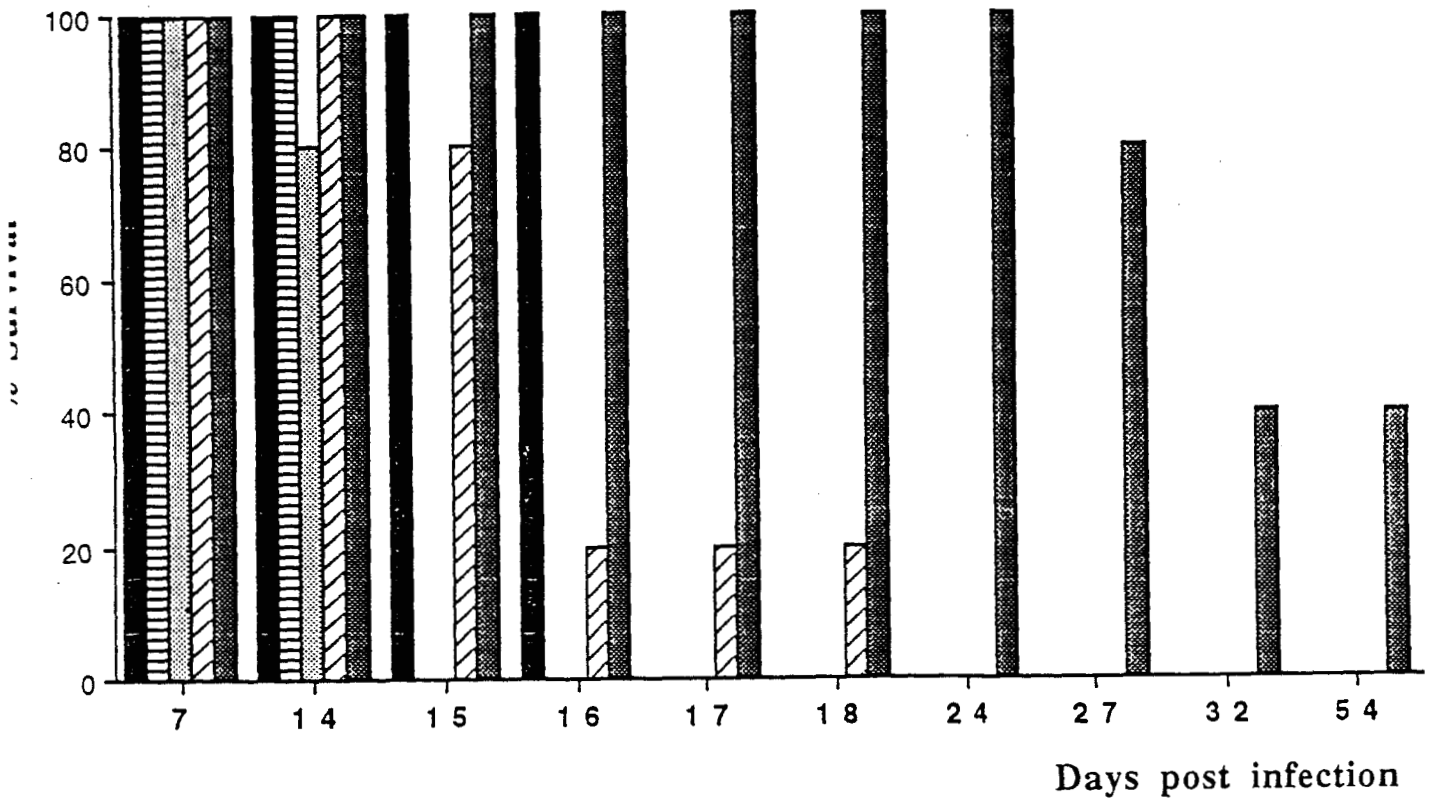


Figure 1b. Survival of control group of non-immunized mice (■); mice injected with FCA/FIA alone (▨); mice immunized with TcGBP plus FCA/FIA (▩); mice injected with BpAl alone (▧); mice immunized with TcGBP plus BpAl (▒) and challenged with $5 \cdot 10^3$ Y bloodstream trypomastigotes (five animals per group).

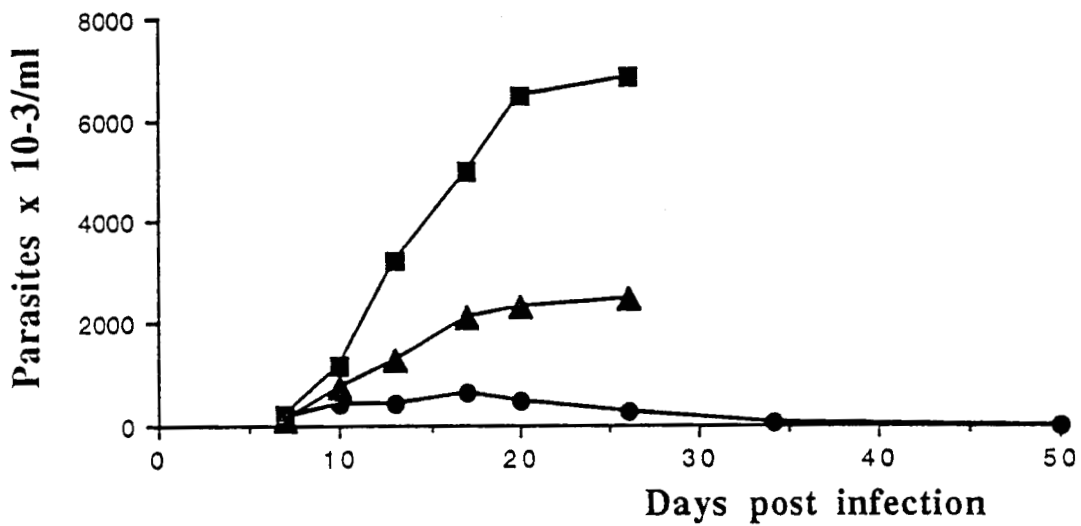


Figure 2a. Mean parasitemia of control group of non-immunized mice (n=10) (▲); mice injected with BpAl alone (n=9) (■); mice immunized with TcGBP plus BpAl (n=6) (●), and challenged by $2 \cdot 10^3$ Y bloodstream trypomastigotes.

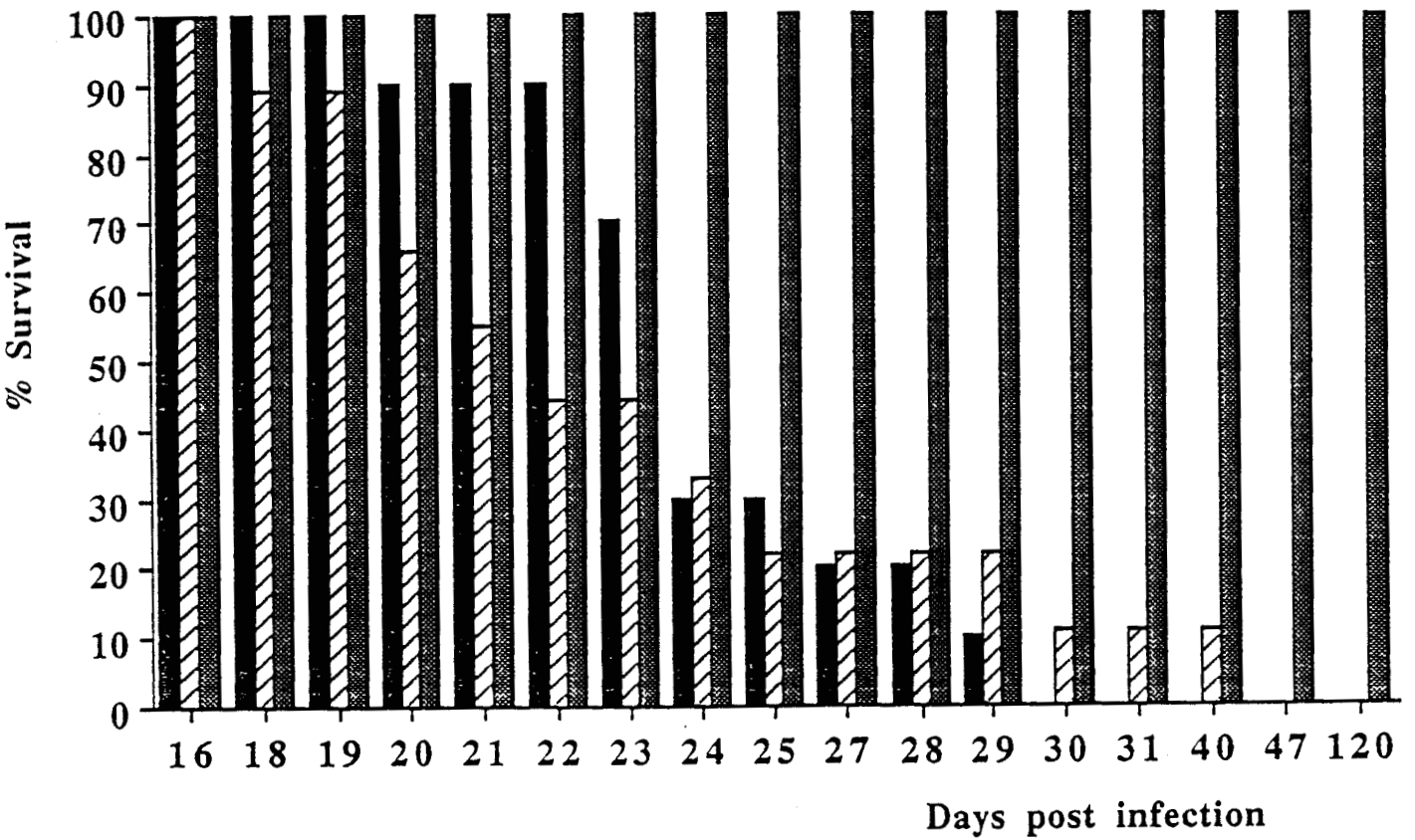


Figure 2b. % survival of control group and immunized mice challenged by 2.10^3 Y bloodstream trypomastigotes: non-immunized mice (n=10) (■); mice injected with BpAl alone (n=9) (▨); mice immunized with TcGBP plus BpAl (n=6) (▩).

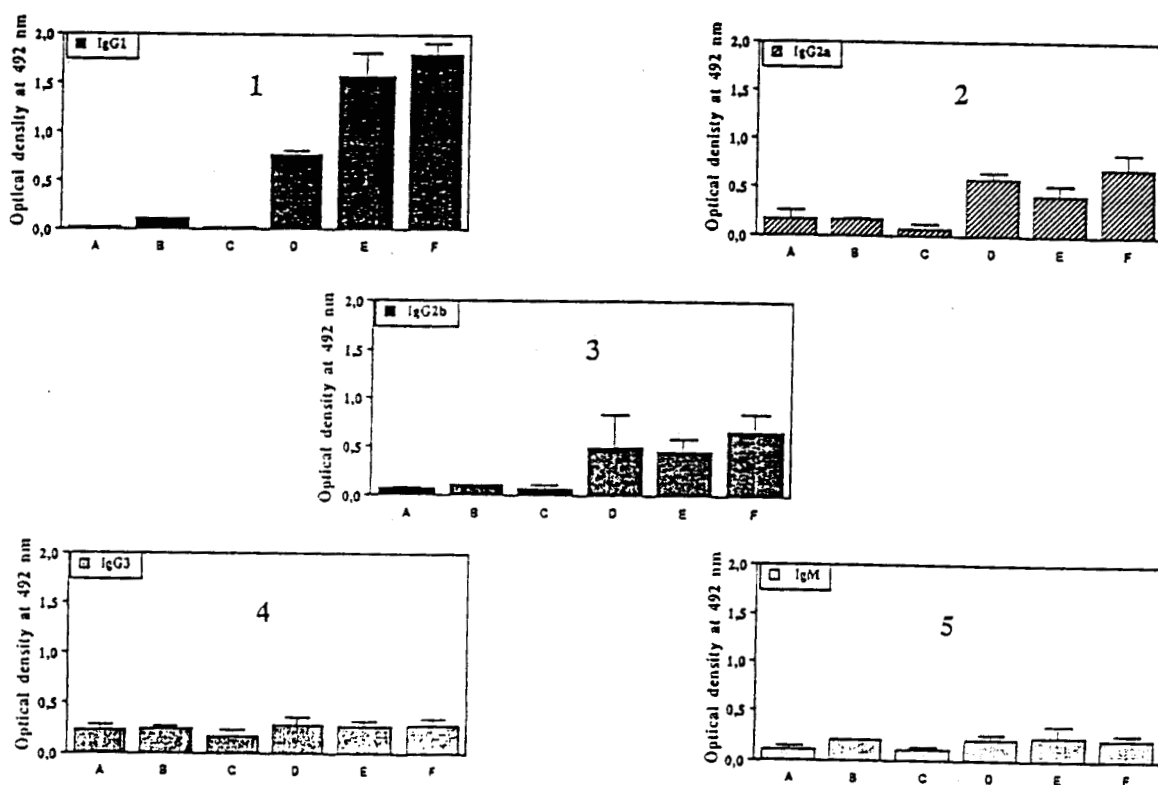


Figure 3. ELISA analysis (second protection experiment) of TcGBP specific IgG1 (a), IgG2a (b), IgG2b (c), IgG3 (d) and IgM (e) antibody response using normal mice sera (n=2) (A); sera of mice injected with BpAl alone (n=2) (B); acutely infected mice sera (n=2) (C); chronically infected mice sera (n=2) (D); sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl (n=6) (E); protected mice sera, 80 days post infection (n=6) (F).

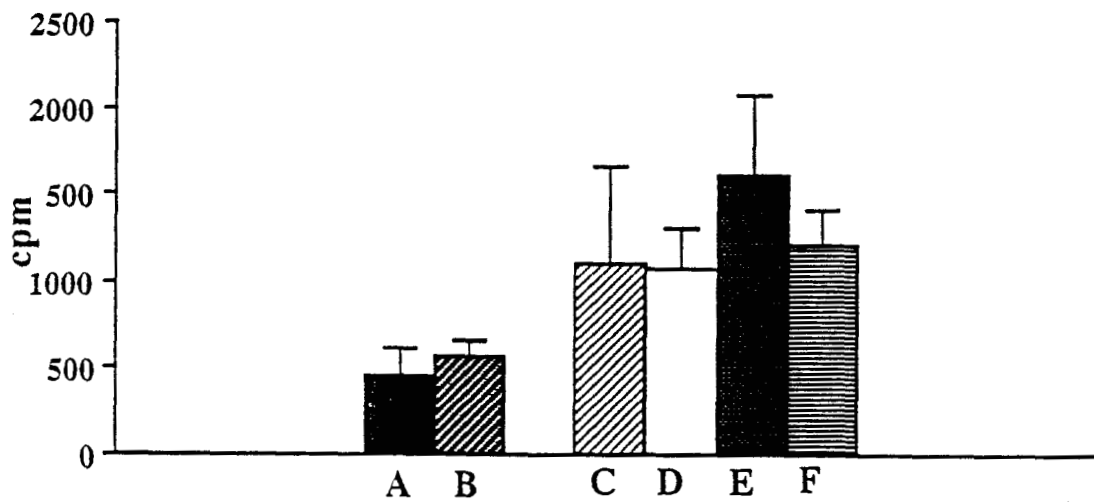


Figure 4. RIA analysis of TcGBP specific IgE antibody response of the second protection experiment, using sera from mice injected with BpAl alone (n=3) (A); acutely (n=2) and chronically (n=2) infected mice sera (B); sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl, 5 days before infection (n=3) (C); protected mice sera, 80 days post infection (n=3) (D); protected mice sera, 90 days post infection (n=3) (E); protected mice sera, 120 days post infection (n=3) (F).

Figures legend

Figure 1a. Mean parasitemia of control group of non-immunized mice (); mice injected with CFA/IFA alone (); mice immunized with TcGBP plus CFA/IFA (); mice injected with BpAl alone (); mice immunized with TcGBP plus BpAl () and challenged with 5.10^3 Y bloodstream trypomastigotes (five animals per group).

Figure 1b. Survival of control group of non-immunized mice (); mice injected with FCA/FIA alone (); mice immunized with TcGBP plus FCA/FIA (); mice injected with BpAl alone (); mice immunized with TcGBP plus BpAl () and challenged with 5.10^3 Y bloodstream trypomastigotes (five animals per group).

Figure 2a. Mean parasitemia of control group of non-immunized mice (n=10) (); mice injected with BpAl alone (n=9) (); mice immunized with TcGBP plus BpAl (n=6) (), and challenged by 2.10^3 Y bloodstream trypomastigotes.

Figure 2b. % survival of control group and immunized mice challenged by 2.10^3 Y bloodstream trypomastigotes: non-immunized mice (n=10) (); mice injected with BpAl alone (n=9) (); mice immunized with TcGBP plus BpAl (n=6) ().

Figure 3. ELISA analysis (second protection experiment) of TcGBP specific IgG1 (a), IgG2a (b), IgG2b (c), IgG3 (d) and IgM (e) antibody response using normal mice sera (n=2) (A); sera of mice injected with BpAl alone (n=2) (B); acutely infected mice sera (n=2) (C); chronically infected mice sera (n=2) (D); sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl (n=6) (E); protected mice sera ,80 days post infection (n=6) (F).

Figure 4. RIA analysis of TcGBP specific IgE antibody response of the second protection experiment, using sera from mice injected with BpAl alone (n=3) (A); acutely (n=2) and chronically (n=2) infected mice sera (B); sera from mice immunized with TcGBP in presence of BpAl ,5 days before infection (n=3) (C);

protected mice sera, 80 days post infection (n=3) (D); protected mice sera, 90 days post infection (n=3) (E); protected mice sera, 120 days post infection (n=3) (F).

The authors would thank Dr. C. Dissous and Dr. R.J. Pierce for helpful comments about this work. This work was supported by INSERM U167-CNRS 624, the European Economic Community and the Mérieux Foundation.

Article 3

ARTICLE 3

Clonage moléculaire et expression des molécules de Trypanosoma cruzi de 30 et de 25 kDa, homologues à des facteurs d'élongation de type 1 bêta.

Au départ de ce travail, nous disposions d'un sérum de souris reconnaissant trois molécules de *Trypanosoma cruzi* fixant le glutathion, et ayant un poids moléculaire de 25, 30 et 45 kDa. Nous avons montré que ces protéines n'étaient vraisemblablement pas glycosylées. Les taux de protection obtenus chez la souris avec les trois protéines natives nous ont conduit à envisager le clonage moléculaire de ces antigènes.

Les résultats présentés dans cet article peuvent se résumer ainsi:

1) Deux différents clones **TcGBP-O** et **TcGBP-B** ont été obtenus en criblant une banque phagique par un sérum dirigé contre les antigènes TcGBP. Les tailles de leurs inserts sont de respectivement 1100 et 900 paires de bases. Le séquençage de ces deux clones a révélé qu'ils présentaient une forte homologie tant au niveau des acides nucléiques qu'au niveau des acides aminés. Les clones O et B codent respectivement pour des polypeptides de poids théorique 24,4 et 23,8 kDa.

2) Des études en **Southern-Blot** ont montré que ces deux ADNc étaient codés par une même famille de gènes.

3) Des études en **Northern-Blot**, nous ont permis d'identifier la taille des ARNm correspondant aux deux ADNc. Le clone O est transcrit par un messenger de 1,2 kb alors que le clone B est lui transcrit par un messenger de 1,4 kb.

4) Les deux ADNc ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pGEX-2T. L'obtention d'anticorps anti-protéine de fusion ainsi que d'anticorps anti-peptide nous ont permis de démontrer que le **clone B** correspondait à la molécule de **30 kDa**, alors que le **O** correspondait à celle de **25 kDa**.

5) Les interrogations de banques de données ont révélé que les deux séquences obtenues ne présentaient pas d'homologie avec d'autres GSTs déjà clonées, mais étaient significativement homologues avec plusieurs facteurs d'élongation de type 1 β , principalement dans leurs régions C-terminales.

Les principaux messages sont donc les suivants:

A) Deux des molécules présentes dans les antigènes TcGBP pourraient être des facteurs d'élongation potentiellement impliqués dans la synthèse des protéines du parasite *Trypanosoma cruzi*.

B) D'autre part, aux vues des observations réalisées, il devient nécessaire de focaliser notre stratégie vaccinale sur les parties N-terminales de ces molécules et de cloner le composant de 45 kDa.

MOLECULAR CLONING OF *TRYPANOSOMA CRUZI* PROTEINS
OF 30 AND 25 kDa HOMOLOGOUS TO ELONGATION FACTORS 1 β .

RUNNING TITLE: Molecular cloning of *T. cruzi* proteins of 25 and 30 kDa.

By

Béatrice Plumas-Marty, Ralf Schöneck, Ali Taibi, Joël Plumas, Claudie Verwaerde,
Marc Loyens, Valérie Pommier, Hélène Gras-Masse*, Eric Diesis*, André Tartar*,
André Capron and Ali Ouaiissi.

*From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire,
Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, LILLE (France); * from the
Service des Biomolécules, CNRS. URA 1309, Institut Pasteur, LILLE (France).*

Address correspondence and reprint request to:

Béatrice PLUMAS-MARTY, C.I.B.P., Institut Pasteur, 1, rue du Pr. Calmette,
B.P. 245, 59019 LILLE (France)

Abbreviations used in this paper: BpAl: *Bordetella pertussis* plus alum; EF: elongation factor; GST: glutathione S-transferase; Sj26: *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase of 26 kDa; Sm28: *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase of 28 kDa; *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*; TcGBP: *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins; Tg30: *Toxoplasma gondii* protein of 30 kDa.

