

50376
1995
213

No d'Ordre:

UNIVERSITE DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

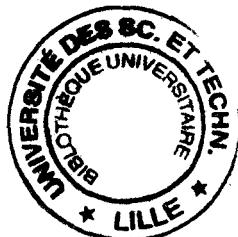
THESE DE DOCTORAT
présentée à l'Université de LILLE I
pour l'obtention du titre de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
option: Immunologie

par

GUEVARA ESPINOZA Angel Gustavo

Trypanosoma cruzi: Utilisation d'outils moléculaires pour le diagnostic de l'infection chagasique humaine, le suivi du traitement et l'analyse de la réponse immunitaire.



Présentée le 28 Septembre 1995 devant la commission d'examen

Membres du jury:

President: Professeur A. Dhainaut

Rapporteurs: Professeur Y. Carlier
Dr. J. L. Lemesre

Examinateurs: Dr. M. Pages
Dr. A. Ouaissi



A Olga, Willy et Gaby

Ce travail a été réalisé:

Au Institut Federatif de Recherche

Unité INSERM 415

INSTITUT PASTEUR DE LILLE

rue du Professeur Calmette, 59019 Lille-Cédex-FRANCE

sous la direction du Docteur Ali Ouassi Directeur de Recherche INSERM,

avec l'encadrement du Docteur Ali Taibi.

A Monsieur le Professeur Dhainaut

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Yves Carlier,

Je suis très honoré de votre présence dans ce jury et vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Jean Loup Lemesre,

Je vous remercie vivement d'avoir bien voulu juger cette thèse. Qu'il me soit permis de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Michel Pages,

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

A Monsieur le Docteur Ali Ouaissi,

Vous avez bien voulu m'accepter parmi vos élèves. Partager de votre dynamisme et de votre compétence scientifique m'a donné l'enrichissement nécessaires à ma formation. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Ali Taibi,

Nous avons partage ce travail et je beaucoup apprecie ses conseils scientifiques aussi bien que ses encouragements chalereux manifestés tout au long de ces années passées ensemble. Permettez-moi de vous exprimer ici ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Ronald H. Guderian,

Qui à guidé mes premières pas dans la recherche scientifique. Que ce travail soit le témoignage de ma respectueuse admiration.

Je tiens à remercier tous les membres du groupe de recherche sur les Trypanosomatidae qui m'ont aidé tout au long de ce travail:

Odile Mulot-Billaud

Marc Loyens

Ralf Schöneck

Bilel Yahiahoui

Rodolfo Fernandez G.

Je présente mes remerciements à Hector, Oscar, Esteban, Rodolfo pour l'enthousiasme et "calor latino" qu'ils ont manifesté tout au long de ces années.

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

Le Docteur Bernardete Lucas pour le aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Le Docteur Isabelle Alcaraz pour la lecture attentive de ce mémoire

Mademoiselle Nadia Vandromme pour son aide dans la rédaction de cette thèse

Mademoiselle Nathalie Ivanof pour son soutien pendant des moments très difficiles vécus à la fin de ce travail.

Le Docteur Juan Alava, Mademoiselle Fabiola Zambrano et Monsieur Jorge Zambrano pour son aide dans le travail sur le terrain en Equateur.

Le groupe de laboratoire d'investigations cliniques à l'Hôpital Vozandes au Quito-Equateur (Manuel, Wilson, Carlos, Ivàn, Edmundo, Mayra, Raquel).

Tout le personnel du laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille U415-U167 ont participé par une collaboration efficace à la réalisation de cette étude, que tous soient assurés de ma gratitude.

Je voudrais remercier l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO-TDR programme) pour le soutien financier pour la réalisation de cette thèse.

Je ne finirai pas sans présenter mes remerciements à Mademoiselle Joëlle Wilem pour son soutien moral pendant mon séjour en Europe. Que ce travail soit l'expression de ma profonde amitié.

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

PUBLICATIONS

Taibi, A., B. Plumas-Marty, **A. GUEVARA-E.**, R. Schöneck, H. Pessoa, M. Loyens, R. Piras, T. Aguirre, H. Grass-Masse, M. Bossus, A. Tartar, A. Capron and A. Ouaissi. 1993. *Trypanosoma cruzi*: immunity induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T-cell epitope with protective activity. *J. Immunol.* 151: 2676.