Summary

In previous studies, we reported the characterization of three *T. cruzi* proteins (TcGBP), all three of which both bind glutathione and are immunoprotective in the murine model of Chagas disease. In order to clone these proteins, we screened an expression library using antisera directed against TcGBP antigens. Two different cDNA clones were identified. The two clones, TcGBP-O and -B were highly homologous in both their nucleic acid and amino acid sequences. Searches of sequence data banks allow to show that TcGBP-O and -B were 40% homologous with elongation factors β . Both cloned proteins were expressed by trypomastigotes and each was translated by a different length mRNA. Hybridization of the clones with genomic DNA revealed that the two cDNAs were not encoded by a multigenic family. Antisera directed against the cloned proteins and synthetic peptides corresponding to regions in these proteins demonstrated directly that TcGBP-O and -B recombinant proteins corresponded respectively to the 30 and 25 kDa TcGBP antigens.

1. Introduction

American trypanosomiasis (Chagas'disease), due to the infection with the protozoan parasite *T. cruzi*, is estimated to affect 20 million people in Central and South America (1). *T. cruzi* has a complex life cycle that includes different stages in the insect vector and in the vertebrate host (2). Epimastigotes and metacyclic trypomastigotes are the two parasite stages in the vector, whereas the vertebrate forms are bloodstream trypomastigotes and amastigotes. Currently, chemotherapy and vector eradication are used to control the spread of the disease (3). However these control methods have limited effectiveness and research has therefore been focused on the establishment of a rational strategy aimed at finding an effective vaccine against Chagas'disease.

Since *Trypanosoma cruzi* is suspected to induce immunosuppression and auto-immune processes, obtaining purified antigens is necessary in order to test an eventual vaccine (4). Several biochemical and immunological studies have been developed, using the murine model in order to characterize parasite components which could be used as protective immunogens. It has been shown that immunity against an infective form challenge can be induced using partially purified antigenic preparations (5, 6) or various surface glycoproteins (7, 8). In all cases, no attempt has been made to define the contribution of the peptidic moieties of these antigens in the induction of the observed immunoprotection. Moreover, despite the fact that some *Trypanosoma cruzi* antigens have been already cloned and at last partially sequenced (9), protective properties of these molecules are still unknown.

We have isolated a new class of target antigens, which may be essential for the parasite survival in its host. In a previous report, three molecules of 45, 30 and 26 kDa were characterized from *T. cruzi* epimastigotes. These proteins, named TcGBP, are immunogenic during natural and experimental Chagas' disease. TcGBP antigens are expressed in all developmental stages of the parasite and are not glycosylated (10). In addition, we have recently shown that TcGBP mixed with *Bordetella pertussis* and

alum are able to protect mice from a lethal *T. cruzi* infection challenge in terms of parasitemia and survival (11).

In the present study, we report the molecular cloning, the sequencing, and the expression of two cDNA clones recognized by antisera directed against native TcGBP antigens. We show that these two cDNAs share common amino acid sequences and are closely related at the genomic level. Both sequences are 40% homologous with several elongation factors β (12, 13). Using antibody probes against the common and specific domains of the two cloned polypeptides, we demonstrate that they correspond to the 25 and 30 kDa TcGBP antigens. We discuss about the possible function of these antigens in the context of Chagas' disease.

2. Materials and methods

2.1 Parasites

T. cruzi Y strain was used throughout this study. Trypomastigotes were maintained in tissue culture by weekly infection of 3T3 fibroblasts as described elsewhere (14). Extracellular amastigotes were obtained according to the procedure previously described (15). Epimastigotes were cultured in Glucose Lactalbumin Serum Haemoglobin as reported elsewhere (16).

2.2 Antigens

Epimastigote lysate was prepared as described (10). *Toxoplasma gondii* tachyzoites lysate and recombinant *Schistosoma mansoni* 28 GST (Sm28) were obtained respectively from L. Lecordier and F. Trottein (Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Lille, France).

pGEX-2T fusion proteins were prepared as described (17). *Schistosoma japonicum* 26 kDa GST (Sj26) alone, and a fusion protein of 53 kDa corresponding to a 30 kDa native protein of *Toxoplasma gondii* (Tg30) served as control proteins.

2.3 Synthetic peptides

Peptides, underlined in Fig.2, were synthesized by solid-phase on a paramethyl-benzhydrylamine resin (Applied biosystems, Foster City, USA) and protected as follows: Asp (cyclohexyl), Glu (cyclohexyl), Lys (2-chloro-benzyloxycarbonyl), Ser (benzyl), Thr (benzyl), Trp (formyl). After cleavage, purification, and lyophilisation, crude peptides were checked for homogeneity by reversed-phase high-performance liquid chromatography and for identity by amino acid analysis after total acid hydrolysis and mass spectroscopy. They were then conjugated to ovalbumin with glutaraldehyde. Sm28 C-term: GNLLASSPRLAKYLSNRPATPF, corresponding to the C terminal region (190-211) of the *Schistosoma mansoni* P28 GST (18) and coupled to ovalbumin, was also used as a control.

2.4 Antisera

Mouse antisera directed against native TcGBP antigens were obtained as previously described (10).

Four week old male BALB/c mice were inoculated intraperitoneally three times with 40µg of fusion protein (except mice immunized with the Sj26GST which have received doses of 20µg) at 15-day intervals, in the presence of 30µl of *Bordetella pertussis* plus alum (BpAl) [Vaxicoq, Institut Mérieux, France: 4 U.I. of *Bordetella pertussis* and 1.25 mg of aluminium hydroxide]. Control sera were obtained from mice injected with BpAl alone. The animals were bled one week after the last immunization.

Mouse antisera directed against a 30kDa of *Toxoplasma gondii* and against Sm26 GST of *Schistosoma mansoni* were a gift respectively from L. Lecordier (unpublished data) and F. Trottein (19).

T. cruzi (underlined in Fig. 2) and *Schistosoma mansoni* synthetic peptides coupled to ovalbumin were injected intraperitoneally to four weeks old male BALB/c mice. Each dose consisted of 20µg of peptide and 30µl of BpAl per mouse. Mice received three doses at 10-days intervals and were bled after the last injection. Control sera were obtained from mice which have received ovalbumin plus BpAl or BpAl alone.

2.5 Immunoblotting analysis

Proteins were reduced, electrophoresed by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose (20). After incubation with various antisera diluted 1/100, reactive antigens were detected with specific peroxidase-labeled sheep anti-mouse IgG (Diagnostic Pasteur, Marnes la-Coquette, France).

2.6 RNA and DNA

Total RNA from different developmental stages of *T. cruzi* were purified from guanidium-lysed parasites by centrifugation through cesium chloride cushion (21). DNA was extracted from epimastigotes using standard technics (22).

2.7 cDNA library

Poly (A⁺) RNA was purified from epimastigote total RNA by affinity chromatography over an oligo (dT) 12-18 cellulose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and was then used as template for synthesizing cDNA. They were inserted into the EcoRI and XhoI restriction sites of the λ ZAPII vector and packaged *in vitro* using the Gigapack Gold Kit (Stratagene, San Diego CA). The library titer was of 10⁶ pfu before amplification. Immunoscreening was performed using a mouse anti-TcGBP serum diluted 1/250 in 20 mM Tris-HCl, pH7.5/150 mM NaCl containing 5% of non-fat milk.

2.8 Sequencing

Clones were excised *in vivo* into pBLUESCRIPT SK⁻ by using the helper phage VSM13. After EcoRI and XhoI digestion, the inserts sizes were estimated and the single non coding strand of these clones were produced *in vivo* according to the manufacturer (Stratagene, San Diego MA). Nucleotide sequences were determined by the chain termination method of Sanger (23) using the multiwell microtiter plate DNA sequencing system-T7 DNA polymerase (Amersham, UK). Commercially available or synthesized primers were used. Sequence analysis were performed using programs purchased from DNASTar (Madison, WI, USA).

2.9 RNA and DNA blot analysis

RNA was electrophoresed in 1% agarose gels containing formaldehyde (22). Gels were then blotted overnight onto nylon membranes (Hybond-N, Amersham, UK) in 10 x SSC (1 x SSC is 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate).

DNA was digested by restriction enzymes and the resulting fragments were separated by electrophoresis, denaturated and transferred onto nylon membranes (Hybond-N, Amersham, UK) overnight in 20 x SSC.

Blots were prehybridized in 50% formamide; 5 x SSC; 50 mM sodium phosphate, pH 6.8; 5 x Denhardt's (50 x Denhardt's is 1% Ficoll 400/1% polyvinylpyrrolidone/1% BSA), and 0.2% SDS plus 0.1 mg/ml denaturated salmon sperm DNA at 42°C for 3h, and hybridized overnight in the same solution containing

10^6 cpm/ml cDNA or oligonucleotide probes. After several washes at 42°C and 55°C in 0.1 x SSC; 0.1% SDS, membranes were exposed to Hyperfilms MP (Amersham, UK).

2.10 DNA probes and sequencing primers

cDNA probes were labeled by nick-translation with α ^{32}P dCTP at a specific activity $> 10^8$ cpm/ μg . Synthetic oligonucleotides were synthesized in a Cyclone Plus DNA Synthesizer (Millipore, MA). After purification, some of them were used as primers for sequencing (not shown) whereas others were radiolabeled using γ ^{32}P ATP and polynucleotide kinase, then separated from free nucleotides on Sep Pak cartridges (Millipore Corporation, Milford, MA).

2. 11 Subcloning in pGEX-2T

pBLUESCRIPT clones were digested by SmaI and KpnI. After removing the protruding 3' termini using the T4 DNA polymerase (22), inserts were purified from agarose gels using the freeze-squeeze method (24) then ligated into the SmaI site of the pGEX-2T vector (Pharmacia, Uppsala Sweden). After transformation, selection was performed on appropriate selective media plates. Positive clones were then screened for expression of fusion proteins as described (17). A control clone coding for a 25 kDa protein corresponding to a 30 kDa molecule of *Toxoplasma gondii* was used as a control.

3 Results

3.1 Identification of two cDNA clones recognized by anti-TcGBP sera.

A λ ZAPII cDNA library was constructed from epimastigote mRNA and screened after amplification with a mouse anti-TcGBP serum, reacting with three unglycosylated proteins of 45, 30 and 25 kD, expressed by all developmental stages of *T. cruzi* (10). Ten clones were obtained containing inserts of approximately 1100 bp for one of them, and approximately 900 bp for the others (not shown). Partial sequencing of the 5' ends of these clones revealed that the shorter clones of 900 bp (TcGBP-B) shared exactly the same sequences, whereas the sequence of the 1100 bp clone (TcGBP-O) was different. The complete sequences of the two different clones indicated that TcGBP-B and TcGBP-O were 75.7% homologous at the nucleic acid level (Fig.1). Both ended with a poly (A) tail, and possible polyadenylation signals are underlined in Fig. 1. TcGBP-O and -B had respectively, 500 and 262 bp 3' untranslated regions; TcGBP-B had 27 bp 5'untranslated region. Nevertheless, they were incomplete at their 5'ends since they lacked the splice leader sequence (25). Analysis of the amino acid sequence showed that the clones were 89.5% homologous over 143 amino acid overlap. N-terminal regions were different whereas C-terminal regions were strongly homologous (fig.2). TcGBP-B and -O encoded, respectively 22.8 and a 24.4 kD polypeptides and the TcGBP-O sequence contained two octapeptides ASAPAKQA (position 77-84 and 89-97) separated by 4 amino acids. Comparison of the two sequences with amino acid sequences in several data banks revealed for both sequences, about 40% homology with human and *Artemia salina* elongation factors β , mainly localized at the C-terminal domains of the proteins (Fig. 3) (12 , 13). The boxed sequence corresponds to the phosphorylation target motif, present in factor β from *Artemia salina*: DFLSDEEDEE (26).

3.2 Southern-blot studies using TcGBP-O and -B cDNA probes.

Epimastigote genomic DNA was digested with BamH1 or EcoR1 restriction enzymes.

Restriction sites for these enzymes were not present in either of the two clones. The resulting fragments were then hybridized with labeled cDNA of each clone. TcGBP-B cDNA hybridized to one band of EcoR1 digested DNA (Fig. 3-2B), and with two major and one minor band of BamH1 digested DNA (Fig.3-2A). Similarly, all these bands were apparently recognized by the TcGBP-O cDNA probe together with an additional Eco R1 fragment (Fig.3-1A and 1.B).

3.3 Transcription of TcGBP-O and -B clones.

Northern Blot experiments were performed to identify the transcripts of the two obtained clones. Labeled cDNA corresponding to the TcGBP-O clone hybridized with two messenger RNAs of about 1.4 and 1.2 kb, present in both trypomastigotes (Fig.4-A) and epimastigotes (Fig.4-B). Labeled cDNA corresponding to the TcGBP-B clone hybridized primarily with a transcript of 1.4 kb also found in these two developmental stages (Fig.4-D and E). In order to define more clearly the size of the transcripts corresponding to each of the cDNA clones, oligonucleotide probes corresponding to specific sequences of the TcGBP-O and -B clones (boxed in Fig.1) were then used. Results showed that the oligonucleotide probes, specific for the TcGBP-O or the TcGBP-B sequences hybridized respectively with the unique mRNA of 1.2 kb (Fig.4-C) and 1.4 kb (Fig.4-F).

3.4 Expression of TcGBP-O and -B fusion proteins.

TcGBP clones did not share any significant homology with *Schistosoma japonicum* GST (Sj26 GST) and the β -galactosidase fusion proteins from the pBLUESCRIPT TcGBP-O and-B cDNA clones poorly bound to a glutathione-matrix when compared with Sj26 GST (not shown). This allowed us to use the pGEX-2T vector system. for protein expression and purification. pBLUESCRIPT TcGBP clones were thus

subcloned into the SmaI site of the pGEX-2T vector. A control pGEX-2T clone coding for a 25 kD polypeptide corresponding to Tg30, a 30 kD molecule of *Toxoplasma gondii* was also used. Sj26 GST alone, and the Sj26 GST fusion proteins corresponding to the TcGBO-O, TcGBP-B, and Tg30 polypeptides were

expressed and purified on glutathione-agarose beads. As shown in Fig.5, the apparent molecular weights of both TcGBP-O and -B fusion proteins were respectively, 52 and 51 kDa (Fig.5-A and B), the size of the Tg30 fusion protein was 55 kDa (Fig.5-E), and the size of SJ26 GST expressed in pGEX-2T was 28 kDa (17) (Fig.5-C). No apparent degradation products were observed except for the Tg30 fusion protein. Neither a mouse serum anti-30 kDa of *Toxoplasma gondii*, nor a mouse anti-TcGBP serum presented cross-reactivity with Sj26, whereas a serum from mice immunized with *Schistosoma mansoni* 26 kDa GST strongly recognized this antigen (not shown). TcGBP-B, and -O fusion proteins were recognized by a mouse anti-Sj26 antiserum (Fig. 6, 1B and 2B) and by a mouse anti-native TcGBP antiserum (Fig.6, 1D and 2D). In the same way, Tg30 was only seen using a serum of mice immunized with Sm26 GST and by a mouse serum directed against a 30 kDa of *Toxoplasma gondii* (not shown).

3.5 Recognition of native TcGBP antigens by anti-fusion proteins and anti-peptide sera.

Mouse antisera against the TcGBP-O and -B proteins were prepared by immunization of mice with the purified fusion proteins or synthetic peptides derived from the primary sequences of the TcGBP clones. The reactivity of these different sera were analysed by protein blotting.

When a lysate of *T. cruzi* epimastigotes was used as antigens, anti-TcGBP-O or -B fusion protein sera reacted with two polypeptides of 30 and 25 kD (Fig. 7, lanes C and D), whereas a serum directed against the native TcGBP recognized the 30 and 25 kD components and an additional polypeptide of 45 kDa (Fig.7, lane B). Antibodies directed against a synthetic peptide common to both clones sequences, again

recognized two proteins of 30 and 25 kDa (Fig.7, lane E). In contrast, antibodies directed against a synthetic peptide specific for the TcGBP-O sequence only revealed the 25 kDa molecule (Fig.7, lane F). No cross-reactivity to epimastigote antigen was obtained with any of the control sera (Fig.7, lanes A, G, H, I, J, K) including antisera directed against the Tg30 fusion protein or against a synthetic peptide derived from the

Sm28 sequence, previously tested against the corresponding antigens (not shown).

4 Discussion

In the first part of the present work, an epimastigote cDNA library was screened using mouse antisera directed against 45, 30, and 25 kD TcGBP antigens (10). We selected two different recombinant clones TcGBP-O and -B of, respectively, 895 and 1113 bp. Both clones shared potential stop codons and ended by several A and T rich regions (specially in the case of the TcGBP -B clone) and by a poly (A) tail. Until now, the eukaryotic consensus sequence for polyadenylation has not been found in characterized genes from *Kinetoplastida* organisms (27). In our case, we found downstream the stop codons, an AATAA motif in the TcGBP-B sequence, and an AATAAA motif in the TcGBP-O sequence. In addition, another cDNA clone encoding a *T. cruzi* antigen, also presenting an AATAA motif upstream the poly (A) tail was recently identified (SCHÖNECK, R. *et al.*, manuscript in preparation). It could be thus speculated that these sequences could have a role in the polyadenylation of *T. cruzi* mRNA. The two clones appeared to be incomplete at their 5' ends since they lacked the splice leader sequence, found in all mature *T. cruzi* mRNAs. (25). The predicted molecular weight of the encoded polypeptides were, respectively, 22.8 and 24.4 kD for TcGBP-B and -O, whereas the smallest native protein recognized by anti-TcGBP antibodies has an apparent molecular weight of 25 kD. This indicates that at least one coding sequence was incomplete.

Sequence analysis revealed that both clones were strongly homologous in their nucleic acid sequences. Differences between them were consistent with distinct regions at the 5' ends and at the 3' non coding regions. Southern-blot experiments using cDNA corresponding to the TcGBP-O and -B clones indicated that these proteins were encoded by a low number of closely related genes. The variable signal intensities could reflect polymorphisms of the gene (s) among Y strain parasites, as it is supposed for the *T. cruzi* kinetoplast associated protein (27) The possibility that the two proteins arose by gene duplication and diversified by mutation as it has been suggested for the 85 kD family (28), will have to be explored. Northern-blot studies clearly showed that these two TcGBP antigens were expressed by *T. cruzi* infective forms, confirming our previous data obtained using immunological probes (10). The

fact that TcGBP-O and -B contained specific sequences allowed us to synthesize oligonucleotide probes corresponding to these regions. Results obtained using these probes clearly demonstrated that TcGBP-O and -B were respectively transcribed by a 1.2 kb mRNA and by a 1.4 kb mRNA.

Sequence analysis at the amino acid level revealed that N-terminal regions of both sequences were different whereas C-terminal regions were almost identical. Due to this strong homology, antisera directed against the two fusion proteins reacted with TcGBP 25 kD and TcGBP 30 kD (as well as antisera directed against a peptide common to both sequences). In contrast, antisera directed against a specific peptide only present in the TcGBP-O sequence, reacted with the TcGBP 25 kD but not with the TcGBP 30 kD. This provided a direct demonstration that TcGBP-O corresponded to the 25 kD TcGBP, whereas TcGBP-B corresponded to the 30 kD molecule. Consequently, the ATGs in the 5' region of the TcGBP-B clone were not used as start codons. In contrast, we could conclude that the ATG at position 27 in TcGBP-O should be used as start codon, since this clone corresponded to the 25 kD molecule. Only TcGBP-O clone contained a repeated sequence: an octapeptide ASAPAKQA was twice repeated in position 74-84 and 89-97. This could be related to the fact that repeated sequences are frequently found in *T. cruzi* antigens (9). The sequence analysis suggested that TcGBP-O and -B polypeptides were not integral membrane proteins and no signal sequence was apparent. The TcGBP-O sequence contained one potential N-glycosylation site (amino acid position 44) but this observation does not imply that TcGBP-O antigen is effectively glycosylated. Indeed, the fact that anti-TcGBP antisera recognizes *in vitro* translation products at the same molecular weight as the native purified polypeptides subunits (45, 30 and 25 kD) strongly suggest an absence of glycosylation (10).

Comparison of the two sequences with other recently available nucleotide or amino acids sequences corresponding to proteins related to the glutathione (or trypanothione) cycle including GSTs did not reveal any significant homology. However, consultation of entire data banks showed that both sequences shared an homology of about 40% with several elongation factors 1 β .

These factors are involved in protein synthesis (12, 13). Indeed, EF1, a major complex present in eukaryotic cells, exists as a heterodimer consisting of subunits α , β and γ . EF1 α mediates the GTP-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the ribosome. EF1 β γ is composed of two subunits and catalyses the exchange of GDP bound to EF1 α for GTP via a ternary EF1 α -EF1 β nucleotide complex (29). EF1 β has been shown to support the exchange activity whereas the function of EF1 γ is unclear. cDNAs corresponding to EF1 β from human (HEF1 β) and from *Artemia salina* (AsEF1 β) have been fully sequenced (12, 13) and limited sequence information is available in the case of *Xenopus laevis* (30). The molecular weight of these elongation factors is about 30 kD. AsEF1 β and HEF1 β are 65% homologous (13). In addition, the homology between C-terminal regions of these sequences is greater than that obtained by comparison of total sequences. In our case, the C-terminal regions of TcGBP-O and -B, almost identical for both sequences, were homologous with the C-terminal domain from HEF1 β and AsEF1 β whereas the N-terminal regions of these four proteins were non homologous (approximately 20% homology on the overall sequences). Recent studies which demonstrated that the catalytic domain of AsEF1 β resides in the C-terminal domain of the molecule (26). These regions are therefore expected to be more conserved. Phosphorylation of AsEF1 β by an endogenous kinase (supposed to be EF1 γ) affects its catalytic activity. The target for phosphorylation is residue serine 89 located in the DFLS₈₉DEEDEE motif containing a critical sequence for casein kinase II type substrate recognition (31). The corresponding region of TcGBP-O and -B shared homology with this motif, but no serine was found in this region. However, in the case of EF1 β from wheat embryos, a threonine is supposed to be phosphorylated. The two residues threonine in position 91; 95 for TcGBP-B and 109; 113 for TcGBP-O, should be candidates for such phosphorylation. Southern analysis indicates that EF1 β in the human genome appears to be specified by more than one gene (13). Moreover, equivalent of plant EF1 is composed of four subunits including two subunits β and β' (32). This could explain that we have identified two EF1 β -like molecules appearing to be closely related at the *T. cruzi* genomic level. TcGBP antigens of 45, 30 and 25 kD, were purified from epimastigote lysate using affinity chromatography over an agarose-glutathione column and characterized by

SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions. (10).

In the present work, we have obtained and expressed two sequences corresponding to the 30 and 25 kD molecules, which are expected to be elongation factors implicated in the elongation step of the protein synthesis. The fact that putative elongation factors bound to a glutathione matrix is not yet understood and need to be further investigate. To explain these results, one can also speculate that the 30 and 25 kD were co-eluted with the 45 kD compound, which could be the true glutathione-binding protein in the complex. Therefore, library screening using specific oligonucleotidic probes should allow us to obtain full length copies of these cDNAs and further screening with antibodies directed against native TcGBP molecules should be useful in order to clone the 45 kD antigen. Work will be needed to demonstrate that TcGBP-O and -B antigens are effectively implicated in protein synthesis and to identify the functional properties of the 45 kD molecule. Due to the encouraging data obtained concerning the protective properties of the native TcGBP proteins in the murine model (11) and to their putative function, we speculate that these antigens will assume a major role in the parasite biology. If two of the TcGBP molecules are elongation factors, it could be expected that immune response directed against these molecules strongly affect the parasite survival in its vertebrate host. Further researchs will need to be focused on the N-terminal domains of the two cloned proteins rather than on the C-terminal domain which apperas to be more conserved. In conclusion, the use of synthetic peptides or defined polypeptides domains in immunoprotection experiments against murine *T. cruzi* infection and to study the catalytic activity of these molecules in the course of *T. cruzi* protein synthesis.

References

1. SCHOFIELD, C. J. 1985. Control of Chagas'disease vectors. *Br. Med. Bull.* 41: 187
2. BRENER, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 27: 347
3. DIAS, J. C. P. 1987. Control of Chagas disease in Brazil. *Parasitol. Today.* 3: 335
4. 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 developement. Procceding of a meeting organized by the W.H.O..* 442
5. 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
6. 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
7. SCOTT, M. T. and D. SNARY. 1979. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein form *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. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 126
9. FRASCH, A. C. C., J. J. CAZZULO, L. ASLUND and U. PETTERSSON. 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi*

antigens. *Parasitol. today*. 7: 148

10. PLUMAS-MARTY, B., C. VERWAERDE, M. LOYENS, P. VELGE, A. TAIBI, M. F. CESBRON, A. CAPRON and A. OUAISSI. 1992. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins: immunogenicity during human and experimental Chagas'disease. *Parasitology*. 104: 87
11. PLUMAS-MARTY, B., A. TAIBI, H. PESSOA, C. VERWAERDE, M. LOYENS, V. POMMIER, P. VELGE, A. OUAISSI and A. CAPRON. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP): protection induced by native proteins in an experimental model and analysis of the antibody response. *Manuscript submitted*.
12. MAESSEN, G. D. F., R. AMONS, J. A. MAESSEN and W. MOELLER. 1986. Primary structure of elongation factor 1-beta- from *Artemia*. *FEBS Lett*. 208: 77
13. VON der KRAMER, H., J. KLAUDINY, M. ZIMMER and K. H. SCHEIT. 1991. Human elongation factor 1beta: cDNA and derived amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 177: 312
14. OUAISSI, M. A., J. CORNETTE and A. CAPRON. 1986. Isolation and functional characterization of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes fibronectin receptor. *Mol. Biochem. Parasitol*. 19: 201
15. 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
16. CORNETTE, J., A. CAPRON and M. A. OUAISSI. 1988. *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol*. 86: 139
17. SMITH, D. B. and K. S. JOHNSON. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*. 67: 31
18. BALLOUL, J. M., P. SONDERMEYER, D. DREYER, M. CAPRON, J. M. GRZYCH, R. J. PIERCE, D. CARVALLO, J. P.

- LECOCQ and A. CAPRON. 1987. Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature*. 326: 149
19. TROTTEIN, F., M. P. KIENY, C. VERWAERDE, G. TORPIER, R. J. PIERCE, J. M. BALLOUL, D. SCHMITT, J. P. LECOCQ and A. CAPRON. 1990. Molecular cloning and tissue distribution of the 26 kDa *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 41: 35
20. TOWBIN, H., T. STAHELIN and J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfert of proteins from ployacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*. 76: 4350
21. CHIRGWIN, J. M., A. E. PRYZBYLA, R. J. MAC DONALD and W. J. RUTTER. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18: 5294
22. MANIATIS, T., E. F. FRITSCH and J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
23. SANGER, F., S. NICKLEN and A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74: 5463
24. TAUZ, D. and M. RENZ. 1983. An optimal freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal. Biochem.* 132: 14
25. McCARTHY-BURKE, C., Z. A. TAYLOR and A. G. BUCK. 1989. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. *Gene*. 82: 177
26. van DAMME, H. T. F., R. AMONS, R. KARSSIES, C. J. TIMMERS, G. M. C. JANSSEN and W. MOELLER. 1990. Elongation factor 1-beta in *Artemia*: localization of functional sites and homology to elongation factor 1-delta. *Biochem. Biophys. Acta*. 1050: 241
27. GONZALEZ, A., J. L. ROSALES, V. LEY and C. DIAS. 1990. Cloning and characterization of a gene encoding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes end amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biol. Parasitol.* 40: 233

28. **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
29. **MOLDAVE, K.** 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 1109
30. **BELLE, R., J. DERANCOURT, R. POULHE, J. P. CAPONY, R. OZON and O. MULNER-LORILLON.** 1989. A purified complex from *Xenopus* contains a p47 protein, and an in vivo substrate of MFP, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 alpha and EF-1beta. *FEBS Lett.* 255: 101
31. **JANSSEN, G. M. C., G. D. F. MAESSEN, R. AMONS and W. MÖLLER.** 1988. Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic exchange activity. *J. Biol. Chem.* 263: 11063
32. **EJIRI, S. and H. HONDA.** 1985. Effect of cyclic AMP and cyclic GMP on the autophosphorylation of elongation factor 1 from wheat embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 128: 53

	10	20	30	40	50	60	70			
TcGBP-B	AATTCGGCACGAG-----TGAAGGACGCCATGACCACCCTGAAGGAAGTAAAGGGCCCTCAGCTCCCGCCATACGTC									
	AATTCGGCACGAG.....T.AAGGACG.CA..A...GA.CT..A.GGC...CT.A...C.AGC...T..T.									
TcGBP-O	AATTCGGCACGAGGAAAAAAGCCATCTCTGTTAAGGACGTTCAACAAGAGGAGCGGTGAGCTGGAGGGCAAGCTGAAAGGGCAAGCTTTTTTTG									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	
	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170
TcGBP-B	TCGGGCTACTGCCACGCCAGAA-GACGGCAAGATATTCGCTGAGATGTTCCGGTCTG---CTGGCACTGTGGCTGAGTGGGCCGCACGATATGGCTTCGT									
	...GGC...CC..CC.A..A.GACG.GAAG.T.TTC...GA..TG...GGC.C....CAC..C..TG...GTGG...C.TATG.C.TC.T									
TcGBP-O	GGCGGCACAAAGCCTTCCAAAGAGGACGTGAAGCTGTTCAACGACTTGTGGGGCCGAAACACATCCTTGTACCTGTGGGTGAAGCATAAGACCTCTCT									
	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190
	180					190	200	210	220	
TcGBP-B	ACTATCAAGCGGA-----CGGAACAGATCCTCAAGGGCACCGCATCTCTCAAAAGAGGC									
	.C...A.GCGGA.....CGG.....TCC.C...GCA..GCA..C.C...CAAAAGAGGC									
TcGBP-O	TCACGGAGGGCGGCGCAAGCGCTGGGGGGCCCTGTGAAGGTTACAGCTACCACTTCGGCT---TCCGCTCCGCAAGCAGGCAC--CAAAAGAGGC									
	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290
	230		240	250	260	270	280	290	300	
TcGBP-B	CGCTGCTGC-----TGAAGACGAAGACATGACCTCTTCGGGGAAGCGAGGAGGAGAGCGGTCTCTTGAAGGCAAGAGAAAG									
	.GC..CTGC.....TGAAGACGA..GA..ATTGACCTCTTCGGGGAAGCGAGGAGGAGAGCGGTCTCTTGAAGGCAAGAGAAAG									
TcGBP-O	GGCGTCTGCCCGCCACAGCAAGCCGATGAAGACGAGGAAATTGACCTCTTCGGGGAAGCGAGGAGGAGAGCGGTCTCTTGAAGGCAAGAGAAAG									
	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
TcGBP-B	AAGGACGCTGACGCCAAGGCAAGGAAAGGAGGTTATCGCCAAATCCCTCATTCTGTGTTGACGTCAAGCCGTGGGACGACACCGTGGATTTGCAGGGC									
	AAGGAC.CTGAAGCCAAAGGCAAGGAAAGGAGGTTATCGCCAAATCCCTC.AT.CTGTG.GACGTCAAGCCGTGGGACGACACCGTGGATTTGCAGGC.C									
TcGBP-O	AAGGACACTGACGCCAAGGCAAGGAAAGGAGGTTATCGCCAAATCCCTCATTCTGTGTTGACGTCAAGCCGTGGGACGACACCGTGGATTTGCAGGGC									
	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490
	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
TcGBP-B	TGGCGATAAAGTGCACGCCGTTAAGCGCGATGGCCTGTGTGGGCGACACCAAGCTGGTGCCTGTGGCATTCGGCGTAAAGAGCTGCACAGCTTAT									
	TGGCG.ATAAAGCTGCA.GCCGTTAAGCGCGA.GGCCTGTGTGGGCGACACCAAGCTGGTGCCTGTGGCATTCGGCGT.AAGAAGCTGCACAGCTTAT									
TcGBP-O	TGGCGATAAAGTGCATGCCGTTAAGCGCGACGCCCTGTGTGGGCGACACCAAGCTGGTGCCTGTGGCATTCGGCGTCAAGAAGCTGCACAGCTTAT									
	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590
	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
TcGBP-B	CGTCATTGAGGACGACAAAGTCTCCAGTGATGATTTGGAGAAATTGATCATGTGCTTTGAGGACGAAGTGCAGTCCATGGACATCGTTGCCTGGAAATAAG									
	CGTCATTGAGGACGACAA.GTCTCCAGTGATGATTTGGAGAAATTGATCATGTGCTTTGAGGACGAAGTGCAGTCCATGGACATCGTTGCCTGGAAATAAG									
TcGBP-O	CGTCATTGAGGACGACAAAGTCTCCAGTGATGATTTGGAGAAATTGATCATGTGCTTTGAGGACGAAGTGCAGTCCATGGACATCGTTGCCTGGAAATAAG									
	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690
	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
TcGBP-B	ATCTGGCCCTCACTGTTTTGAGAAATCGAAGAAAAAGGAGATGGTCCGTTCTTTTTGTGCGTGTATAACTGTTTATTGTTGTTTTTTGAGGA									
	ATCTGGCCCTCACTGTTTT.G.AATCG.A.A.AAA.A.....									
TcGBP-O	ATCTGGCCCTCACTGTTTTGAGAAATCGAAGAAAAATA-----									
	700	710	720							
	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
TcGBP-B	GGCAATAAGTGGTAAAAAT--AATAAAATAAGCGGCTCTCGCGCGTGGATGCAGGTGCAAAATCAAAGGAGTTTTAAAGGAAAATTGAGGGTAGA									
	...AATAA.....TAAAAA...AAT.AAATAA.....GTA.A									
TcGBP-O	--AATAAA--TAAAATGAAAATGAAATAAA-----GTAATA									
	730	740	750							
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
TcGBP-B	TGAGAGAAACGAGAACTTTTCTCTCCGTTCTTCTCACTTTCTCTCCACGAGACAAATCAATTGATGAAAGGACGTTTCGCCATCATCTACA									
	.GAG.AGA..CGAGG.....CGTTC.T.C.....									
TcGBP-O	AGAGCAGAGTCGAGG-----CGTTCGTC-----									
	770			780						
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
TcGBP-B	CACCAAAGTAAAAACAAAAAAGAGGAAAGGAGGAAAGGCGTCCGAGCCGGTATCTTTTTTTGTTGTTGTTGTTCTTATTGTTT									
GGGA...A...GTCG...C.....TTTTTTT.TTGTT..TTG.....									
TcGBP-O	-----GGATCCGAT--GTCGTCTCTT-----TTTTTTTTTTGTTATTG--									
					790	800	810			
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
TcGBP-B	AGGGAGCAGAGAGAGGAGGAAGAAATAAGCAAAAAAAGAGGAAAGGCGTCCGAGCCGGTAGCTGGATGA-AGGCGCGGAAATAAAAAAGAAAAA--									
AGG.....AAAAA.AAT..GTC..G....A.C.G...TGA.AGG...GAA.TA.....									
TcGBP-O	-----AGGC-----AAAAACAATTGGTCAGAAACCACAGATTGAGAGGAGGAAATATGGCGTCTCTGG									
		820			830	840	850	860	870	880
	1110									
TcGBP-B	-----AAAAAAGAAAA									
	..AAAAAAGAAAA									
TcGBP-O	GGAAAAAAGAAAA									

Figure 1. Nucleotidic sequence comparison of the two TcGBP cDNA clones. Oligonucleotides sequences used for the Northern blot experiments and predicted stop codons in TcGBP-O and TcGBP-B are boxed. Putative polyadenylation signals are underlined. These sequences have been submitted to the Genbank Data library and have been assigned the accession numbers X.

```

TcGBP-B                      10v      20v      30v
                             NSARVKDAMTTLKELNGRLSSQPYVSGYCPAR
TcGBP-O  MSVKDVNKRSGELEGKLGKGLFLGGTKPSKEDVKLFNDLLGAENTSLYLWV
          10^      20^      30^      40^      50^
TcGBP-B  40v      50v      60v      70v      80v
KTRRYSLRCSARALLWLSGPHVWLRTIKRTEQILKGTASSSSKKA AAAEDED
K . . . :A . . . : . . . Q K :AS:: K.A. EDE:
TcGBP-O  60^      70^      80^      90^      100^
          90v      100v     110v     120v     130v
TcGBP-B  IDLFG EATEEEETA ALEAKKKKDADAKKAKKEVIAKSSILFDVKPWDDTVDL
          IDLFG EATEEEETA ALEAKKKKD :DAKKAKKEVIAKSSILFDVKPWDDTVDL
TcGBP-O  IDLFG EATEEEETA ALEAKKKKDTDAKKAKKEVIAKSSILFDVKPWDDTVDL
          110^     120^     130^     140^     150^
          140v     150v     160v     170v     180v
TcGBP-B  QALADKLHAVKRDG LLWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSSDDLEEL
          QALA:KLHAVKRDG LLWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSSDDLEEL
TcGBP-O  QALANKLHAVKRDG LLWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDDKVSSDDLEEL
          160^     170^     180^     190^     200^
          190v     200v
TcGBP-B  IMSFEDEVQSMDIVAWNKI
          IMSFEDEVQSMDIVAWNKI
TcGBP-O  IMSFEDEVQSMDIVAWNKI
          210^     220^

```

Figure 2. Amino acids comparison of the two TcGBP sequences. Synthetic peptides derived from these sequences are underlined.[] shows a repeated motif. A potential glycosylation site is boxed.

TcGBP-B	TASSSKKAAAEDDEDIDLFG-EATEEET--AA-LEAKKKKDADAKKAKK-EVIAKS	119
TcGBP-O	KAASAPAKQADEDEEIDLFG-EATEEET--AA-LEAKKKKDTDAKKAKK-EVIAKS	137
HEF β	KTGSGAT-DSKDDDEIDLFG-SDDEEESEEAKRI REERLAQYESKKAKKPALVAKS	140
AsEF β	---TSASK--EDDDEVDFLFGSDEEDEEA--EK-IKEERMAAYSDDKSKKPAIVAKS	121
TcGBP-B	SILFDVKPWDDTVDLQALADKLVAVKRDGLLWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDD	175
TcGBP-O	SILFDVKPWDDTVDLQALANKLVAVKRDGLLWGDHKLVPVAFGVKKLQQLIVIEDD	193
HEF β	SILLDVKPWDDETDMAKLEECVRSIQADGLLWGS SKLVVPGYGIKKLQIQCVVEDD	196
AsEF β	SVILDIKPWDDETDMAEMEKLVRSIQMDGLLWGAAKLIPLGYGIKKLSIMCVVEDD	177
XIEF β	VKPWDDE	
TcGBP-B	KVSSDDLEELIMSFEDVQSMDIVAWNKI	204
TcGBP-O	KVSSDDLEELIMSFEDVQSMDIVAWNKI	222
HEF β	KVGTDDLEEQITAFEDYVQSMVAAFNKI	225
AsEF β	KVGIDELQEKISEFEDFVQSVVAAFNKV	206
XIEF β	KIGAFEDFVQSM	

Figure 3. Comparison of amino acid sequences. Alignment based on identity was done employing the program Aalign from DNASTar. HEF β : human elongation factor 1b; AsEF β : elongation factor b from *Artemia salina*; XIEF β : elongation factor b from *Xenopus laevis*.

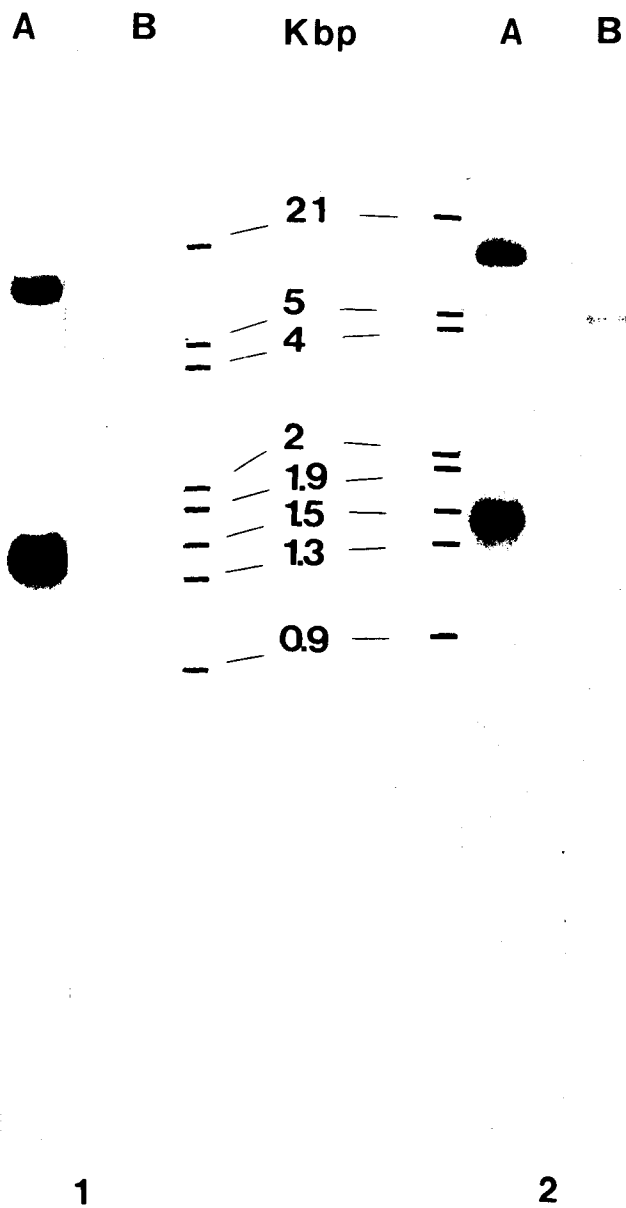


Figure 4. Genomic southern-blots reveal the TcGBP gene family: 10 μ g DNA/lane, digested with Bam HI (lanes A) and EcoRI (lanes B), and probed with TcGBP-O labeled cDNA (lanes A1 and B1) or TcGBP-B labeled cDNA (lanes A2 and B2).