Taibi, A., **A. GUEVARA-E.**, R. Schöneck, B. Yahiaoui and A. Ouaissi. 1995. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by Polymerase Chain Reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Sous presse: Parasitology*.

GUEVARA, A. G., A. Taibi, J. Alava, R. H. Guderian and A. Ouaissi. 1995. Use of a recombinant *Trypanosoma cruzi* protein antigen to monitor cure of Chagas disease. *Sous presse: Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*

Krautz, G. M., L. M. C. Galvao, J. Romeu Cançado, **A. GUEVARA-E**, A. Ouaissi and A. U. Krettli. 1995. Use of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. *J. Clin. Microb.* 33: 2086.

Taibi, A., **GUEVARA-E.** and A. Ouaissi. 1995. A protective *Trypanosoma cruzi* recombinant protein induces a Th1-like interleukin profile. *Soumis: Infect. Immun.*

AUTRES PUBLICATIONS

Kron, M. A., R. H. Guderian, **A. GUEVARA-E** and A. Hidalgo. 1991. Abdominal sparganosis in Ecuador: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 146.

Lecaillon, J. B., R. Gohbillon, R. Guderian, **A. GUEVARA-E.**, S. Cascante and A. Poltera. 1991. Concentrations of amocarzine in plasma of 71 Ecuadorian patients of two different races receiving 3 mg/kg b.i.d. and 5 mg/kg o.d. oral postprandial doses for 3 days. *Trop. Med. Parasitol.* 42: 291.

Zak, F., R. Guderian, G. Zea-Flores, **A. GUEVARA** and A. A. Poltera. 1991. Microfilaricidal effect of amocarzine in skin punch biopsies of patients with Onchocerciasis from Latin America. *Trop. Med. Parasitol.* 42: 294.

Cooper, P. J., **A. GUEVARA-E.** and R. H. Guderian. 1993. Intestinal helminthiases in Ecuador: the relationship between prevalence, genetic and socioeconomic factors. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 26: 175.

Guderian, R. H., **A. GUEVARA- E.**, P. Cooper, M. T. Rugeles and C. Arango. 1994. HTLV-1 infection and tropical spastic paraparesis in Esmeraldas province Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88: 399.

GUEVARA-E., A., C. Truyens, J. C. Vieira, E. Araujo, M. Calvopina, R. H. Guðerian and Y. Carlier. 1995. Antibody isotypes, including IgG subclasses, of Ecuadorian patients with pulmonary Paragonimiasis. *Sous presse: Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*

COMMUNICATIONS

Taibi, A., B. Plumas-Marty, A. GUEVARA-E., R. Schöneck, M. Bossus, H. Grass-Masse, A. Capron and A. Ouaissi. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Induccion de immunidad en ratones BALB/c y ratas Fischer causada por antigenos de excretion/secrecion de trypomastigotes e identificacion de una secuencia peptidica correspondiente a determinantes antigenicos T con actividad protectiva. *III Congreso Iberoamericano de Parasitologia. Octubre 4 - 8 . Lisboa-Portugal.*

GUEVARA, A., A. Taibi and A. Ouaissi. 1995. *Trypanosoma cruzi*: a protective 24 kDa recombinant protein induces IL-2 and IFN- γ cytokines during experimental Chagas' disease in mice. *II Scientific Meeting. European Ligand Assays Society. April 26 - 27. Brussels-Belgium.*

SOMMAIRE

	Page
RESUME.....	11
INTRODUCTION.....	12
GENERALITES.....	15
TRAVAUX PERSONNELS.....	66
DISCUSSION.....	82
PERSPECTIVES.....	89
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	91
TABLE DES MATIERES.....	108

RESUME

La maladie de Chagas représente un problème majeur de santé en Amérique du Sud et Centrale. Le parasite responsable est un protozoaire hemoflagellé, *Trypanosoma cruzi*. Chez l'homme la maladie connaît une évolution en deux phases: - une phase aiguë qui succède presque immédiatement à l'infection. Cependant, lors de cette phase les symptômes cliniques n'apparaissent que dans 50% de cas. - une phase chronique pendant laquelle il est difficile de détecter des parasites dans la circulation sanguine de l'hôte. Elle peut être symptomatique et l'on assiste dans ce cas au développement de formes de pathologie digestive et/ou cardiaque. Le développement de techniques de diagnostic spécifiques et sensibles aussi bien que la recherche de molécules parasitaires à potentialités vaccinantes peuvent aider pour le contrôle de cette infection.