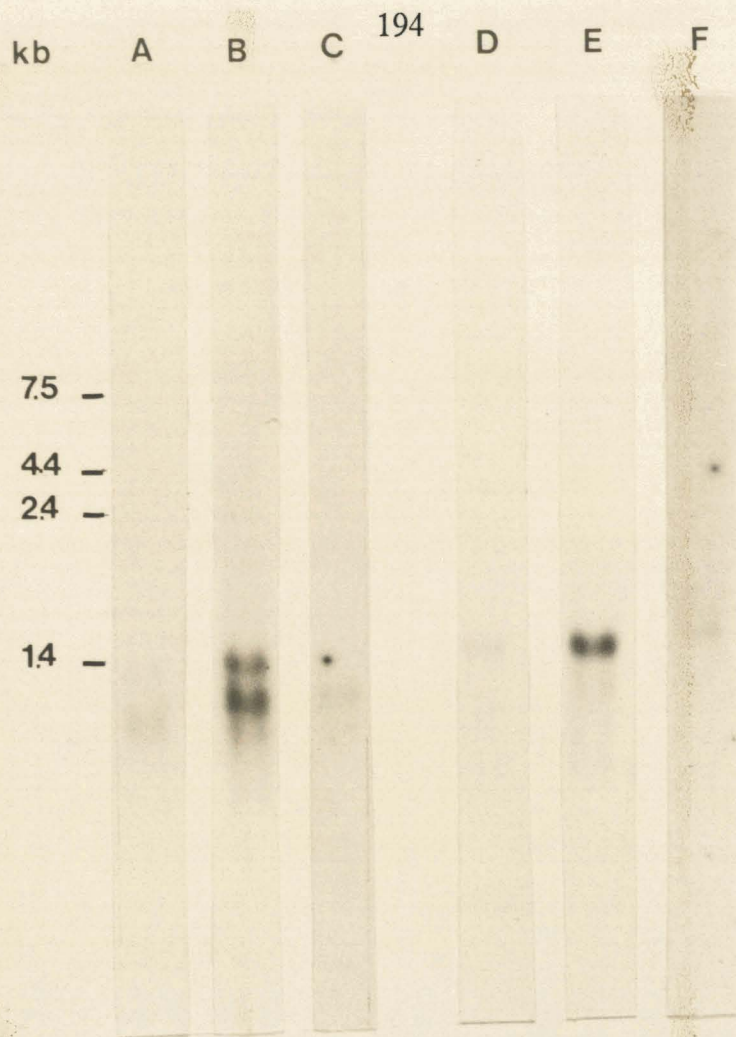


Figure 5. Northern-blots of trypanomastigote (lane A and D) or epimastigote total RNA (lane B, C, E, and F) (10 μ g) was hybridized with different labeled probes: TcGBP-O cDNA (lane A and B); TcGBP-B cDNA (lane D and E); cDNA TcGBP-O specific oligonucleotide (lane C); cDNA TcGBP-B specific oligonucleotide (lane F).

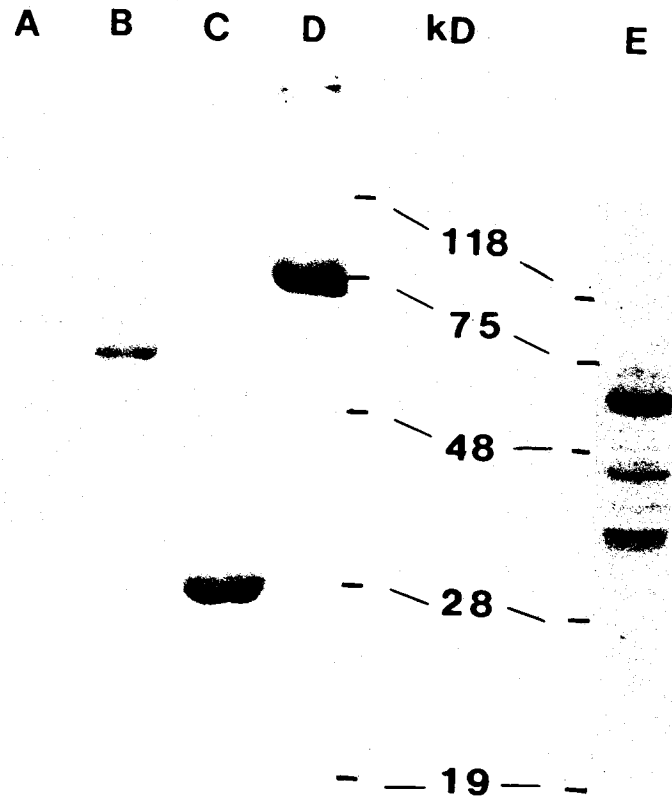


Figure 6. SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant blue of proteins expressed in the pGEX-2T vector: TcGBP-O (lane A); TcGBP-B (lane B); Sj26 GST (lane C); control BSA (lane D) and Tg-30 (lane E).

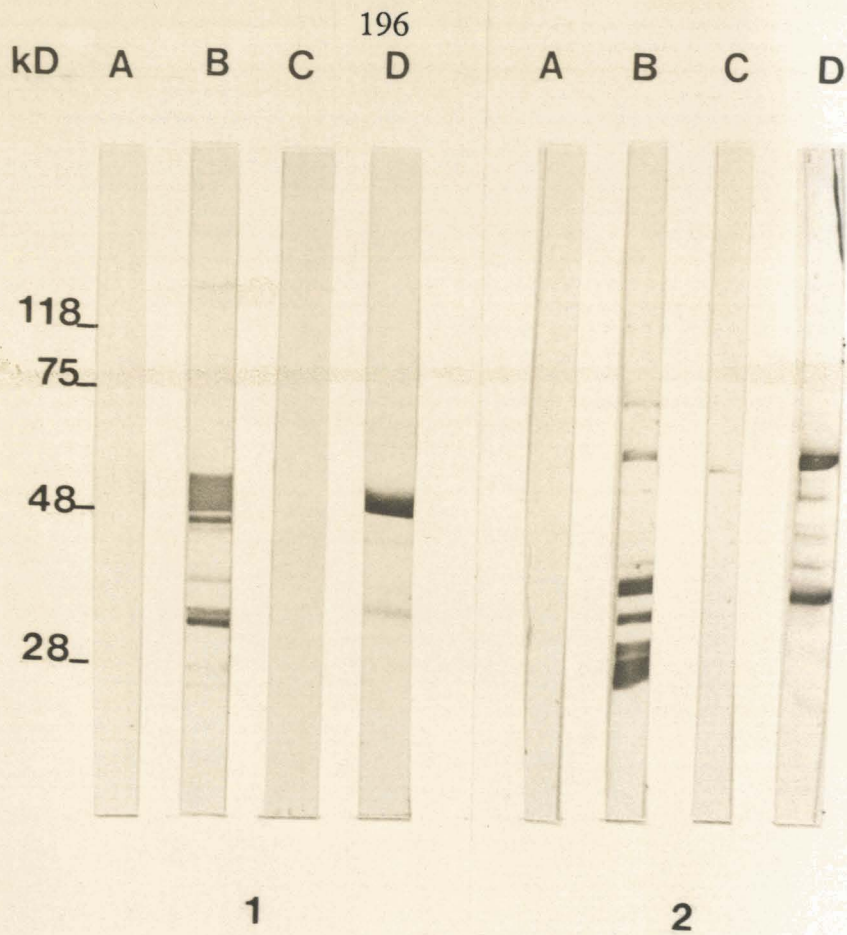


Figure 7. Detection of fusion proteins expressed in the pGEX-2T vector using Western-blot on TcGBP-B (1) and TcGBP-O, (2) fusion proteins (5 μ g/lane) reacted with different mouse sera : a serum injected with BpA1 alone (lane A), a serum directed against the Sm26 GST (lane B), a serum directed against a 30 kDA of *Toxoplasma gondii* (lane C), a serum directed against the TcGBP (lane D).

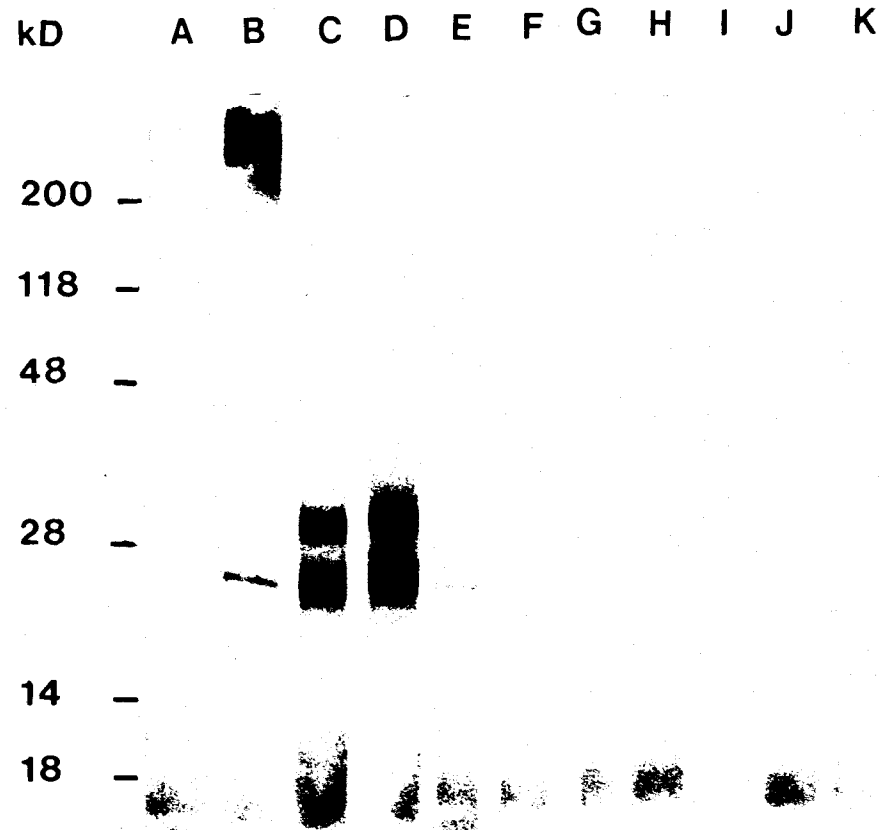


Figure 8. Reactivity analysis of different mouse antisera directed against fusion proteins or synthetic peptides using Western-blot on epimastigotes lysate (20 μ g/lane) : a serum injected with BpAl alone (lane A), a serum directed against the TcGBP native proteins (lane B), a serum directed against the TcGBP-O (lane C), a serum directed against the TcGBP-B (lane D), a serum directed against a synthetic peptide common to both sequences (E), a sera directed against the synthetic peptide specific for the TcGBP-O sequence (F), a serum directed against Tg-30 (lane G), a serum directed against the Sj26 GST (lane H), a serum directed against a synthetic peptide corresponding to a portion of the Sm28 GST (lane I), a serum directed against ovalbumin alone (lane J).

Figure legends

Figure 1. Nucleotidic sequence comparison of the two TcGBP cDNA clones. Oligonucleotides sequences used for the Northern blot experiments and predicted stop codons in TcGBP-O and TcGBP-B are boxed. Putative polyadelylations signals are underlined. These sequences have been submitted to the Genbank Data library and have been assigned the accession numbers X.

Figure 2. Amino acids comparison of the two TcGBP sequences. Synthetic peptides derived from these sequences are underlined.[] shows a repeated motif. A potential glycosylation site is boxed.

Figure 3. Comparison of amino acid sequences. Aligement based on identity was done employing the program Aalign from DNASTar. HEF β : human elongation factor 1 β ; AsEF β : elongation facor β from *Artemia salina*; XIEF β : elongation factor β from *Xenopus laevis*.

Figure 4. Genomic southern-blots reveal the TcGBP gene family: 10 μ g DNA/lane, digested with Bam H1 (lanes A) and EcoR1 (lanes B), and probed with TcGBP- O labeled cDNA (lanes A1 and B1) or TcGBP-B labeled cDNA (lanes A2 and B2).

Figure 5. Northern-blots of trypomastigote (lane A and D) or epimastigote total RNA (lane B, C, E, and F) (10 μ g) was hybridized with different labeled probes: TcGBP-O cDNA (lane A and B); TcGBP-B cDNA (lane D and E); cDNA TcGBP-O specific oligonucleotide (lane C); cDNA TcGBP-B specific oligonucleotide (lane F).

Figure 6. SDS-PAGE stained with Coumassie Brilliant blue of proteins expressed in the pGEX-2T vector: TcGBP-O (lane A); TcGBP-B (lane B); Sj26 GST (lane C); control BSA (lane D) and Tg-30 (lane E).

Figure 7. Detection of fusion proteins expressed in the pGEX-2T vector using Western-blot on TcGBP-B (1) and TcGBP-O, (2) fusion proteins (5 μ g/lane) reacted with different mouse sera : a serum injected with BpAl alone (lane A), a serum directed against the Sm26 GST (lane B), a serum directed against a 30 kDA of *Toxoplasma gondii* (lane C), a serum directed against the TcGBP (lane D).

Figure 8. Reactivity analysis of different mouse antisera directed against fusion proteins or synthetic peptides using Western-blot on epimastigotes lysate (20 μ g/lane) : a serum injected with BpAl alone (lane A), a serum directed against the TcGBP native proteins (lane B), a serum directed against the TcGBP-O (lane C), a serum directed against the TcGBP-B (lane D), a serum directed against a synthetic peptide common to both sequences (E), a sera directed against the synthetic peptide specific

for the TcGBP-O sequence (F), a serum directed against Tg-30 (lane G), a serum directed against the Sj26 GST (lane H), a serum directed against a synthetic peptide corresponding to a portion of the Sm28 GST (lane I), a serum directed against ovalbumin alone (laneJ).



The authors would thank Dr. C. Dissous and Dr. R. Lafiatis for helpful comments about this work, and Dr. J.P. Kusnierz for synthesising the oligonucleotides. This work was supported by INSERM U167-CNRS 624, the European Economic Community and the Mérieux Foundation.

DISCUSSION
CONCLUSION

DISCUSSION-CONCLUSION

La maladie de Chagas ou trypanosomiase américaine, causée par le protozoaire flagellé *Trypanosoma cruzi* comprend une phase aiguë suivie d'une phase chronique. Cette parasitose pose de graves problèmes de santé publique puisqu'elle affecte plus de 20 millions de personnes sur le continent sud-américain (SCHOFIELD,1985). Les moyens de lutte employés aujourd'hui visent à éliminer l'insecte vecteur, le triatome, ainsi qu'à améliorer les approches chimiothérapeutiques. Certains scientifiques étaient jusqu'ici plus favorables à des mesures sociales visant à améliorer les conditions de vie en zone d'endémie, qu'à une véritable politique mettant en place une approche vaccinale (BRENER,1987; DIAS,1987; SCHOFIELD,1985). Néanmoins, de nombreux travaux se sont consacrés à l'obtention de préparations vaccinales satisfaisantes (ANDREWS, et al.,1985; BURGESS DE et coll.,1979; KIERSZENBAUM F,1980; RUIZ AM et coll.,1986a). Plusieurs composants parasitaires portant des déterminants antigéniques communs à ceux de l'hôte vertébré ont été mis en évidence (PETRY & VAN WOORHIS,1991; WOOD, et coll.,1982). La "mimiquerie" fonctionnelle et/ou moléculaire existant entre le parasite et son hôte pourrait être à l'origine des processus immunopathologiques se déroulant lors de la phase chronique. De plus, l'infection chagastique évoluant dans un contexte d'activation polyclonale (MINOPRIO, et coll. ,1986b) et d'immunosuppression (BELTZ & KIERSZENBAUM,1987), est considérée par plusieurs auteurs comme étant une maladie auto-immune. C'est pourquoi seules des molécules purifiées n'induisant ni d'activation polyclonale, ni d'immunosuppression, ni encore de réaction croisée

avec les tissus de l'hôte doivent être prises en compte lors de l'élaboration d'une stratégie vaccinale.

Durant les dernières années, les travaux concernant les antigènes potentiellement protecteurs de *Trypanosoma cruzi* se sont focalisés sur les glycoprotéines majeures de surface, spécifiques du stade trypomastigote (GOLDENBERG, et coll.,1983). La stratégie employée devait induire une réponse immune capable de bloquer les processus d'invasion parasitaire (ABUIN, et coll.,1989; OUAISSI, et coll.,1990b; SCOTT & SNARY,1979; SNARY D,1983; YOSHIDA,1986). Ces travaux n'ont pas donné de résultat satisfaisant, en raison certainement des multiples mécanismes intervenant lors des étapes d'adhésion puis d'infection des cellules-hôtes par le parasite (OUAISSI, et coll.,1991). Il est donc probable que le blocage de l'une de ces interactions soit insuffisant pour enrayer la dissémination des trypomastigotes. De plus, il semble que le parasite *Trypanosoma cruzi* ait acquis la capacité d'échapper aux effets des anticorps ou des cellules effectrices de l'immunité dirigés vis à vis de ses composants majeurs de surface. L'extrême diversité des molécules (dont les antigènes de 85 kDa) présentes à la surface des trypomastigotes pourrait jouer un rôle dans ces mécanismes d'échappement (KAHN, et coll.,1990). Il s'agirait alors non pas de variation antigénique (BORST & CROSS,1982) comme dans le cas des trypanosomes africains mais de diversité antigénique.

D'autre part, au cours d'une infection chronique, telle que la maladie de Chagas, des épitopes communs portés par les stades parasitaires responsables à la fois de l'infection et de la ré-infection doivent être la cible de la réponse immune protectrice.

Dans ce cadre, l'importance probable du stade amastigote a largement été occultée, aux vues des récents travaux, qui laissent à penser qu'il est également un stade infectant, détectable dans la circulation de souris infectées (ANDREWS NW et coll.,1987b; LEY, et coll.,1988).

Il devenait donc nécessaire d'entreprendre de nouvelles approches dans la recherche d'un vaccin contre la trypanosomiase américaine. Nous avons donc entrepris de suivre une stratégie, basée sur l'identification d'antigènes cibles indispensables au développement du parasite chez son hôte.

Les molécules possédant de probables fonctions détoxifiantes au cours du cycle parasitaire représentaient de bons candidats. Un certain nombre d'arguments laissent à penser que les enzymes liées au cycle du glutathion, en particulier les glutathion S-transférases (GST) pouvaient être intéressantes à plusieurs titres. Tout d'abord, l'inhibition de la synthèse du glutathion avait été proposée comme une voie d'approche pour lutter contre la trypanosomiase africaine (ARRICK, et coll.,1971). De plus, plusieurs enzymes intervenant dans le métabolisme du glutathion ou d'un composé dérivé du glutathion (trypanothion), dont une GST, avaient déjà été décrites chez *Trypanosoma cruzi* (FAIRLAMB, et coll.,1985; REPETTO, et coll.,1987; YAWETZ A et coll.,1979; YAWETZ & AGOSIN,1981). Enfin, les expériences de protection réalisées avec les GSTs de *Schistosoma mansoni* et de *Fasciola hepatica* suggéraient que ces enzymes pourraient être utilisées en tant que vaccins anti-parasitaires (CAPRON, et al.,1989; MITCHELL G,1989; SEXTON, et al.,1990; TAYLOR, et coll.,1988).

L'ensemble de ces observations nous a conduits à tenter d'étudier ce type de molécules, dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la maladie de Chagas.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé trois holoprotéines de poids moléculaire 45, 30 et 25 kDa ayant la capacité de se fixer au glutathion réduit, et présentes à tous les stades parasitaires. Ces protéines (TcGBP) spécifiques de *Trypanosoma cruzi*, sont immunogènes lors des infections chagasiques naturelle et expérimentale. Injectées en présence de *Bordetella pertussis* et d'alun (BpAl), elles sont capables d'induire une protection significative chez la souris infectée par une dose létale de trypomastigotes. Par contre, administrées avec de l'adjuvant complet et incomplet de Freund (ACF/AIF), les antigènes TcGBP ne peuvent stimuler une réponse protectrice. Les protéines de 30 et 25 kDa ont été partiellement clonées et séquencées. Administrée sous forme de protéine de fusion, le composant de 30 kDa est capable de reproduire en partie l'effet protecteur (retard de mortalité) obtenu avec le mélange des trois protéines natives (Résultats non présentés). Ces observations montrent clairement et ce pour la première fois, que des antigènes non glycosylés, peuvent être protecteurs chez la souris, la réponse immune protectrice étant fortement conditionnée par le choix de l'adjuvant.

Les antigènes TcGBP sont potentiellement protecteurs.

Un des résultats les plus prometteurs dans cette étude réside dans la protection obtenue avec les trois antigènes TcGBP ainsi qu'avec la protéine de

fusion de 30 kDa. Pour tenter de corréler le niveau de protection à l'adjuvant utilisé et de dégager ainsi les mécanismes effecteurs responsables de l'immunité observée, la réponse humorale des souris immunisées/protégées a été analysée.

Dans un premier temps, il a été observé que seuls les sérums de souris immunisées par les antigènes TcGBP en présence de BpAl étaient capables de lyser des parasites en présence de complément, alors que les sérums de souris immunisées en présence d'ACF/AIF ne présentaient pas d'activité lytique. Ces résultats suggéraient donc que la lyse dépendante du complément pouvait être impliquée dans les mécanismes immunitaires induits par les protéines TcGBP. Ces observations semblent rejoindre celles de plusieurs auteurs qui mettaient en évidence, chez la souris, l'importance de la lyse en présence de complément dans l'induction d'une immunité protectrice vis-à-vis de *Trypanosoma cruzi* (KRETTLI & BRENER, 1976); (SEGURA, et coll., 1986); (RUIZ, et coll., 1990).

Dans un deuxième temps, il a été montré que seuls les sérums de souris immunisées avec les antigènes TcGBP en présence de BpAl présentaient des taux significatifs d'anticorps IgG2a, IgG2b et IgE spécifiques, et que les taux de chacun de ces isotypes étaient plus élevés après l'infection. Par contre, les anticorps spécifiques de type IgG1 étaient détectés dans les sérums de souris immunisées avec les antigènes TcGBP, que ce soit en présence d'ACF/AIF ou de BpAl. Nous avons donc émis l'hypothèse de la participation des anticorps de type IgE mais également IgG2a et IgG2b spécifiques des protéines TcGBP dans l'induction de la réponse immunoprotectrice. Ces anticorps pourraient intervenir

dans plusieurs mécanismes tels la lyse par l'intermédiaire du complément (KRETTLI & BRENER,1982), mais aussi dans la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (KIPNIS, et coll.,1981; LIMA-MARTINS, et coll.,1985; OKABE et coll.,1980; VELGE, et coll.,1991) ou encore dans l'inhibition de la pénétration du parasite dans les cellules hôtes (ALVES, et coll.,1986). Nos résultats sont en accord avec les travaux de (TAKEHARA, et coll.,1981) qui ont démontré que dans le modèle souris, les anticorps protecteurs étaient essentiellement de type IgG2 mais non IgG1. La présence d'anticorps spécifique de type IgE dans les sérums de souris immunisées et protégées n'est pas tout à fait surprenante, puisque aussi bien l'alun que *Bordetella pertussis* sont des adjuvants connus pour induire une telle classe d'anticorps (BOMFORD R,1989).

Pendant longtemps les anticorps IgE furent associés aux seules réactions allergiques de part leur capacité de fixation aux mastocytes, éosinophiles et basophiles. Cependant, le rôle protecteur de cette classe d'immunoglobulines a été démontré dans certains modèles parasitaires dont la schistosomiase et la toxoplasmose.

Dans le modèle de la toxoplasmose, le rôle protecteur des IgE spécifiques chez le rat immunodéprimé a été suggéré (RIDEL PR et coll.,1988).

Dans le modèle de la schistosomiase, il a été clairement établi que les anticorps IgE jouent un rôle important dans les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps contre les schistosomules, cytotoxicité médiée par les macrophages, les éosinophiles et les plaquettes (CAPRON A et coll.,1987). De plus, transféré passivement, un anticorps monoclonal de classe IgE dirigé contre une molécule de 26 kDa, présente dans les produits d'excrétion-sécrétion du schistosomule, protège des rats contre une infection par des cercaires de

Schistosoma mansoni.

Peu d'auteurs ont étudié la réponse de type IgE dans le contexte de la maladie de Chagas humaine ou expérimentale. Cependant, des anticorps IgE spécifiques du parasite, ont été détectés dans les sérums d'enfants chagasiques en phase aiguë (MARTIN UO et coll.,1986). De plus, lors d'immunisation de souris par des exoantigènes de *Trypanosoma cruzi*, des anticorps IgE spécifiques sont obtenus (GRUPPI, et coll.,1990).

Plusieurs tests cellulaires *in vitro*, ainsi que des transferts passifs avec des sérums déplétés en certaines sous-classe d'anticorps seront nécessaires pour nous permettre de conforter nos hypothèses, dont celle de la participation des IgE dans la protection induite par les antigènes TcGBP.

La réponse cellulaire doit participer également à l'élaboration de l'immunité protectrice observée. En effet, l'alun est considéré comme étant un faible potentialisateur de la composante cellulaire de la réponse immune (BOMFORD,1989). Néanmoins, administrée en présence de *Bordetella pertussis*, la fraction flagellaire des épimastigotes peut induire une hyper-sensibilité retardée vis-à-vis d'antigènes parasitaires ou de concanavaline A (ROTTENBERG ME et coll.,1988).

La mise en évidence d'au moins deux sous-populations T auxiliaires ou "helper", Th1 et Th2, qui contrôlent la nature de la réponse immune en secrétant une variété de lymphokines à effet antagoniste, a eu un grand impact sur l'immunologie parasitaire. L'étude du rôle de ces sous-populations lymphocytaires T "helper" a déjà été entreprise dans plusieurs modèles

(LOCKSLEY RM et coll.,1991); (FINKELMAN FD et coll.,1991) dont celui de la maladie de Chagas (MINOPRIO,1991; SPINELLA S et coll.,1990). Les cellules Th2 semblent être impliquées dans le développement de la pathologie chagastique chronique chez la souris (MINOPRIO,1991; SPINELLA, et coll.,1990). Cependant, ces cellules produisent de l'IL4 (MOSMANN & COFFMAN,1989), cytokine responsable de l'induction de la réponse IgE. Dans ce contexte, il y aurait une apparente contradiction quant au rôle des cellules Th2 impliquées dans la pathologie et toutefois bénéfiques dans l'induction d'une réponse IgE protectrice. Néanmoins, il ne faut pas écarter l'existence possible de sub-divisions dans la population Th2. D'autre part, les mécanismes cellulaires conduisant à favoriser la diminution ou l'exacerbation de la pathologie sont multi-factoriels et évoluent dans le temps. Il est dès lors concevable que certaines cellules Th2, spécifiques d'antigènes particuliers aient des fonctions bénéfiques lors de la phase pré-chronique et que d'autres, spécifiques d'antigènes différents, soient impliqués dans le développement de la pathologie lors de la phase tardive de la maladie. De plus, il serait intéressant de doser l'IL10, interleukine intervenant dans la régulation des ces deux sous-populations lymphocytaires (MOSMANN TH et coll.,1991).

Des études complémentaires sont requises afin d'évaluer la contribution de la réponse à médiation cellulaire dirigée vis-à-vis des antigènes TcGBP, avec une attention particulière quant au rôle potentiel des sous-populations lymphocytaires T.

Des expériences réalisées avec un plus grand nombre d'animaux, doivent donc être entreprises afin de mieux analyser les paramètres de la réponse

immune humorale et cellulaire, dirigée vis-à-vis des antigènes TcGBP.

Si la meilleure compréhension des mécanismes effecteurs de l'immunité revêt une importance fondamentale, elle permettra également d'améliorer les taux de protection obtenus, en orientant de manière satisfaisante la réponse des animaux par l'utilisation de différents protocoles expérimentaux.

Dans ce cadre, le choix de l'adjuvant est très important. Dans nos protocoles d'immunisation, l'alun et *Bordetella pertussis* ont été utilisés. Nous avons remarqué que les souris ayant reçu ces deux adjuvants présentaient une parasitémie plus forte et mourraient plus vite que les souris témoins. L'alun peut dans certaines conditions se révéler toxique pour les macrophages (EDELMAN R,1980) qui sont à la fois des cellules hôtes mais également des cellules effectrices dans le cadre de l'infection par *Trypanosoma cruzi*. Afin de tester cette hypothèse, il conviendrait donc de tenter de reproduire les effets protecteurs observés en utilisant les adjuvants *Bordetella pertussis* et alun séparément. De plus, de nouvelles préparations adjuvantes telles le muramyl dipeptide avec ou sans adjuvant incomplet de Freund ou des préparations à bases de liposomes (WARREN HS et coll.,1986) sont aujourd'hui utilisées avec succès dans plusieurs protocoles d'immunisation et devront être testés avec les antigènes TcGBP.

L'infection chagasique évoluant dans un contexte de maladie chronique auto-immune (KIERSZENBAUM F,1986), il demeure primordial d'examiner plusieurs paramètres. En premier lieu, il convient de vérifier que les trois antigènes dont nous disposons n'induisent pas de réponse auto-immune, qu'elle soit humorale ou cellulaire. Nous avons déjà vérifié que des anticorps anti-TcGBP

ne reconnaissent pas diverses GST de mammifères ainsi que divers tissus prélevés chez la souris. Ce type d'étude devrait être poursuivi.

D'autre part, nous ne disposons pas de données sur les capacités protectrices des TcGBP en phase chronique. L'utilisation de souches de souris résistantes à l'infection par *Trypanosoma cruzi* ou bien l'emploi de doses sub-léthales de parasites, devrait conduire à la définition de plusieurs critères nous permettant d'évaluer les atteintes cardiaques, musculaires et nerveuses, survenant dans le cadre de l'infection chagasique chronique. L'avantage de l'emploi de souris résistantes réside dans le fait que les témoins développent également une phase chronique et peuvent donc être comparés aux souris vaccinées.

Enfin, dans le cadre de l'élaboration d'une stratégie vaccinale, les antigènes utilisés lors de l'immunisation doivent être capables de stimuler à nouveau la réponse immune lors de l'infection naturelle. La réponse anticorps induite par les antigènes TcGBP durant l'infection chagasique humaine (et expérimentale) démontre clairement que ces antigènes sont exposés au système immunitaire de l'hôte durant l'infection et qu'ils sont présents dans diverses souches parasitaires. Cela nous permet peut-être d'envisager la possibilité d'utiliser ces molécules lors de la vaccination humaine, d'autant que l'adjuvant utilisé jusqu'ici est compatible chez l'homme.

A propos de la fonction des antigènes TcGBP.

Le deuxième point primordial lors de nos travaux tient aux relations structure/fonction des antigènes étudiés. L'expression des antigènes TcGBP au

niveau des amastigotes intracellulaires pouvait être en faveur d'un rôle de défense de ces protéines contre les attaques de l'hôte. De plus, l'augmentation de l'expression des trois TcGBP par le phénobarbital renforçait l'idée que ces protéines pouvaient avoir un rôle direct dans les processus de détoxification parasitaire. Il était envisageable d'analyser au niveau transcriptionnel les mécanismes responsables de l'induction de ces trois protéines par cette drogue, avec une attention particulière quant à l'étude de leurs promoteurs. Le mélange des trois protéines a la capacité de fixer le glutathion réduit. De plus l'éluat de la colonne de glutathion possède une activité enzymatique de type GST. Cette activité est faible lorsqu'on la compare à d'autres GSTs, comme par exemple la GST de 28 kDa de *Schistosoma mansoni* (TAYLOR, et coll.,1988). Il est possible d'envisager que de telles enzymes de trypanosomatidés possèdent une spécificité de substrat originale par rapport aux autres organismes. Nous pouvions également émettre l'hypothèse qu'une ou plusieurs protéines présentent une autre activité.

L'analyse des séquences des deux clones obtenus (O et B) a révélé qu'ils étaient très homologues entre eux, tant au niveau des acides aminés qu'à celui des acides nucléiques. Les analyses en Southern-blot ont permis de mettre en évidence une nouvelle famille de gènes. De plus, en utilisant des anticorps anti-protéines de fusion ou des anticorps anti-peptides, nous avons démontré que les clones O et B codent respectivement pour les protéines de 25 et 30 kDa. Le poids moléculaire théorique des protéines recombinantes indique que le clone O contient vraisemblablement la séquence codante entière, alors que le clone B semble incomplet dans sa partie 5' codante. La consultation de banques de données a révélé que les deux séquences obtenues ne possédaient pas d'homologie

significative avec des GSTs déjà clonées. Cependant, elles sont homologues à 40% avec plusieurs facteurs d'élongation 1 de type β humain et d'*Artemia salina* (MAESSEN GDF et coll.,1986; VON der KRAMER H et coll.,1991), et présentent également des homologies avec certains peptides cryptiques correspondant au facteur d'élongation 1β de *Xenopus laevis* (BELLE R et coll.,1989).

Afin de replacer cette observation dans son contexte, il faut rappeler que le cycle d'élongation de la synthèse des protéines comprend trois phases:

(1) Le complexe protéique EF1 est composé de trois sous-unités: α , β et γ . EF1 α (de poids moléculaire d'environ 50 kDa) permet la fixation de l'aminoacyl-ARNt sur le site A du ribosome, cette fixation se faisant par l'intermédiaire du GTP.

(2) Une fois le facteur EF1 α -GDP libéré du ribosome, le facteur EF1 β facilite l'échange du GTP à la place du GDP initial. Alors que EF1 β (de poids moléculaire d'environ 30 kDa) est responsable de l'activité d'échange proprement dite, la fonction de EF1 γ (de poids moléculaire d'environ 45 kDa) n'est pas clairement identifiée.

(3) La formation de la liaison peptidique effectuée, le facteur EF2 entraîne le décalage de l'ARNm d'un codon, permettant la mise en place d'un nouvel aminoacyl-ARNt.

De plus, des travaux récents font apparaître que des facteurs d'élongation, le facteur EF1 α , en particulier, seraient impliqués dans d'autres fonctions que la synthèse des protéines, telles que l'organisation de l'appareil mitotique, la transduction des signaux, ou encore dans la régulation du développement (RIIS B

et coll.,1990).

D'une manière générale tous les facteurs d'initiation ou d'élongation de la synthèse des protéines sont des molécules très conservées (RIIS, et coll.,1990). Les facteurs d'élongation 1β humain (HEF1 β) et d'*Artemia salina* (AsEF1 β) sont homologues entre eux à 65% (VON der KRAMER, et coll.,1991). De plus, l'homologie entre les régions C-terminales de leurs séquences est plus importante que celle existant entre les séquences entières. Dans notre cas, les régions C-terminales des deux séquences obtenues sont presque identiques entre elles et sont homologues aux domaines C-terminaux de HEF1 β et de AsEF1 β . A l'inverse, les régions N-terminales de ces quatre protéines sont complètement différentes, seuls quelques acides aminés isolés pouvant s'aligner entre deux de ces séquences. La conservation des séquences C-terminales semble indiquer que cette région est importante pour la fonctionnalité de la protéine. En effet, chez *Artemia salina*, le site catalytique de l'EF1 β est localisé dans la région C-terminale de la molécule (van DAMME HTF et coll.,1990). Il a été récemment démontré que la phosphorylation de AsEF1 β par une kinase endogène augmentait son activité catalytique (JANSSEN GMC et coll.,1988). Le résidu sérine 89 présent dans le motif DFLSGDEEDEE a été montré comme étant la cible d'une telle phosphorylation. Ce motif est en partie retrouvé dans les séquences des clones O et B, mais ne contient pas de résidu sérine. Cependant, dans le cas de EF1 β de germe de blé, c'est un résidu thréonine qui est phosphorylé. Deux résidus thréonine sont par contre présents dans nos deux séquences et forment le motif DLFSGEEATEEET. L'un ou l'autre de ces résidus pourrait donc être le site d'une phosphorylation.

A l'heure actuelle, un seul facteur d'élongation β humain est connu (VON der KRAMER, et coll.,1991). Pourtant, l'analyse en Southern-blot indique qu'il existe plusieurs gènes ou pseudo-gènes correspondant à ce facteur, ce qui conforte ainsi l'hypothèse de l'existence de plusieurs isoformes chez l'homme. De même, chez les plantes, deux facteurs, β et β' ont été identifiés (EJIRI S et coll.,1983). L'ensemble de nos observations suggèrent que les deux molécules de 30 et 25 kDa de *Trypanosoma cruzi* pourraient correspondre à deux facteurs d'élongation β fonctionnels. Nous nous proposons par la suite, de démontrer l'implication de ces deux protéines dans la régulation des mécanismes d'élongation de la synthèse des protéines chez ce parasite.

Ces données ne remettent pas en question notre stratégie vaccinale. En effet, si deux des antigènes TcGBP sont des facteurs d'élongation potentiels, il n'est pas étonnant que la réponse immune dirigée vis-à-vis de telles molécules, affecte la survie du parasite chez son hôte. Néanmoins, si nous apportons la preuve que les deux molécules recombinantes sont protectrices dans le modèle d'infection expérimentale de la souris, il faut tenir compte de la conservation de leurs parties C-terminales. L'utilisation des portions ou de peptides synthétiques correspondant aux parties N-terminales de ces antigènes sera alors nécessaire. Sur un plan plus général, ces domaines N-terminaux pourraient servir de cibles lors d'approches chimiothérapeutiques.

Pourquoi de telles molécules ont été obtenues lors du criblage de la banque d'expression ? Les antigènes de 45, 30 et 25 kDa ont été purifiés à partir d'un lysat d'épimastigotes passé sur une colonne de glutathion réduit, puis caractérisés par électrophorèse en conditions dénaturantes et réductrices. Nous

n'avons pas néanmoins apporté la preuve que les trois molécules fixaient indépendamment le glutathion. Bien que les données de la littérature ne fassent pas apparaître de lien direct entre des facteurs d'élongation et le glutathion, nous pouvons cependant envisager que les protéines de 25 et 30 kDa interagissent avec ce tripeptide. Nous pouvons également émettre l'hypothèse que les trois antigènes soient co-élués, du fait de la fixation de la seule molécule de 45 kDa sur du glutathion. Il est donc nécessaire d'obtenir par les techniques de biologie moléculaire, le clone correspondant à cette protéine. Un criblage différentiel en utilisant les anticorps dirigés contre les trois antigènes TcGBP natifs et les anticorps anti-protéines de fusion 30 et 25 kDa devrait permettre le clonage moléculaire de cette molécule.

Les outils moléculaires dont nous disposerons dans un futur proche devraient nous permettre d'analyser la fonction des trois antigènes de 25, 30, et 45 kDa. De plus, les informations relatives aux séquences des deux molécules de 25 et 30 kDa orientent nos futurs travaux concernant le pouvoir protecteur de ces molécules.

Durant ces dernières années, les recherches visant à obtenir des antigènes majeurs de surface potentiellement vaccinaux dans le cadre de la maladie de Chagas se sont heurtés, de même que les recherches portant sur d'autres parasites à de nombreux problèmes. Pourtant, les antigènes majeurs jusqu'ici étudiés, ne constituaient pas des cibles idéales pour atteindre des organismes aussi bien adaptés à leurs hôtes que sont les parasites. C'est au contraire une stratégie basée sur l'identification d'antigènes non majoritairement représentés, mais essentiels pour la suivie du parasite chez son hôte, qui nous a

permis de mettre en évidence le pouvoir protecteur des antigènes TcGBP. Avec toutes les réserves qui s'imposent aux vues des résultats de biologie moléculaire, et s'il faut se garder de faire un parallèle trop étroit avec les autres infections parasitaires, il est fascinant de constater que de telles molécules sont également protectrices dans les modèles d'infection à *Schistosoma mansoni* et à *Fasciola hepatica*. Ces travaux peuvent constituer une base solide pour l'élaboration de composants vaccinaux contre l'infection chagasique. De plus, les futures recherches concernant les antigènes TcGBP apporteront sans doute d'importantes informations sur la biologie du parasite *Trypanosoma cruzi*.

RÉFÉRENCES

Références

- ABUIN G, COLLI W, DE SOUZA W & ALVES MJ (1989). *A surface antigen of Trypanosoma cruzi involved in cell invasion (Tc 85) is heterogenous in expression and molecular constitution.* Mol. Biochem. Parasitol. **35**:229
- ACOSTA AM, SADIGURSKI M & SANTOS-BUCH CA (1983). *Anti-striated-muscle antibody produced by Trypanosoma cruzi.* Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) **172**:364
- AFFRANCHINO JL, IBANEZ CF, LUQUETTI AO, RASSI A, REYES MB, MACINA RA, ASLUND L, PETTERSON U & FRASCH ACC (1989). *Identification of a Trypanosoma cruzi antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease* Mol. Biochem. Parasitol. **34**:221
- AGOSIN M, NAQUIRA C, PAULIN J & CAPDEVILA J (1976). *Cytochrome P-450 and drug metabolism in Trypanosoma cruzi: effects of phenobarbital.* Science **194**:195
- ALLISON JP & LANIER LLR (1987). *Structure, function and serology of the T-cell antigen receptor complex.* Ann. Rev. Immunol. **5**:503
- ALVES MJM, ABUIN G, KUWAJIMA VY & COLLI W (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
- ANDRADE SG (1974). *Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas no Reconcavo Baiano.* Rev. Pat. Trop. **1**:65
- ANDRADE ZA (1984). *The canine model of Chagas' disease.* Mem. Inst. Osw. Cruz. **79**:77

- ANDREWS N, ABRAMS CK, SLATTIA SL & GRIFFITH GA (1990). *Secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH*. *Cell* **67**:1277
- ANDREWS N & WHITLOW M (1989). *Secretion by Trypanosoma cruzi of a hemeolysin active at low pH*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**:249
- ANDREWS NW, HONG K, ROBBINS ES & NUSSENZWEIG V (1987a). *Stage-specific surface antigens expressed during morphogenesis of vertebrate forms of Trypanosoma cruzi* *Exp. Parasitol.* **64**:112
- ANDREWS NW, KATZIN A & COLLI W *Mapping of surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi by two dimensional electrophoresis. A correlation with the cell invasion capacity* *Eur. J. Biochem.* **140**:599
- ANDREWS NW, MANSO ALVES MJ, SCHUMACHER RI & COLLI. W (1985). *Trypanosoma cruzi: protection in mice immunized with 8-methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes*. *Exp. Parasitol.* **60**:255
- ANDREWS NW, ROBBINS ES, LEY V, HONG S & NUSSENZWEIG V (1988). *Developmentally regulated phospholipase C-mediated release of the major surface glycoprotein of amastigotes of Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* **167**:300
- ARAUJO FG (1985). *Trypanosoma cruzi: expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells*. *J. Immunol.* **135**:41
- ARAUJO FG & TIGHE L (1984). *Antigens of Trypanosoma cruzi: evidence that the 90-kd protective glycoprotein antigen is expressed in blood-form*

- trypomastigotes and may not be functional in dead epimastigotes.* J. Parasitol. 70:185
- ARAUJO FG, WILLIAMS DM, GRUMET FC & REMINGTON JR (1976). *Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma.* Inf. & Immun. 13:1525
- ARRICK BA, GRIFFITH OW & CERAMI A (1971). *Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for Trypanosomiasis.* J. Exp. Med 153:720
- ASLUND L, HENRIKSSON J, CAMPETELLA O, FRASCH ACC, PETERSON U & CAZZULO JJ (1991). *The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from Trypanosoma cruzi.* Mol. Biochem. Parasitol. 45:345
- AVILA AH, SIGMAN DS, COHEN LM & MILLIKAN RC (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
- BALLOUL JM, GRZYCH JM, PIERCE R & CAPRON A (1987). *A purified 28,000 Dalton protein from Schistosoma mansoni adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis.* J. Immunol 138:3448
- BAUM SG, WIGTNER M, MADLER JP, HOROWITZ SB, DENNIS JE, SCHIFF PB & TANOWITZ HB (1981). *Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of Trypanosoma cruzi.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:4571
- BEARD CA, WRIGHTSMAN RA & MANNING JE (1985). *Identification of monoclonal antibodies against the trypomastigote stage of Trypanosoma*

cruzi by use of iminobiotinylated surface polypeptides. Mol. Biochem. Parasitol. 16:199

BELLE R, DERANCOURT J, POULHE R, CAPONY JP, OZON R & MULNER-LORILLON O (1989). A purified complex from *Xenopus* contains a p47 protein, and an *in vivo* substrate of MFP, and a p30 protein respectively homologous to elongation factors EF-1 alpha and EF-1beta. FEBS Lett. 255:101

BELTZ LA & KIERSZENBAUM F (1987). Suppression of human lymphocyte responses by *Trypanosoma cruzi*. Immunol. 60:309

BELTZ LA, KIERSZENBAUM F & SZTEIN MB (1990). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human peripheral blood lymphocytes activated via the alternative (CD2) pathway. Infect. Immun. 58:1114

BELTZ LA, SZTEIN MB & KIERSZENBAUM F (1988). Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 receptor expression. J. Immunol. 141:289

BEN YOUNES-CHENNOUFI A, SAID G, EISEN H, DURAND A & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M (1988). Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4+). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 82:84

BLACK CM, ISRAELI DM, SUZUKI Y & REMINGTON JS (1989). Effect of recombinant tumour necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. Immunol. 68:570

BOMFORD R (1989). Adjuvants for anti-parasite vaccines Parasitol. today 5:41

BONALDO MC, SOUTO-PARDON T, de SOUZA W & GOLDENBERG S (1988). Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J.