Dans le présent travail, nous avons utilisé une protéine de *T.cruzi* de masse moléculaire 24 kDa, présent dans les antigènes excrétés/sécrétés des formes trypomastigotes, pour le sérodiagnostic de la maladie de Chagas. En effet, en utilisant un test ELISA avec la protéine recombinante (rTc24) comme antigène, nous avons pu montrer la présence d'anticorps dirigés vis-à-vis l'antigène Tc24 dans un pourcentage élevé de sérum provenant de différentes zones endémiques (Colombie 95%, Equateur 90,9%, Bolivie 94%, Argentine 89% et Brésil 98%). De même, des études menées au Brésil et en Equateur montrent que la protéine rTc24 peut être utilisé pour évaluer la guérison des patients chagasiques soumis à un traitement spécifique. Cependant, les études de spécificité ont montré une faible réactivité croisée des anticorps anti-Tc24 avec une protéine de poids moléculaire 21 kDa de *Trypanosoma rangeli* par Western blot. Néanmoins, nous avons pu identifier un domaine spécifique de la Tc24 par rapport à la 21 kDa de *T.rangeli* dans la partie N-terminale de la molécule. En effet, en utilisant des oligonucléotides correspondants à la séquence peptidique spécifique, nous avons développé un test de Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR) spécifique pour *Trypanosoma cruzi*.

Une autre partie de ce travail a concerné l'évaluation du pouvoir immunoprotecteur de la rTc24 vis-à-vis de l'infection chagasiqe expérimentale. Les résultats obtenus montrent clairement que la rTc24 induit par immunisation un bon niveau de protection vis-à-vis de la mortalité en phase aiguë de l'infection. Par ailleurs, l'analyse de la réponse cellulaire a montré que la protéine induit un profil de type Th1, avec une production de IL-2 et IFN- γ .

I. INTRODUCTION

Bien que la trypanosomiase américaine fut découverte en 1909 par Carlos Chagas au Brésil, elle reste encore une menace pour près du quart de la population d'Amérique latine. Largement répandue dans le sous-continent, les manifestations pathologiques et les caractéristiques épidémiologiques sont fortement variables d'une région d'endémie à l'autre. Il y a une grande diversité dans les taux de prévalence, les modes de transmission, les caractéristiques du parasite, les vecteurs et les hôtes réservoirs qui rendent cette maladie très difficile à contrôler.

On a cru que la maladie de Chagas était essentiellement rurale et affectait les habitants des ranchos aux murs de torchis et aux toits de chaume, mais l'ampleur des mouvements de population et la rapidité de l'urbanisation, liés au pauvre développement socio-économique, ont servi à l'expansion de la maladie en dehors des foyers naturels de transmission.

La maladie de Chagas fait partie des maladies endémiques reconnues prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Néanmoins, on dit "**qu'elle est une maladie du sous-développement qui ne disparaîtra qu'avec lui**", c'est pourquoi la lutte contre la maladie de Chagas ne doit pas être relâchée. En principe, les programmes de lutte doivent être axés sur l'élimination du vecteur, la prévention de la transmission lors des transfusions de sang et la surveillance des infections congénitales. Par contre, les moyens de lutte contre l'infection chagasiche sont limités. La prophylaxie est difficile: le réservoir animal est presque illimité; les vecteurs sont sensibles aux insecticides de contact mais parfois peu accessibles. Ainsi, le diagnostic pose des problèmes car les méthodes parasitologiques directes ne conviennent qu'au diagnostic des formes aiguës à un moment où, le plus souvent, les signes cliniques ne sont pas très spécifiques. Les recherches de trypanosomes dans le sang frais sont rarement positives. Elles sont en revanche presque toujours négatives en phase chronique. Par contre, les méthodes immunologiques ne sont pas souvent très spécifiques, de plus elles sont positives tardivement et ne peuvent donc pas être employées pour le diagnostic des formes aiguës. Le traitement est décevant, cependant il est d'autant plus efficace qu'il est pratiqué tôt après l'infection (phase aiguë), mais pratiquement inactif sur les viscéropathies chagasiche chroniques. La sensibilité

au médicament est variable suivant les souches de *Trypanosoma cruzi*. De surcroît, il n'existe pas une méthode assez simple pour l'évaluation de la guérison.

Ainsi, la recherche des antigènes parasitaires spécifiques pour le diagnostic reste encore valable. Mais, avec l'aide de nouvelles technologies telles que celui du génie génétique, on pourra mieux connaître des molécules parasitaires et ainsi développer des outils à potentiel diagnostique, clinique ou vaccinal.

II. GENERALITES

II. 1. Définition

La maladie de Chagas, ou trypanosomiase américaine, est une infection parasitaire chronique due à un protozoaire flagellé, le *Trypanosoma cruzi*. Ce parasite appartient à l'ordre des kinétoplastidés, qui comprend des flagellés munis d'un kinétoplaste, organite situé dans le chondrium cellulaire et contenant un réseau fibreux d'ADN. *T.cruzi* fait partie de la section *Stercoraria*, voire des trypanosomes qui se développent en une forme infestante dans l'appareil digestif du vecteur et qui contaminent l'hôte mammifère par leurs déjections. Le sous-genre *Schizotrypanum* regroupe les trypanosomes qui se multiplient chez l'hôte vertébré par voie intracellulaire, la taxonomie pour ce parasite est *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

II. 2. Le parasite

II. 2.1. Cycle biologique

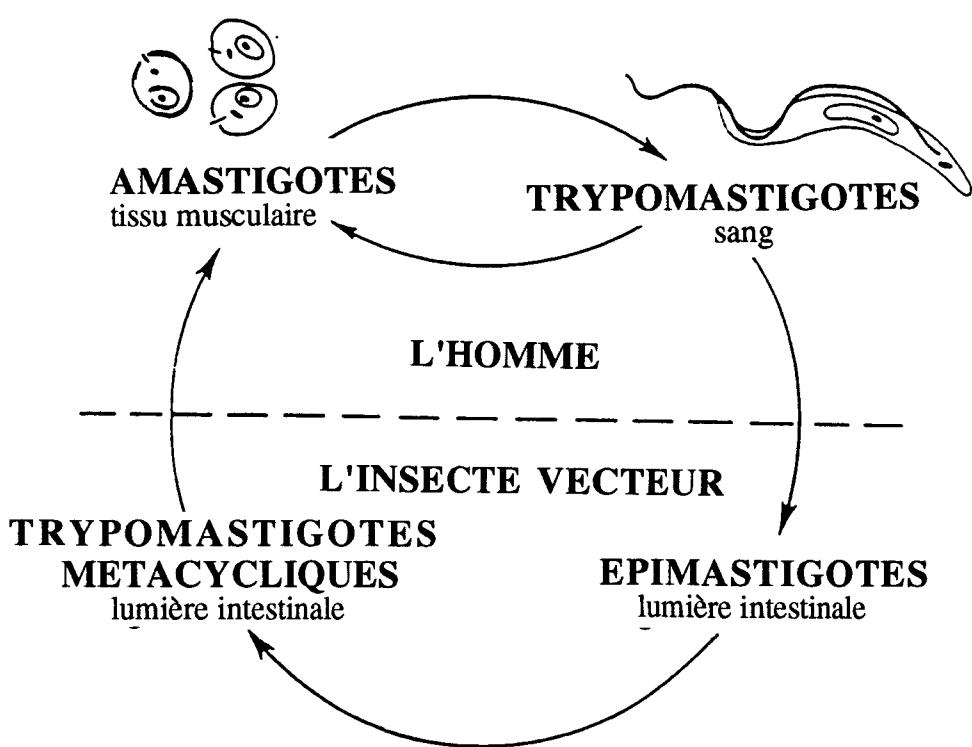
Le cycle biologique de *T.cruzi* nécessite un insecte vecteur (hôte intermédiaire) et un vertébré (hôte définitif). Les trypomastigotes métacycliques sont éliminés dans les déjections de l'insecte et pénètrent chez l'hôte définitif au cours du grattement, mettant en contact la lésion, causée par le vecteur lors de son repas sanguin, et les déjections. En outre, les parasites peuvent directement infecter l'homme par la conjonctive des yeux. Une fois les trypomastigotes à l'intérieur de l'organisme humain, ils sont capables d'infecter la majorité des cellules, notamment les leucocytes polynucléaires et les macrophages qui sont probablement les premières cellules hôtes infectées par *T.cruzi* (KIERSZENBAUM et al. 1974; DEUTSCHLÄNDER et al. 1978). Cette étape d'invasion est indispensable pour le cycle de vie du micro-organisme. En effet, *T.cruzi* est un parasite à multiplication strictement intracellulaire. De nombreux mécanismes ont été évoqués pour expliquer la pénétration du parasite dans les cellules hôtes (PEREIRA 1983; OUAISSE et coll. 1984, 1986; SCHENKMAN et EICHINGER 1993). Dans une cellule, le parasite pénètre dans une vacuole parasitophore,