Cell. Biol. **106**:1349

BORST P & CROSS GAM (1982). *The molecular basis for trypanosome antigenic variation*. Cell **29**:291

BOVERIS A, SIES H, MARTINO EE, DOCAMPO R, TURRENS JF & STOPPANI AOM (1980). *Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. **188**:643

BRACK C (1968). *Elektronenmikroskopisch untersuchungen zum lebeunszyklus von Trypanosoma cruzi*. Act. Trop. **25**:289

BRADLEY DJ (1977). *Regulation of Leishmania populations within the host: II. Genetic control of acute susceptibility of mice to Leishmania donovani infection*. Clin. Exp. Immunol. **30**:130

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

BRENER Z (1987). *Why vaccines do not work in Chagas'disease*. Parasitol. Today **2**:196

BROPHY PM & BARRETT J (1990a). *Blocking factors and the isolation of glutathione transferases from Hymenolepis diminuta (Cestoda: Cyclophyllidea)* Parasitology **100**:137

BROPHY PM & BARRETT J (1990b). *Glutathione S-transferase in helminths*. Parasitology **100**:345

BRUMPT E (1912). *Pénétration du S. cruzi à travers la muqueuse oculaire saine*. Bull. Soc. Path. Exot. Filiales **5**:723

BRUMPT E (1980). *Epidémiologie de la maladie de Chagas*. Bull. Soc. Acad. Nat. Med. **164**:88

BUA J, BONTEMPI EJ, LEVIN MJ, ORN A, VELASCO D, MORENO M,

- LEVI-YEYATI P, ENGSTROM A, SEGURA EL & RIUZ AA (1991). *Trypanosoma cruzi: cellular and antibody response against the parasite in mice immunized with a 19-amino acid synthetic peptide*. Exp. Parasitol. **72:54**
- BUDZKO DB, PIZZIMENTI MC & KIERSZENBAUM F (1975). *Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: Immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi*. Inf. & Immu. **11:86**
- BURGESS DE & HANSON WL (1979). *Adoptive transfert of protection against Trypanosoma cruzi with lymphocytes and macrophages*. Inf. & Immun. **25:838**
- BURGESS DE & HANSON WL (1980). *Trypanosoma cruzi: the T-cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T cells and Ig-bearing cells on immunological memory*. Cell. Immunol **52:176**
- CAMARGO EP, KASTELEIN P & ROITMAN I (1990). *Trypanosomatid parasites of plants (Phytomonas)*. Patasitol. today **1:22**
- CAPBERN A, MATTERN P & PAUTRIZEL R (1974). *Etude comparative du taux de protéines sériques au cours des trypanosomiasés à Trypanosoma gambiense et Trypanosoma cruzi chez la souris*. Exp. Parasitol. **35:86**
- CAPRON A, BALLOUL JM, GREZEL D, GRZYCH JM, WOLOWCZUC I, AURIAULT C, BOULANGER D, CAPRON M & PIERCE RJ (1989). *Progress towards vaccination against schistosomiasis*. Progress in Immunology, vol. VII. Melchers et al. (Eds), Springer-Verlag.
- CAPRON A & DESSAINT JP (1987). *Immunity to schistosomes: progress toward vaccine*. Science **238:1065**

- CAPRON A & DESSAINT JP (1989). *Molecular basis of host-parasite relationship: towards the definition of protective antigens*. Immunol. Rev.
- CAVALLESCO R & PEREIRA MEA (1988). *Antibody to Trypanosoma cruzi neuraminidase enhances infection in vitro and identifies a subpopulation of trypomastigotes*. J. Immunol. **140**:617
- CAZZULO JJ, COUSO R, RAIMONDI A, WERNSTEDT C & HELLMAN U (1989). *Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **35**:33
- CERISOLA JA (1970). *Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunfluorescence test*. J. Parasitol. **56**:409
- CHAGAS C (1909). *Nova Trypanosomiase humana*. Mem. Inst. Osw. Cruz. **1**:159
- CHAGAS C (1911). *Molestia de Chagas on tireoidite parasitaria Leuzinger, Rio de Janeiro*.
- CHARLES D (1987). *Maladie de Chagas*. Encycl. Med. Chir. (Paris, France), Maladies infectieuses.8095 C10. **7**:1
- CHESS Q, ACOSTA AM, SETHI JK & SANTOS-BUCH CA (1983). *Reversible acquisition of a host surface membrane antigen by Trypanosoma cruzi*. Inf. & Immun. **40**:299
- CHOROMANSKI L & KUHN RE (1985). *Interleukin 2 enhances specific and non specific immune responses in experimental Chagas 'disease*. Inf. & Immun. **50**:354
- CLINTON BA, ORTIZ-ORTIZ L, GARCIA W, MARTINEZ T & CAPIN R (1975). *Trypanosoma cruzi: early immune responses in infected mice*. Exp.

Parasitol. 37:417

- CORNETTE J, CAPRON A & OUAISSI MA (1988). *Trypanosoma cruzi*: fibronectin promotes uptake of epimastigote culture forms by human neutrophils and monocytes. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol.* 86:139
- CORSINI AC, CLAYTON C, ASKONAS BA & OLGIVIE BM (1977). *Loss of B cell potential in mice infected with Trypanosoma brucei*. *Clin. Exp. Immunol.* 29:122
- COSSIO PM, DIEZ C, SZARFMAN A, KREUTZER E, CANDIOLO B & ARANA RM (1974). *Chagasic cardiomyopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which binds with endocardium and vascular structures*. *Circulation* 49:13
- CUNNINGHAM DS & KHUN R (1980). *Trypanosoma cruzi induced suppressor substance. I. Cellular involvement and partial characterization*. *J. Immunol.* 124:2122
- d'IMPERIO LIMA MR, EISEN H, MINOPRIO P, JOSKOWICZ M & COUTINHO A (1986). *Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease*. *J. Immunol.* 137:353
- d'IMPERIO LIMA MR, JOSKOWICZ M, COUTINHO A, KIPNIS T & EISEN H (1985). *Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi*. *Euro. J. Immunol.* 15:201
- DAMONNEVILLE M, AURIAULT C, VERWAERDE C, DELANOYE A, PIERCE R & CAPRON A (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

DARCY F, DESLEE D, SANTORO F, CHARIF H, AURIAULT C, DECOSTER A, DUQUESNE V & CAPRON A (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

de ISOLA ELD, LAMMEL EM, MULLER LA & GONZALEZ CAPPA SM (1987). *Culture medium for a continuous source of Trypanosoma cruzi metacyclic forms.* J. Parasitol **73**:441

de LEDERKREMER RM, LIMA C, RAMIREZ MI, FERGUSON MAJ, HOMANS SW & THOMAS-OATES J (1991). *Complete structure of the glycan of lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi epimastigotes.* J. Biol. Chem. **266**:23670

de LEDERKREMER RMM, ALVES MJM, FONESCA GC & COLLI W (1976). *A lipopeptidophosphoglycan from Trypanosoma cruzi (epimastigota). Isolation, purification and carbohydrate composition.* Biochem. Biophys. Acta. **444**:85

DE MAIO A & URBINA JA (1983). *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi: terminal oxidases in two growth phases in vitro.* Acta. Cient. Venez. **35**:134

de TITTO EH, CATTERALL JR & REMINGTON JS (1986). *Activity of recombinant tumor necrosis factor on Toxoplasma gondii and Trypanosoma cruzi.* J. Immunol. **137**:353

DEFOORT JP, OUAISSI MA, AFCHAIN D, GRAS-MASSE H, CORNETTE J, CARON H, TARTAR A & CAPRON A (1989). *Immunization with a*

synthetic peptide partially protects mice from acute lethal infection with Trypanosoma cruzi. Second Forum on Peptides, Eds A. Aubry, M. Marraud, B. Vitoux. Colloque INSERM/ John Libbey Eurotext Ltd. **174:515**

DEGRAVE W, FRAGOSO S, BRITTO C, van HEUVERSWYN H, KIDANE GZ, CARDOSO MAB, MUELLER RU, SIMPSON L & MOREL CM (1988). *Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **27:63**

DeSOUZA W (1984). *Cell biology of Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytol. **86:197**

DIAS E (1944). *Nao receptividade do pombo domestico a infeccao por Schizotrypanum* Mem. Inst. Osw. Cruz. **40:191**

DIAS JCP (1987). *Control of Chagas disease in Brazil*. Parasitol. Today **3:335**

DOCAMPO R, de BOISO JF, BOVERIS A & STOPPANI AOM (1976). *Localization of peroxidase activity in Trypanosoma cruzi microbodies*. Experientia **32:972**

DOCAMPO R & MORENO SNJ (1984). *Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi*. Rev. Infect. Dis. **6:223**

DOCAMPO R & MORENO SNJ (1985). *Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American trypanosomiasis (Chagas' disease)*. Rev. Biochem. Toxicol. **1985:**

DONELSON JE & ZENG W (1990). *A comparison of Trans-RNA splicing in Trypanosomes and Nematodes*. Parasitol. Today. **6:327**

DOUCH PGC & BUCHANAN LL (1978). *Glutathione conjugation of some*

- xenobiotics by Ascaris suum and Moniezia expansa. Xenobiotica* **8**:171
- DRAGON EA, BROTHERS VM, WRIGHTSMAN RA & MANNING J (1985).
A Mr. 90000 surface polypeptide of T.c. as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. Mol. Biol. Parasitol. **16**:213
- DRAGON EA, SIAS SR, KATO EA & GABE JD (1987). *The genome of Trypanosoma cruzi contains a constitutive expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. Mol. Cell. Biol.* **7**:1271
- DVORAK JA (1984). *The natural heterogeneity of Trypanosoma cruzi: biological and medical implications. J. Cell. Biochem* **24**:357
- EAKIN AE, BOUVIER J, SAKANARI JA, CRAIK CS & MCKERROW JH (1990). *Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. Mol. Biochem. Parasitol.* **39**:1
- EDELMAN R (1980). *Vaccine adjuvants. Rev. Infect. Diseases.* **2**:370
- EJIRI S, EBATA N, KAWAMURA R & KATSUMATA T (1983). *Occurrence of four subunits in high molecular weight forms of polypeptide chain elongation factor 1 from Wheat embryo. J. Biochem.* **94**:319
- ENGMAN DM, KRAUSE K-H, BLUMIN JH, KIM KS & KIRCHHOFF LV (1989). *A novel flagellar calcium-binding protein in Trypanosomes. J. Biol. Chem.* **264**:18627
- ENGMAN DM, REDDY LV, DONELSON JE & KIRCHHOFF LV (1987). *Trypanosoma cruzi exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. Mol. Biochem. Parasitol.* **22**:115
- ENGMAN DM, SIAS SR, GABE JD, DONELSON JE & DRAGON EA (1989).

- Comparison of hsp 70 genes from two strains of Trypanosoma cruzi.* Mol. Biochem. Parasitol. **37**:285
- FAIRLAMB AH, BLACKBURN P, ULRICH P, CHAIT BT & CERAMI A (1985). *Trypanothione: a novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids.* Science **148**5
- FAIRLAMB AH, HENDERSON GB & CERAMI A (1986). *The biosynthesis of trypanothione and N1 glutathionspermidine in Crithidia fasciculata.* Mol. Biochem. Parasitol. **21**:247
- FILARDI LS & BRENER Z (1987). *Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease.* Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **81**:755
- FIORENTINO D, BOND M & MOSMANN T (1989). *Two types of helper T cells.-IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.* J. Exp. Med. **170**:2081
- FISCHER E, OUAISSI MA, VELGE P, CORNETTE J & KAZATCHKINE MD (1988). *gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of Trypanosoma cruzi from damage by the human alternative complement pathway.* Immunol. **65**:299
- FRASCH ACC (1989). *Specific antibody response during the acute period of Chagas disease.* Parasitol. Today **5**:355
- FRASCH ACC, CAZZULO JJ, ASLUND L & PETTERSSON U (1991). *Comparison of genes encoding Trypanosoma cruzi antigens.* Parasitol. today. **7**:148
- GIBSON WC & MILES MA (1986). *The karyotype and ploidy of Trypanosoma cruzi.* The EMBO J. **5**:1299

- GO NF, CASTLE BE, BARRET R, KASTELEIN R, DANG W, MOSSMAN TR, MOORE KW & HOWRAD M (1990). *Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells*. J. Exp. Med **172**:1625
- GOLDENBERG S, CONTRERAS VT, BONALDO MC, SALLES JM, LIMA FRANCO MP, LAFAILLE J, GONZALES PERDOMS M, LINSS J & MOREL CM (1987). *In vitro differentiating systems for the study of differential gene expression during Trypanosoma cruzi development*. In "Molecular Strategies of Parasitic Invasion ". UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. Agabian, H. Goodman, H., and Nogueira, N, Editors. Alan R. Liss, Inc., New York. **42 N**:203
- GOLDENBERG S, CONTRERAS VT, SALLES JM, FRANCO MPAL, BONALDO MC, VALLE D, GONCALVES AM & MOREL CL (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 developement. Procceding of a meeting organized by the W.H.O.. **442**
- GONCALVES MF, UMEZAWA ES, KATZIN AM, De SOUZA W, ALVES MJM, ZINGALES B & COLLI W (1991). *Trypanosoma cruzi: shedding of surface antigens as membrane vesicles*. Exp. Parasitol. **72**:43
- GONZALES-PERDOMS M, ROMERO P & GOLDENBERG S (1988). *Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate Trypanosoma cruzi differentiation*. Exp. Parasitol. **66**:205

- GONZALEZ A, PREDIGER E, HUECAC ME, NOGUEIRA N & LIZARDI PM (1984). *Minichromosomal repetitive DNA in Trypanosoma cruzi: its use in a high sensitivity parasite detection assay*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **81**:3356
- GONZALEZ A, ROSALES JL, LEY V & DIAS C (1990). *Cloning and characterization of a gene encoding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **40**:233
- GORILLOT I (1990). *Clonage moléculaire des glutathion S-transférases de Schistosoma haematobium*. Mémoire de DEA de Sciences de la Vie et de la Santé, Université de Lille.
- GRUPPI A, GEA S, MORETTI ERA & VOTTERO-CIMA E (1989). *Human antibodies against Trypanosoma cruzi exoantigens recognizing parasite surface antigens and heart tissue components*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **90**:119
- GRUPPI A, PISTORESINI-PALENCIA MC, BASSO B & VOTTERO-CIMA E (1990). *Mouse IgE response against exoantigens of Trypanosoma cruzi*. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **92**:56
- GRZYCH JM, CAPRON M, LAMBERT PH, DISSOUS C, TORRES S & CAPRON A (1985). *An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis*. Nature **316**:74
- HAREL-BELLAN A, JOSKOWICZ M, FRADELIZI D & EISEN H (1983). *Modification of T cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected by T. cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**:3466
- HAUSCHKA TS, GOODWIN MB, PALMQIST J & BROWN E (1950).

Immunological relationship between strains of Trypanosoma cruzi and its application in the diagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. and Hyg. **30:1**

HAYAKAWA K, HARDY RR, PARKS DR & HERZENBERG LA (1983). *The Ly-1B cell subpopulations in normal, immunodefective and autoimmune mice.* J. Exp. Med. **157:202**

HEATH S, HIENY S & SHER A (1990). *A cyclic AMP inducible gene expressed during the development of infective stages of Trypanosoma cruzi.* Mol. Biochem. Parasitol. **43:133**

HENDERSON GB, FAIRLAMB AH & CERAMI A (1987). *Trypanothione dependant peroxide metabolism in Crithidia fasciculata and Trypanosoma brucei.* Mol. Biochem. Parsitol. **24:39**

HERZENBERG LA, STALL AM, LALOR P, SIDMAN C, MOORE W & PARKS D (1986). *The Lyt-1 B cell lineage.* Immunol. Rev. **93:81**

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

HOFT DF, KIM KS, OTSU K, D.R. M, YOST WJ, BLUMIN JH, DONELSON JE & KIRCHHOFF LV (1989). *Trypanosoma cruzi expresses diverse repetitive protein antigens.* Inf. & Immun. **57:1959**

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, SAID G, MILON G, MARCHAL G & EISEN H (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

HOWELL MJ, BOARD PG & BORAY JC (1988). *Glutathione S-transferases in Fasciola hepatica*. J. Parasitol. **74**:715

HUDSON L (1983). *The immunological consequence of infection*. J. Cell. Biochem **21**:299

HULSEBOS LH, CHOROMANSKI L & KUHN RE (1989). *The effect of interleukin-2 on parasitemia and myocarditis in experimental Chagas'disease*. J. Protozool. **36**:293

IBANEZ CF, AFFRANCHINO JL, MACINA RA, REYES MB, LEGUIZAMON S, CAMARGO ME, ASLUND L, PETERSON U & FRASCH ACC (1988). *Multiple Trypanosoma cruzi antigens containing tandemly repeated amino acid sequence motifs*. Mol. Biochem. Parasitol. **30**:27

IBANEZ CF, AFFRANCINO JL & FRASCH ACC (1987). *Antigenic determinants of Trypanosoma cruzi defined by cloning of parasite DNA*. Mol. Biochem. Parsitol. **25**:175

JAFFE JJ & LAMBERT RA (1986). *Glutathione S-transferase in adult Dirofilaria immitis and Brugia pahangi*. Mol. Biochem. Parasitol. **20**:199

JANSSEN GMC, MAESSEN GDF, AMONS R & MÖLLER W (1988). *Phosphorylation of elongation factor 1beta by an endogenous kinase affects its catalytic exchange activity*. J. Biol. Chem. **263**:11063

JOINER K, HIENY S, KIRCHOFF LV & SHER A (1985). *gp 72, the 72 kilodalton glycoprotein is the membrane acceptor site for C3 on Trypanosoma cruzi epimastigotes*. J. Exp. Med. **161**:1196

JOINER K, SHER A, GAITHER T & HAMMER C (1986). *Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of*

- Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6593
- JOINER KA, SA SILVA WD, RIMOLDI MT, HAMMER CH, SHR A & KIPNIS TL (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
- JOSKOWICZ M (1985). *Maladie de Chagas et autoimmunité*. Médecine et Sciences. 1:412
- KAHN S, COLBERT TG, WALLACE JC, HOAGLAND NA & EISEN H (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 SA, VAN WOORHIS WC & EISEN H (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
- KAWALEK JC, REW RS & HEAVNER J (1984). *Glutathione-S-transferase, a possible drug-metabolizing in Heamonchus contorcus: comparative activity of a cambendazole-resistant and a susceptible strain*. Int. J. Parasitol. 14:173
- KETTERER B, MEYER DJ & CLARK AG (1988). *Soluble glutathione transferase isoenzymes*. In: Glutathione Conjugation: Its mechanisms and Biological Significance (Sies, H. and Ketterer, B., eds.), Academic Press. 73
- KIERSZENBAUM F (1975). *Enhancement of resistance and suppression of immunization against experimental Trypanosoma cruzi infection by*