apparemment un immense lysosome (TARDIEUX et coll. 1992) où il prend aussitôt la forme amastigote, les parasites s'échappent dans le cytoplasme où ils se multiplient alors activement par division binaire induisant une réaction inflammatoire et une réponse immunologique *in vivo* (BRENER 1980). Après un certain nombre de cycles de divisions les amastigotes se différencient en trypomastigotes qui sont libérés dans la circulation sanguine après rupture de la cellule infectée. Ces formes, dénommées trypomastigotes sanguicoles ne sont pas capables de se multiplier, mais pourront être de nouveau prélevées par le vecteur lors d'un repas sanguin, ou infecter d'autres cellules de l'hôte. Dans l'insecte, les trypomastigotes sanguicoles atteignent le tube digestif moyen où ils se transforment en épimastigotes qui se multiplient par division binaire. Dans le tube digestif postérieur, ils se différencient en trypomastigotes métacycliques, formes infectantes pour l'homme et les autres mammifères (BRENER 1973; DE ISOLA et coll. 1981) (Figure 1).

II. 2. 2. Hétérogénéité des souches de *Trypanosoma cruzi*

Des investigations menées sur des populations clonées de souches de *T.cruzi* ont révélé une très forte hétérogénéité qui peut influer sur les caractéristiques de chaque souche (TIBAYRENC 1984, 1986). On a observé des différences sur la vitesse de croissance en culture, le pouvoir infectieux des souches pour leur hôte vertébré, leur virulence et leur pathogénicité. Dans la nature, les populations de *T.cruzi* qui parasitent l'homme, le réservoir domestique et sylvatique ainsi que les vecteurs, sont un mélange de populations hétérogènes. En principe, l'identification de l'espèce *T.cruzi* est relativement facile sauf pour ce qui est de sa distinction avec *Trypanosoma rangeli*, trypanosome américain non pathogène pour l'homme que l'on trouve en Colombie, au Vénézuela et en Amérique centrale. Par ailleurs, *T.cruzi* et *T.rangeli* peuvent être hébergés par les mêmes hôtes vecteurs et réservoirs en certaines régions. Par contre, les souches de *T.cruzi* peuvent être individualisées par l'étude de leur comportement et de l'évolution de l'infection chez l'hôte ou par une analyse moléculaire et génétique des parasites,