Corynebacterium parvum. Inf. & Immun. 12:1227

KIERSZENBAUM F (1980). *Protection of congenitally athymic mice by passive antibody transfert*. J. Parasitol. 66:673

KIERSZENBAUM F (1982). *Immunological deficiency during experimental Chagas'disease (Trypanosma cruzi infection): role of adherent, nonspecific esterase-positive splenic cells*. J. Immunol. 129:2202

KIERSZENBAUM F (1986). *Autoimmunity in Chagas' disease*. J. Parasitol. 72:201

KIERSZENBAUM F, CUNA WR, BELTZ LA & SZTEIN MB (1989). *Trypanosoma cruzi reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components*. J. Immunol. 143:275

KIERSZENBAUM F & HOWARD JG (1976). *Mecanism of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice*. J. Immunol. 116:1208

KIERSZENBAUM F & SONNENFELD G (1984). *Beta-interferon inhibits cell infection by Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 132:905

KIPNIS TL, JAMES SL, SHER A & DAVID JR (1981). *Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi.II. Antibody-dependant killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 30:47

KIRCHOFF LV (1987). Am. J. Med. 82:915

KÖBERLE F (1968). *Chagas'disease and Chagas' syndromes: the pathology of American Trypanosomiasis*. Advanc. Parasitol. 6:63

KOOY RF, ASHALL F, VAN der PLOEG M & P.J. O (1989). *On the DNA*

content of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 36:73

KRAUTH-SIEGEL L, ENDERS B, HENDERSON GB, FAIRLAMB AH & SCHIRMER RH (1987). *Trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi: purification and characterization of the crystalline enzyme*. J. Biochem. 164:123

KRETTLI AU & BRENER Z (1976). *Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections*. J. Immunol. 116:755

KRETTLI AU, CANCADO JR & BRENER Z (1984). *Criterion of cure human Chagas' disease after specific chemotherapy: recent advances*. Mem. Inst. Osw. Cruz. 79:157

KRETTLI AU & PONTES DE CARVALHO LC (1985). *Binding of C3 fragments to the Trypanosoma cruzi surface in the absence of specific antibodies and without activation of the complement cascade*. Clin. Exp. Immunol. 62:270

KRETTLI AV & BRENER Z (1982). *Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibody in Chagas's disease*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:334

KRIEGER MA, SALLES JM, ALMEIDA E, LINSS J, BONALDO MC & GLODENBERG S (1990). *Expression and polymorphism of a Trypanosoma cruzi gene encoding a cytoplasmic repetitive antigen*. Exp. Parasitol. 70:247

KUHN RE & MURNANE JE (1977). *Trypanosoma cruzi: immune destruction of parasitized mouse fibroblasts in vitro*. Exp. Parasitol. 41:66

KURIYAN J, WONG L, GUENTHER BD, MURGOLO NJ, CERAMI A & HENDERSON GB (1990). *Preliminary crystallographic analysis of*

- trypanothione-reductase from Crithidia fasciculata*. J. Mol. Biol. **215**:335
- LAFAILLE JJ, LINSS J, KRIEGER MA, SOUTO-PADRON T, de SOUZA W & GOLDENBERG S (1989). *Structure and expression of two Trypanosoma cruzi genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes*. Mol. Biochem. Parasitol. **35**:127
- LAGUENS RP, MECKERT PC, CHAMBO G & GELPI RJ (1981). *Chronic Chagas'disease in the mouse.-II. Transfert of the heart disease by means of immunocompetent cells*. Medicina **41**:40
- LANAR DE, LEVY LS & MANNING JE (1981). *Complexity and content of the DNA and RNA in Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parsitol. **3**:327
- LEMESRE JL, AFCHAIN D, OROZCO O, LOYENS M, BRENIERE FS, DESJEUX P, CARLIER Y, MARTIN U, NOGUEIRA-QUEIROZ A, 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
- LEVIN MJ, MESRI E, BENAROUS R, LEVITUS G, SCHIJMAN A, LEVY-YEYATI P, CHIALE PA, RUIZ AM, KAHN A, ROSENBAUM MB, TORRES HN & SEGURA EL (1989). *Identification of major Trypanosoma cruzi antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **41**:530
- LEVINE ND, CORLISS JO, COX FEG, DEROUX G, GRAIN J, HONIBERG BM, LEEDALE GF, LOEBLICH AR, LOM J, LYNN D, MERINFELD EG, PAGE FC, POLJANSKY G, SPRAGUE V, VAVRA J & WALLACE FG (1980). *A newly revised classification of the Protozoa*. J. Protozool.

27:37

- LEY V, ANDREWS NW, ROBBINS ES & NUSSENZWEIG V (1988). *Amastigotes of Trypanosoma cruzi sustain an infection cycle in mammalian cells*. J. Exp. Med. **168**:649
- LIBBY P, ALROY J & PEIRERA MEA (1986). *A neuraminidase from Trypanosoma cruzi removes sialic acid from the surface of mammalian and endothelial cells*. J. Clin. Invest. **77**:127
- LIEW FY (1988). *Immune suppressor substance in experimental Chagas'disease*. Parasitol. Today. **4**:355
- LIMA-MARTINS MVC, SANCHEZ GA, KRETTLI AU & BRENER Z (1985). *Antibody-dependant cell cytotoxicity against Trypanosoma cruzi is only mediated by protective antibodies*. Parasite Immunol. **7**:367
- LIZARDI P, LERNER TJ, GONZALEZ A & NOGUEIRA N (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
- LOCKSLEY RM & SCOTT P (1991). *Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function*. Parasitol. Today. **7**:A58
- MacHARDY N (1977). *Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum*. Tropenmed. Paras. **28**:195
- MAESSEN GDF, AMONS R, MAESSEN JA & MOELLER W (1986). *Primary structure of elongation factor 1-beta- from Artemia*. FEBS Lett. **208**:77
- MALEKAR JR & KIERSZENBAUM F (1983). *Inhibition of mitogen induced*

- proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 130:908*
- MANNING JE & PETERSON D (1987). *Identification of the 85 KDA surface antigen as a member of a multigen family. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 82:229*
- MARR JJ & DOCAMPO R (1986). *Chemotherapy of Chagas'disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. Rev. Inf. Diseases. 8:884*
- MARTIN UO, AFCHAIN D, CESBRON JY, ARIAS E & CAPRON A (1986). *Immunoglobulina E y enfermedad de Chagas. Medicina 46:262*
- MARTIN UO, TAIBI A, LOYENS M, MAIDANA C, CORNETTE J, CANDOITI C, MARTELEUR A, AFCHAIN D, MARTY B, VELGE P, OAISSI MA & CAPRON A (1990). *Trypanosoma cruzi: IgM antibodies to an 84 kDa polypeptide epitope as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. Med. Sci. Res. 18:725*
- MARTINS MS, HUDSON L, KRETTLI AU, CANCADOS JR & BRENER Z (1985). *Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol. 61:343*
- MATTEI DM, GLODENBERG S, MOREL C, AZEVEDO HP & ROITMAN I (1977). *Biochemical strain characterization of Trypanosma cruzi by restriction endonuclease cleavage of kinetoplast DNA. Febs. Lett. 74:264*
- McCABE RE & MULLINS BT (1990). *Failure of Trypanosoma cruzi to trigger the respiratory burst of activated macrophages. J. Immunol. 144:2384*
- McCARTHY-BURKE C, TAYLOR ZA & BUCK AG (1989). *Characterization*

of the spliced leader genes and transcripts in Trypanosoma cruzi. Gene
82:177

MEISTER A (1981). *Metabolism and fonctions of glutathione. TIBS* 6:231

MEISTER A (1983). *Metabolism and transport of glutathione and other gamma-glutamyl compounds/ In: Fonctions of glutathione (Edited by Larsson, A., Orrenius, S., Holmgren, A., Mannervik, B.). Raven Press, NY.:1*

MINOPRIO P (1991). *Chagas'disease: CD5 B-cell-dependent Th2 pathology? Research in Immunol.* 142:137

MINOPRIO P, BANDEIRA A, PEREIRA P, MOTA SANTOS T & COUTINHO A (1989). *Preferential expansion of Ly-1B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. Intern. Immunol.* 1:176

MINOPRIO P, COUTINHO A, JOSKOWICZ M, D'IMPERIO LIMA MR & EISEN (1986a). *Polyclonal lymphocyte response to T. cruzi infection.-II. Cytotoxic T lymphocytes. Scand. J. Immunol* 24:669

MINOPRIO P, EISEN H, FORNI L, D'IMPERIO LIMA MR, JOSKOWICZ M & COUTINHO A (1986b). *Polyclonal lymphocyte responses to murine Trypanosoma cruzi infection. I- Quantitation of both T- and B-cell responses. Scand. J. Immunol.* 24:661

MINOPRIO P, EISEN H, JOSKOWICZ M, PEREIRA P & COUTINHO A (1987). *Suppression of polyclonal antibody production in Trypanosoma cruzi-infected mice with anti-L3T4 antibodies. J. Immunol.* 139:545

MITCHELL G (1989). *Glutathione S-transferases: potential components of anti-schistosome vaccines? Parasitol. today.* 5:34

- MONCADA C (1987). *Gamma glutamiltranspeptidasa, glutation S-transferasa y contenido de glutation en diversas cepas de Trypanosoma cruzi*. Thesis, Facultad de Ciencias Quimicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile, Santigao, Chile.
- MOREL C, CHIARI E, PLESSMANN CAMARGO E, MATTEI DM, ROMANHA AJ & SIMPSON L (1980). *Strains and clones of Trypanosoma cruzi can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:6810
- MORELLO A, REPETTO Y & ATIAS A (1982). *Characterization of glutathione S-transferase activity in Echinococcus granulosus*. Biochem. & Physiol. 72:44
- MORRISON WI, ROELANTS GE, MAYOR-WITHEY KS & MURRAY M (1978). *Susceptibility of inbred strains of mice to Trypanosoma congolense: correlation with changes in spleen lymphocytes populations*. Clin. Exp. Immunol. 35:25
- MOSMANN T & COFFMAN R (1989). *Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functionnal properties*. Ann. Rev. Immunol. 7:145
- MOSMANN TH & MOORE KW (1991). *The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses* Parasitol. Today 7:A49
- NATHAN C, NOGUEIRA N, JUANGBHANICH C, ELLIS J & COHN D (1979). *Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of Trypanosoma cruzi*. J. Exp. Med. 149:1056
- NICHOLSON-WELLER A, BURGE J, FEARON DT, WELLER PF &

- AUSTEN KF (1982). *Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertase of the complement system.* J. Immunol. **129**:184
- NOGUEIRA N & COHN ZM (1978). *Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity.* J. Exp. Med. **148**:288
- NOGUEIRA N, ELLIS J, CHAPLAN S & COHN Z (1981). *Trypanosoma cruzi: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice.* Exp. Parasitol. **51**:325
- O'DALY JA, SIMONIS S, De ROLO N & CABALLERO H (1984). *Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental Trypanosoma cruzi infections.* Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. **26**:67
- OKABE K, KIPNIS TL, CALICH VLG & DIAS SA SILVA W (1980). *Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. I. Antibody dependant cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms.* Clin. Immunol. Immunopathol. **46**:344
- OPPERDOES FR & BORST P (1977). *Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: the glycosome.* Febs. Lett **80**:360
- OPPERDOES FR, MISSET O & HART DT (1984). *Metabolic pathways associated with the glycosomes (microbodies) of the Trypanosomatidae.* In: August JT, ed. Molecular parasitology. N.Y.: Academic Press. 63
- OROZCO O, AFCHAIN D, RODRIGUEZ C, OVLAQUE G, LOYENS M & CAPRON A (1982). *Production d'un anticorps monoclonal anti-antigène 5 de Trypanosoma cruzi.* C.R. Acad. Sc. Paris. Série III **295**:723
- ORTEGA-BARRIA E & PEREIRA MEA (1991). *A novel T. cruzi*

- heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell 67:411*
- OUAISSI A, AGUIRRE T, PLUMAS-MARTY B, PIRAS M, SCHÖNECK R, GRAS-MASSE H, TAIBI A, LOYENS M, TARTAR A, CAPRON A & PIRAS R *Cloning and sequencing of a 24 kDa Trypanosoma cruzi specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. Biol. of the Cell. sous presse.*
- OUAISSI A, CORNETTE J, PLUMAS-MARTY B, TAIBI A, VELGE P, SCHONECK R & CAPRON A (1991). *Molecular aspects of Trypanosoma cruzi interaction with host cell and parasite differentiation mechanisms. Trypanosomiasis seminar, Antwerpen, Belgium. 34*
- OUAISSI MA, AFCHAIN D, CAPRON A & GRIMAUD JA (1984). *Fibronectin receptor on Trypanosoma cruzi trypomastigotes and their biological functions. Nature 308:380*
- OUAISSI MA, CORNETTE J & CAPRON A (1986). *Isolation and functional characterization of Trypanosoma cruzi trypomastigotes fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol. 19:201*
- OUAISSI MA, CORNETTE J, VELGE P & CAPRON A (1988). *Identification of anti-acetylcholinesterase and anti-idiotypic antibodies in human and experimental Chagas's disease: pathological implications Eur. J. Immunol. 18:1889*
- OUAISSI MA, DUBREMETZ JF, KUSNIERZ JP, CORNETTE J, LOYENS M, TAIBI A, MARTY B, VELGE P, RIZVI F & CAPRON A (1990a). *Trypanosoma cruzi: differential expression and distribution of an 85-kDa polypeptide epitope by in vitro developmental stages. Exp. Parasitol. 71:207*

- OUAISSI MA, TAIBI A, CORNETTE J, VELGE P, MARTY B, LOYENS M, ESTEVA M, RIZVI FS & CAPRON A (1990b). *Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of Trypanosoma cruzi trypomastigotes and identification of a protective antigen*. Parasitology **100**:115
- PACKCHANIAN A (1957). *Chemotherapy of experimental Chagas'disease with nitrofurans compounds*. Antibio. Chemother. **7**:13
- PALMIERI JR, LA CHANCE MA & CONNER DH (1984). *Parasitic infection of peripheral nervous system*. In: Dyck P.J., Thomas, P.K., Lambert, E.H. Bunge, R., eds. Peripheral Neuropathy, vol. 2. Philadelphia:Saunders. 1988
- PAN SC (1978). *Trypanosoma cruzi: intracellular stages grown in cell-free medium at 37°C*. Exp. Parasitol. **45**:215
- PARANHOS GS, COTRIM PC, MORTARA RA, RASSI A, CORRAL R, FREILIJ HL, GRINSTEIN S, WANDERLEY J, CAMARGO ME & DA SILVEIRA JF (1990). *Trypanosoma cruzi: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera*. Exp. Parasitol. **71**:284
- PARNES JR (1989). *Molecular biology and function of CD4 and CD8*. Ad. Immunol. **44**:265
- PAYS E & STEINERT M (1980). *Control of gene expression in African trypanosomes*. Ann. Rev. Genet. **22**:107
- PEARCE EJ, JAMES SL, HIENY S, LANR DE & SHER A (1983). *Induction of protective immunity against Schistosoma mansoni by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non surface parasite antigen*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**:481

- PEMBERTON KD & BARRETT J (1989). *The detoxification of xenobiotics compounds by Onchocerca giutturosa (Nematoda: Filaroidea)* Int. J. Parasitol. **sous presse**:
- PENIN P, DE DIEGO J, DEL REY J, MAYER R & GAMALLO C (1990). *Acute chagasic cardiopathy produced by a strain of Trypanosoma cruzi (type I) in an experimental model.* Ann. Parasitol. Hum. Comp. **65**:208
- PEREIRA MEA (1983a). *A developmentally regulated neuraminidase activity in Trypanosoma cruzi.* Science **219**:1444
- PEREIRA MEA, ANDRADE AFB & RIBEIRO JMC (1981). *Lectins of distinct specificity in Rhodnius prolixus interact selectively with Trypanosoma cruzi.* Science **211**:
- PESTEL J, DEFOORT JP, GRASS-MASSE H, AFCHAIN D, CAPRON A, TARTAR A & OUAISSI A (1992). *Polyclonal cell activity of a repeat peptide derived from the sequence of an 85 kilodalton surface protein of Trypanosoma cruzi trypomastigotes.* Inf. & Immun. **60**:
- PETERSON DS, FOUTS DL & MANNING JE (1989). *The 85- kd surface antigen gene of Trypanosoma cruzi is telomeric and a member of a multigene family.* Embo. J **8**:3911
- PETERSON DS, WRIGHTSMAN RA & MANNIG JE (1986). *Cloning of a major surface-antigen gene of Trypanosoma cruzi and identification of a nonapeptide repeat.* Nature **322**:566
- PETRY K & EISEN H (1989). *Chagas'disease: a model for the study of autoimmune disease.* Parasitol. today. **5**:111

- PETRY K, NUDELMAN E, EISEN H & HAKIMORI S (1988). *Sulfated lipids represent common antigens on the surface of Trypanosoma cruzi and mammalian tissues*. Mol. Biochem. Parasitol. **30**:113
- PETRY K, VOISON P, BALTZ T & LABOUESSE J (1987). *Epitopes common to trypanosomes (T. cruzi, T. dionisii, and T. vespertilionis [Schizotrypanum]): astrocytes and neurons*. J. Neuroimmunol. **16**:237
- PETRY K & VAN WOORHIS WC (1991). *Antigens of Trypanosoma cruzi that mimic mammalian nervous tissues: investigation of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas'disease*. Research in Immunol. **142**:151
- PIRAS MM, PIRAS R & HENRIQUEZ D (1982). *Changes in morphology and infectivity of cell culture derived trypomastigotes of Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **6**:67
- PLATA F, GARCIA PONS F & EISEN H (1984). *Antigenic polymorphism of Trypanosoma cruzi: clonal analysis of trypomastigote surface antigens*. Eur. J. Immunol. **14**:392
- PLATA F, GARCIA-PONS F & WIETZERBIN J (1987). *Immune resistance to Trypanosoma cruzi: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo*. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. **138**:397
- POLLEVICK GD, AFFRANCHINO JL, FRASCH ACC & SANCHEZ DO (1991). *The complete sequence of a shed acute-phase antigen of Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **47**:247
- READY PD & MILES MA (1979). *Delimitation of Trypanosoma cruzi zymodemes by numerical taxonomy*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **74**:238

- REED SG (1980). *Adoptive transfert of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells*. *Inf. & Immun.* **28**:404
- REED SG (1988). *In vivo administration of recombinant IFNg induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental Trypanosoma cruzi infections*. *J. Immunol.* **140**:4342
- REED SG, NATHAN CF, PIHL DL, RODRICKS P, SHANEBECK K, CONLON PJ & GRABSTEIN KH (1987). *Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit Trypanosoma cruzi and release hydrogen peroxide*. *J. Exp. Med* **166**:1734
- REED SG, PIHL DL & GRABSTEIN KH (1989). *Immune deficiency in chronic Trypanosoma cruzi infection. Recombinant IL-1 restores Th fonction for antibody production*. *J. Immunol.* **142**:2067
- REINEMER P, DIRR HW, LADENSTEIN R, SCHAFFER J, GALLAY O & HUBER R (1991). *The three-dimensional structure of class pi glutathione-S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 A° resolution*. *The EMBO J.* **10**:1997
- REINER NE & FINKE JH (1983). *Interleukin 2 deficiency in murine leishmaniasis donovani and it's relationship to depressed spleen cell reponses to phytohemagglutinin*. *J. Immunol.* **131**:1487
- REPETTO Y, LETELIER ME, ALDUNATE J & MORELLO A (1987). *The gamma glutamyl transpeptidase of Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **87 B**:73
- REQUENA JM, LOPEZ MC, JIMENEZ-RUIZ A, de la TORRE JC & ALONSO C (1988). *A head-to-tail- tandem organization of hsp70 genes in*

- Trypanosoma cruzi*. Nucleic. Acids. Res **16**:1393
- REQUENA JM, LOPEZ MC, JIMENEZ-RUIZ A, MORALES G & ALONSO C (1989). *Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of T. cruzi*. Nucleic. Acids. Res **17**:797
- REYES MB, LORCA M, MUNOZ P & FRASCH AA (1990). *Fetal IgG specificities against Trypanosoma cruzi antigens in infected newborns*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **87**:2846
- RIBEIRO DOS SANTOS R & HUDSON L (1980). *Trypanosoma cruzi: binding of parasite antigens to mammalian cell membranes*. Parasite Immunol. **2**:1
- RIBEIRO DOS SANTOS R, MARQUEZ JO & VON GAL FURTADO CC (1979). *Antibodies against neurones in chronic Chagas'disease*. Tropenmed. Parasit. **30**:19
- RIDEL PR, AURIAULT C, DARCY F, PIERCE RJ, LEITE P, SANTORO F, NEYRINC JL, KUSNIERZ JP & CAPRON A (1988). *Protective role of IgE in uncompromized rat toxoplasmosis*. J. Immunol. **141**:978
- RIIS B, RATTAN SIS, CLARK BFC & MERRICK WC (1990). *Eukaryotic protein elongation factors*. TIBS **15**:
- RIMOLDI MT, SHER A, HIENY S, LITUCHY A, HAMMER C & JOINER K (1988). *Developmentally regulated expression by Trypanosoma cruzi of molecules that accelerate the decay of complement C3 convertase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**:193
- RITTER DM & KUHN RE (1990). *Antigen-specific T-helper cells abrogate suppression in Trypanosoma cruzi-infected mice*. Inf. & Immun. **58**:3248
- ROBERSON EL & HANSON WL (1974). *Transfert of immunity to Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. **68**:338