Figure 1.- Cycle biologique de *Trypanosoma cruzi*



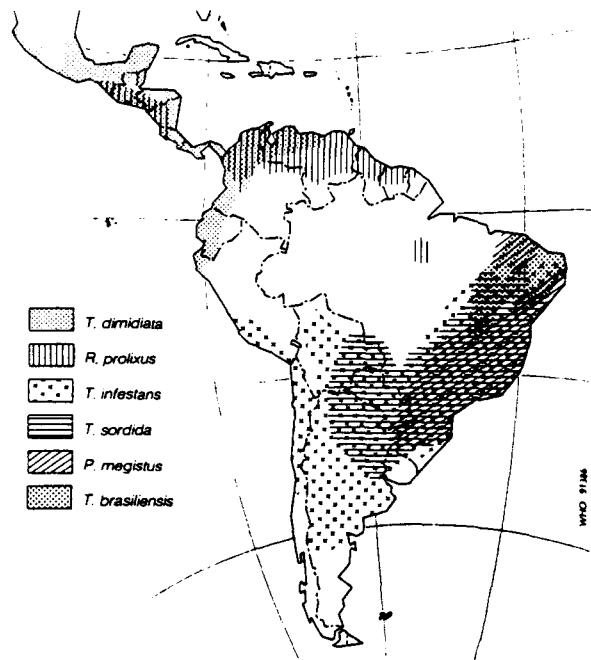
II. 3. Les Vecteurs

Les réduves sont des insectes de l'ordre des hémiptères appartenant à la famille des Réduvidés et à la sous-famille de Triatomines, ils ont été décrites dans les Amériques depuis 1590 (SHERLOCK 1979). L'une des caractéristiques essentielles de la biologie des réduves est que les deux sexes sont des hématophages obligatoires, tant chez la nymphe que chez l'adulte. Ceci leur permet d'être constamment au contact de vertébrés pour l'apport de sang qui leur est indispensable. La plupart des réduves ont une gamme d'hôtes très large. Cependant, certaines peuvent montrer une préférence marquée pour une espèce particulière, dans le cas de *Triatoma infestans* cette préférence est pour l'homme. La quasi-totalité des espèces de réduves se cantonnent soit à la région néo-tropicale, soit à la région néo-arctique, mais quelques-unes se concentrent dans les deux.

II. 3. 1. Répartition géographique

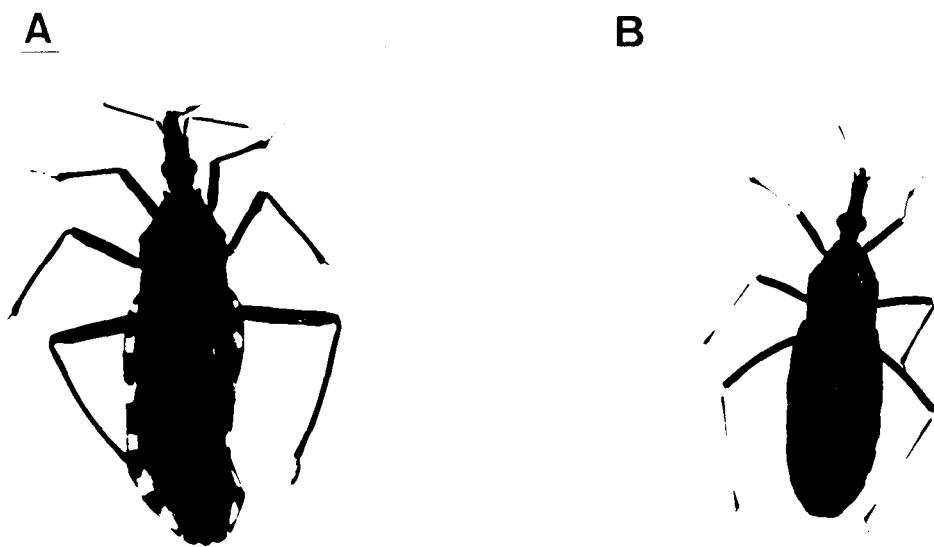
Il existe 117 espèces de réduves, parmi celles-ci 105 se rencontrent dans les Amériques. L'aire d'extension géographique des réduves s'étend de Salt Lake City (Etats-Unis d'Amérique) au 41^e degré de latitude Nord, où l'on a signalé la présence de *Triatoma protracta*, à la Patagonie, en Amérique du Sud, où l'on a observé *T.patagonica* au 46^e degré de latitude Sud. Toutes les espèces sont à *priori* des vecteurs possibles de *T.cruzi*, mais six d'entre elles revêtent une importance particulière sur le plan épidémiologique en Amérique du Sud (*Triatoma infestans*, *T.brasiliensis*, *T.dimidiata*, *T.sordida*, *Panstrongylus megistus*, et *Rhodnius prolixus*), tandis que *Rhodnius pallescens* joue un rôle important en Amérique centrale et au Panama (LENT et WYGODZINSKY 1979; SHERLOCK 1979) (Figures 2 et 3).