- ROITT I, BROSTOFF J & MALE D (1985). *Immunologie fondamentale et appliquée*. MEDSI eds.
- ROTTENBERG ME, CARDONI RL, TITTO EH, MORENO M & SEGURA EL (1988). *Trypanosoma cruzi: immune response in mice immunized with parasite antigens*. *Exp. Parasitol.* **65**:101
- ROWLAND EC & MASTERS EA (1987). *Trypanosoma cruzi specific antibody response in immunized C3H (HE) mice during infection*. *Int. J. Parasitol.* **17**:1125
- RUIZ A, ESTEVA M, CABEZA MECKERT P, LAGUENS RP & SEGURA E (1985). *Protective immunity and pathology induced by inoculation with different subcellular fractions of Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* **42**:299
- RUIZ AM, ESTEVA M, RIARTE A, SUBIAS E & SEGURA EL (1986a). *Immunoprotection of mice against Trypanosoma cruzi with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant*. *Immunol. Lett* **12**:1
- RUIZ AM, ESTEVA M, SUBIAS E, MORENO M, ROSENSTEIN de CAMPANINI A, VELAZQUEZ E & SEGURA EL (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
- SAID G, JOSKOWICZ M, BARREIRA AA & EISEN H (1985). *Neuropathy associated with experimental Chagas' disease*. *Ann. Neurol.* **18**:676

- SANDERSON CJ, LOPEZ AF & BUNN MORENO MM (1977). *Eosinophils and not lymphoid K cells kill Trypanosoma cruzi epimastigotes*. Nature **268**:340
- SANTOS-BUCH CA & TEIXEIRA ARL (1974). *The immunology of experimental Chagas'disease.III. Rejection of allogenic heart cells in vitro*. J. Exp. Med **140**:38
- SCHARFSTEIN J, LUQUETTI A, MURTA ACM, SENNA M, REZENDE JM, RASSI A & MENDOCA-PREVIATO L (1985). *Chagas'disease: serodiagnostic with purified Gp 25 antigen*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **34**:1153
- SCHIJMAN AG, DUSETTI NJ, VASQUEZ MP, LAFON S, LEVY-YEYATI P & LEVIN MJ (1990). *Nucleotide cDNA and complete deduced amino acid sequence of a Trypanosoma cruzi ribosomal P protein (P-JL5)* Nucleic. Acids. Res. **18**:3399
- SCHMUNIS GA, GONZALEZ-CAPPA SM, TRAVERSA OC & YANOVSKY IF (1991). *The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with Trypanosoma cruzi*. Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. **65**:89
- SCHOFIELD CJ (1985). *Control of Chagas'disease vectors*. Br. Med. Bull. **41**:187
- SCHREZENMEIER H & FLEISCHER B (1988). *A regulatory role for the CD4 and CD8 molecules in T cell activation*. J. Immunol. **141**:398
- SCOTT MT (1981). *The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection*. Parasite Immunol. **3**:209
- SCOTT MT & SNARY D (1979). *Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein form Trypanosoma cruzi*. Nature **282**:73
- SEGURA EL, BUA J, ROSENSTEIN DE CAMPANINI A, SUBIAS E,

- ESTEVA M, MORENO M & RUIZ AM (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 EL, VALQUEZ C, BRONZINA A, CAMPOS JM, CERISOLA JA & GONZALEZ CAPPA SM (1977). *Antigens of the subcellular fractions of Trypanosoma cruzi. II. Flagellar and membrane fraction*. J. Protozool. **24**:540
- SERRANO LE & O'DALY JA (1987). *Protein fraction from Trypanosoma cruzi infected spleen cells supernatants with immunosuppressive activity in vitro*. Int. J. Parasitol. **17**:851
- SEXTON JL, MILNER AR, PANACCIO M, WADDINGTON J, WIJFFELS G, CHANDLER D, THOMPSON C, WILSON L, SPITHILL TW, MITCHELL GF & CAMPBELL NJ (1990). *Glutathione S-transferase. A novel vaccine against Fasciola hepatica infection in sheep*. J. Immunol. **145**:3905
- SHAMES SL, FAIRLAM AH, CERAMI A & WALSH CT (1986). *Purification and characterization of trypanothione reductase from Crithidia fasciculata: a new member of the family of disulfide-containing flavoprotein reductases*. Biochemistry **25**:3519
- SHER A, HIENY S & JOINER K (1986). *Evasion of the alternative complement pathway by metacyclic trypomastigotes of Trypanosoma cruzi: dependence on the developmentally regulated synthesis of surface protein and N-linked carbohydrate*. J. Immunol **137**:2961
- SMITH DB, DAVERN KM, BOARD PG, TIU WU, GARCIA EG & MITCHELL GF (1986). *Mr 26,000 antigen of Schistosoma japonicum*

recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 83:8703

SMITH KA (1980). *T-cell growth factor*. Immunol. Rev. 51:337

SNARY D (1983). *Cell surface glycoproteins of Trypanosoma cruzi: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77:126

SNARY D, FERGUSON MAJ, SCOTT MT & ALLEN AK (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, FLINT JE, WOOD JN, SCOTT MT, CHAPMAN MD, DODD J, JESSEL TM & MILES MA (1983). *A monoclonal antibody with specificity for Trypanosoma cruzi, central and peripheral neurones and glia*. Clin. Exp. Immunol. 54:617

SNARY D & HUDSON L (1979). *Trypanosoma cruzi cell surface proteins: identification of one major glycoprotein*. Febs. Lett. 100:166

SNARY D & SCOTT MT (1980). *A cell surface glycoprotein from Trypanosoma cruzi capable of inducing protective immunity*. In: The Host Invader Interplay, Van den Bossche, H; (Editor), Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press. 253

SOUTO-PADRON T, HARTH G & de SOUZA W (1990). *Immunocytochemical localisation of neuraminidase of Trypanosoma cruzi*. Inf. and Immunity 58:586

SPINELLA S, LIEGEARD P, GUILBERT B & M. H-J (1989). *Anti-Ia*

- treatment modulates specific and polyclonal antibody responses in Trypanosoma cruzi-infected mice. J. Autoimmun. 2:791*
- SPINELLA S, MILON G & HONTBEYRIE-JOSKOWICZ M (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*
- STUART K (1983). Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol. Biochem. Parasitol. 9:93*
- SULLIVAN FX & WALSH CT (1991). Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol. 44:145*
- SWINDLE J, AJIOKA J, EISEN H, SANWAL B, JAQUEMOT C, BROWDER Z & BUCK G (1988). The genomic organization and transcription of the ubiquitin genes of *Trypanosoma cruzi*. *Embo. J. 7:1121*
- SZTEIN MB, CUNA WR & KIERSZENBAUM F (1990). *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL2-R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol. 144:3558*
- TAFURI WL (1979). Pathogenesis of *Trypanosoma cruzi* infections. in "Biology of Kinetoplastida" (W.H.R., Lumsden & D.A. Evans) 2 Academic Press, London, N.Y. 547
- TAKEHARA HA, PERINI A, DA SILVA MH & MOTA I (1981). *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol. 52:137*
- TAKLE GB & CROSS GAM (1991). An 85-kilodalton surface gene family of *Trypanosoma cruzi* encodes polypeptides homologous to bacterial neuraminidases. *Mol. Biochem. Parasitol. 48:185*

- TAKLE GB, YOUNG A, SNARY D, HUDSON L & NICHOLLS SC (1989). *Cloning and expression of a trypomastigote-specific 85- kilodalton surface antigen gene of Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. **37**:57
- TALIAFERRO WH & PIZZI T (1955). *Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of Trypanosoma cruzi*. J. Inf. Dis. **96**:199
- TAMBOURGI DV, KIPNIS TL & DA SILVA WD (1989). *Trypanosoma cruzi: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells*. Exp. Parasitol. **68**:192
- TARLETON RL (1988). *Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells*. J. Immunol. **140**:2769
- TARLETON RL (1991). *The role of T-cell subpopulation in experimental Chagas' disease*. Research in Immunol. **142**:130
- TARLETON RL & KUHN RE (1984). *Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with Trypanosoma cruzi by supernatants containing interleukin 2*. J. Immunol. **133**:1570
- TARLETON RL & SCOTT DW (1987). *Initial induction of immunity, followed by suppression of responses to parasite antigens during Trypanosoma cruzi infection of mice*. Parasite Immunol. **8**:579
- TAYLOR JB, VIDAL A, TORPIER G, MEYER DJ, ROITSCH C, BALLOUL JM, SOUTHAN C, SONDERMEYER P, PEMBLE S, LECOCQ JP, CAPRON A & KETTERER B (1988). *The glutathione transferase activity and tissue distribution of Schistosoma mansoni* EMBO J. **7**:465

- TEIXEIRA ARL, TEIXEIRA G, MACEDO V & PRATA A (1978). *Trypanosoma cruzi*-sensitized T-lymphocyte mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:1097
- THERTULIEN R, HARTH G & HAIDARIS CG (1991). Evidence that the entire length of a kinetoplast DNA minicircle is transcribed in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Microbiol.* **5**:207
- TIBAYRENC M, KJELLBERG F & AYALA F (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **37**:2414
- TOWBIN H, ROSENFELDER G, WIESLANDER J, AVILA JL, ROJAS M, SZARFMAN A, ESSER K, NOWACK H & TIMPL R (1987). Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas' disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(α 1-3)-galactose epitopes. *J. Exp. Med.* **166**:419
- TRISCHMANN TM (1980). *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell-enriched and depleted lymphocyte populations to passively protect mice. *Exp. Parasitol.* **49**:225
- TRISCHMANN TM (1983). Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* **130**:1953
- TRISCHMANN TM (1984). Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Parasite Immunol.* **6**:561
- TRISCHMANN TM & BLOOM BR (1982). Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Inf. & Immun.* **35**:546

- TROTTEIN F, KIENY MP, VERWAERDE C, TORPIER G, PIERCE RJ, BALLOUL JM, SCHMITT D, LECOCQ JP & CAPRON A (1990). *Molecular cloning and tissue distribution of the 26 kDa Schistosoma mansoni glutathione S-transferase*. Mol. Biochem. Parasitol. **41**:35
- UCHIYAMA T, BRODER S & WALDMAN TA (1981). *A monoclonal antibody (anti-Tac) reactive with activated and functionally mature human T cells. I. Production of anti-Tac monoclonal antibody and distribution of Tac (+) cells*. J. Immunol. **126**:1393
- van DAMME HTF, AMONS R, KARSSIES R, TIMMERS CJ, JANSSEN GMC & MOELLER W (1990). *Elongation factor 1-beta in Artemia: localization of functional sites and homology to elongation factor 1-delta*. Biochem. Biophys. Acta. **1050**:241
- VAN WOORHIS WC & EISEN H (1989). *Fl-160: a surface antigen from Trypanosoma cruzi that mimics mammalian nervous tissue*. J. Exp. Med. **169**:641
- VELGE P, KUSNIERZ JP, OUAISSI A, MARTY B, PHAM BN & CAPRON A (1991). *Trypanosoma cruzi: infection of T lymphocytes and their destruction by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*. Eur. J. Immunol. **21**:2145
- VELGE P, OUAISSI MA, CORNETTE J, AFCHAIN D & CAPRON A (1988). *Identification and isolation of Trypanosoma cruzi trypomastigotes collagen-binding proteins: possible role in cell-parasite interaction*. Parasitology **97**:255
- VERWAERDE C, JOSEPH M, CAPRON M, PIERCE R, DAMONNEVILLE M, VELGE F, AURIAULT C & CAPRON A (1987). *Functional properties of*

- a rat monoclonal IgE antibody specific for Schistosoma mansoni*. J. Immunol. **138**:4441
- VON der KRAMER H, KLAUDINY J, ZIMMER M & SCHEIT KH (1991). *Human elongation factor 1beta:cDNA and derived amino acid sequence*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **177**:312
- VRAY B, DE BAETSELIER P, OUAISSI A & CARLIER Y (1991). *Trypanosoma cruzi but not Trypanosoma brucei fails to induce a chemiluminescent signal in a macrophage hybridoma cell line*. Inf. & Immunity. **59**:3303
- WARREN HS, VOGEL FR & CHEDID LA (1986). *Current status of immunological adjuvants*. Ann. Rev. Immunol. **4**:369
- WEISSMAN AM, HARFORD JB, SVETLIK PB, LEONARD WL, DEPPER JM, WALDMANN TA, GREENE WC & KLAUSNER RD (1986). *Only high-affinity receptors for interleukin 2 mediate internalization of ligand*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83**:1463
- WILLIAMS DM, SAWYER S & REMINGTON JJ (1976). *Role of activated macrophages in resistance of mice to infection with Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. **134**:160
- WIRTH JJ, KIERSZENBAUM F, SONNENFELD G & ZLOTNIK A (1985). *Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of Trypanosoma cruzi*. Inf. & Immunity. **49**:61
- WONG RL, RUDDLE NH, PADULA SJ, LINGENHELD EG, BERGMAN CM, RUGEN RV, EPSTEIN DI & CLARK RB (1988). *Subtypes of helper cells. Non inflammatory type 1 helper T cells*. J. Immunol. **141**:3329
- WOOD JN, HUDSON L, JESSEL TM & YAMAMOTO M (1982). A

monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and Trypanosoma cruzi parasites. Nature (Lond.) 296:34

WRIGHTSMAN R, KRASSNER S & WATSON J (1982). *Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Inf. & Immun. 36:637*

YAWETZ A & AGOSIN M (1979). *Epoxide hydrase in Trypanosoma cruzi epimastigotes. Biochem. Biophys. Acta 585:210*

YAWETZ A & AGOSIN M (1981). *Purification of the glutathione-S-transferase of Trypanosoma cruzi. Comp. Biochem. Physiol. 68 B:237*

YOSHIDA N (1986). *Trypanosoma cruzi: recognition of trypomastigotes surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. Exp. Parasitol. 61:184*

FIGURES

FIGURES de la PARTIE "GENERALITES".

- Fig. 1** Extraits de la publication de Carlos Chagas en 1909.
- Fig. 2** Le cycle évolutif, la transmission et l'épidémiologie de la maladie de Chagas.
- Fig. 3** Les données épidémiologiques.
- Fig. 4** *Trypanosoma cruzi*: amastigote et épimastigote (microscopie électronique).
- Fig. 5** La différenciation de *Trypanosoma cruzi*.
- Fig. 6** Le métabolisme du glutathion.
- Fig. 7** Le métabolisme et les fonctions du glutathion.
- Fig. 8** Le métabolisme du trypanothion.
- Fig. 9** La biosynthèse du trypanothion.
- Fig. 10** Réactions catalysées par les glutathion S-transférases.
- Fig. 11** Principales GSTs parasitaires.
- Fig. 12** Les caractéristiques originales de l'expression des gènes nucléaires chez les trypanosomatidés.
- Fig. 13** Les antigènes de *Trypanosoma cruzi* clonés et séquencés.
- Fig. 14** Relations entre l'activité des cellules T, la production d'anticorps, la parasitémie et la pathogénie dans l'infection par *Trypanosoma cruzi*.
- Fig. 15** *Trypanosoma cruzi*: hypothèse d'une maladie auto-immune.

**TABLE
DES
MATIÈRES**

262

TABLE DES MATIERES

RESUME	P.14
ABREVIATIONS	P.16
GENERALITES	P.18
INTRODUCTION	P.19
<u>1. PRESENTATION de la MALADIE</u>	<u>P.22</u>
<u>A. Historique</u>	<u>P.22</u>
<u>B. Agent de la maladie.</u>	<u>P.22</u>
<u>C. Transmission de la maladie.</u>	<u>P.22</u>
<u>D. Récentes données épidémiologiques.</u>	<u>P.27</u>
<u>E. Déroulement de la maladie de Chagas</u>	<u>P.27</u>
a. Anatomie pathologique.	P.29
b. Pathogénie.	P.30
c. Etude clinique.	P.31
c. 1: Phase aiguë.	P.31
c. 2: Phase chronique.	P.32
c. 2 . 1 : Forme cardiaque.	P.32
c. 2. 2 : Forme digestive.	P.32
c. 2. 3 : Autres formes.	P.34
d. Diagnostic.	P.34
e. Evolution et le pronostic.	P.35

<i>f. Traitement.</i>	<u>P.35</u>
<u><i>F. Existence de nombreuses souches parasitaires.</i></u>	<u>P.36</u>
<u><i>G. Prophylaxie .</i></u>	<u>P.37</u>
<u>2. BIOLOGIE CELLULAIRE DU PARASITE.</u>	<u>P.38</u>
<u><i>A. Différentes formes.</i></u>	<u>P.39</u>
<i>a. Morphologie.</i>	P.39
<i>b. Cycle.</i>	P.41
<i>c. Beaucoup d'aspects du cycle sont incompris</i>	P.42
<u><i>B. Organelles cytoplasmiques.</i></u>	<u>P.47</u>
<u><i>C. Voies métaboliques originales.</i></u>	<u>P.49</u>
<u><i>D. Biologie moléculaire</i></u>	<u>P.61</u>
<i>a. Etude du génome.</i>	P.61
<i>b. Caractéristiques originales de l'expression des gènes nucléaires.</i>	P.63
<i>c. Antigènes clonés.</i>	P.63
<u>3.IMMUNOLOGIE DE LA MALADIE DE CHAGAS.</u>	<u>P.67</u>
<u><i>A. Modèles expérimentaux.</i></u>	<u>P.68</u>
<u><i>B. Résistance naturelle.</i></u>	<u>P.68</u>
<i>a. Chez les différentes espèces.</i>	P.69
<i>b. Bases génétiques de la résistance naturelle chez la souris.</i>	P. 70

<u>C. Résistance durant la phase aiguë.</u>	<u>P.70</u>
<i>a. Populations lymphocytaires.</i>	<i>P.71</i>
<i>a.1. Premières mises en évidence</i>	<i>P.71</i>
<i>de la contribution des lymphocytes.</i>	
<i>a.2. Populations lymphocytaires B et T.</i>	<i>P.72</i>
<i>a.3. Sous-populations lymphocytaires T.</i>	<i>P.73</i>
<i>b. Anticorps.</i>	<i>P.74</i>
<i>b.1 Induction de la réponse humorale.</i>	<i>P.74</i>
<i>b.2 Rôle des anticorps.</i>	<i>P.76</i>
<i>c. Phagocytes mononucléés.</i>	<i>P.76</i>
<i>c.1. Macrophages activés.</i>	<i>P.76</i>
<i>c.2. Lymphokines</i>	<i>P.78</i>
<i>c.3 Mécanismes de destruction</i>	<i>P.78</i>
<i>intracellulaire des parasites</i>	
<u>D. Résistance lors de la phase chronique.</u>	<u>P.79</u>
<i>a. Mise en évidence du rôle protecteur</i>	
<i>des anticorps.</i>	<i>P.79</i>
<i>b. Prise en compte des diverses souches</i>	
<i>parasitaires.</i>	<i>P.80</i>
<i>c. Anticorps lytiques versus anticorps</i>	
<i>conventionnels.</i>	<i>P.81</i>
<i>d. Mécanismes de la lyse des parasites en</i>	
<i>présence de complément.</i>	<i>P.82</i>
<i>f. Autre modes d'actions des anticorps.</i>	<i>P.83</i>

<u>E. Evasion des défenses de l'hôte.</u>	<u>P.83</u>
<u>F. Immunopathologie de la phase aiguë.</u>	<u>P.85</u>
a. : Activation polyclonale.	P.86
b.: Immunosuppression.	P.87
c.: Altération de la production d'IL2 chez la souris.	P.88
d.: Altération de l'expression de certains marqueurs lymphocytaires chez l'homme.	P.89
<u>G. Immunopathologie de la phase chronique.</u>	<u>P.93</u>
a.: Réponse cellulaire.	P.93
a.1. Macrophages.	P.95
a.2. Lymphocytes.	P.95
a.3. Sous-populations lymphocytaires CD4.	P.96
a.4. Rôle des cellules Th2.	P.97
a.5. Rôle des cellules B CD5.	P.97
b. : Rôle des anticorps.	P.99
c.: Mimiquerie fonctionnelle.	P.103
<u>4. ANTIGENES PROTECTEURS.</u>	<u>P.104</u>
<u>A. Molécules de surface.</u>	<u>P.105</u>

<i>a. Identification de molécules de surface.</i>	<i>P.106</i>
<i>b. GP 60.</i>	<i>P.107</i>
<i>c. GP 90.</i>	<i>P.107</i>
<i>d. LPPG.</i>	<i>P.107</i>
<i>e. GP 160.</i>	<i>P.108</i>
<i>f. GP 72.</i>	<i>P.108</i>
<i>g. Neuraminidases.</i>	<i>P.110</i>
<i>h. GP 85.</i>	<i>P.111</i>
<u><i>B. Antigènes flagellaires.</i></u>	<u><i>P.113</i></u>
<u><i>C. Antigènes d'excrétion-sécrétion.</i></u>	<u><i>P.115</i></u>
<u>5. A LA RECHERCHE D'UNE STRATEGIE VACCINALE ORIGINALE.</u>	<u><i>P. 116</i></u>
TRAVAUX PERSONNELS	P.119
<u>ARTICLE N°1</u>	<u>P.120</u>
<u>ARTICLE N°2</u>	<u>P.135</u>
<u>ARTICLE N°3</u>	<u>P.137</u>
DISCUSSION	P.200
REFERENCES	P.259
FIGURES	P.259
TABLE DES MATIERES	P.261