Figure 2. - La distribution géographique des principaux vecteurs de la maladie de Chagas.



Adapté, avec l'autorisation de Brener, Z. & Andrade, Z., éd. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. [Trypanosoma cruzi et la maladie de Chagas.] Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979, p. 83.

Figure 3.- A) *Triatoma infestans* B) *Rhodnius prolixus*.



II. 4. Epidémiologie

II. 4. 1. Distribution géographique et prévalence de l'infestation humaine

Malgré les progrès réalisés dans la compilation de données sur la prévalence de la maladie de Chagas, il reste difficile d'avoir une idée exacte de la distribution géographique et de la prévalence de cette parasitose. Elle affecte 16 à 18 millions d'habitants dans les pays d'endémie et 100 millions de personnes sont jugées exposées à l'infestation (MONCAYO 1993). Cependant, l'infestation humaine est constatée dans une zone qui s'étend du sud des Etats-Unis d'Amérique à l'Argentine (Figure 4). La prévalence pour divers pays est fondée en grande partie sur les données dont dispose l'Organisation Panaméricaine de la Santé (OPS), provenant de rapports ne concernant pas tous la même année (PAHO 1984). En outre, la prévalence et l'incidence de la maladie varient sous l'influence des mouvements migratoires, des programmes de lutte, etc. Ainsi, en **Argentine**, en 1981, l'infestation intéressait 5,8% des appelés de 18 ans commençant leur service militaire. Mais, dans les régions à transmission intense, la prévalence s'élevait à 30%. Dans les banques de sang, 5% à plus de 20% de dons sont séropositifs dans les agglomérations urbaines. En **Bolivie**, la région d'endémie couvre 80% du pays. Parmi les donneurs de sang du Département de Santa Cruz, plus de 60% étaient séropositifs (LANDIVAR et coll 1992), dans le village de Tabacal, province du Cochabamba, 74% de sujets sont de toute évidence infectés (PLESS et coll 1992). Au **Brésil**, la région d'endémie est la plus étendue du continent, 44,5% (3.600.000 km²) de la superficie totale du pays. En 1984, la prévalence était de 11,17% (FEITOSA et KRIEGER 1991). Au **Chili**, pendant la période 1981-86, la proportion de sujets parasités était estimée à 20% de la population totale. Dans les banques de sang, la séropositivité varie de 0 dans le sud du pays à plus de 15% dans le nord. En **Colombie**, dans le Département de Nord de Santander, 30% des sujets examinés étaient séropositifs en 1985. Au **Costa Rica**, en 1984 le taux d'infestation des logements par les réduves était de 34,6% dans la province d'Alajuela et le taux d'infestation des vecteurs par *T.cruzi* de 30%. Dans les banques de sang, les dons séropositifs représentaient

1%. Au **El Salvador**, le vecteur s'observe dans 70-80% des logements du pays, le taux d'infestation des vecteurs par *T.cruzi* est de l'ordre de 25% et il se peut que 20% des habitants soient parasités en zone rurale. En **Equateur**, la transmission a son maximum d'intensité dans la région côtière. Aux **Etats-Unis d'Amérique**, si 3 cas seulement d'infestation ont été signalés chez les autochtones, il se peut que les nombreux immigrants venus du sud soient parasités par *T.cruzi*, ce qui oblige à rechercher ce parasite dans les dons de sang et d'organes ou à prendre des précautions (KIRCHHOFF 1993). Au **Guatemala**, l'infestation humaine est fréquente dans plusieurs départements. Dans les banques de sang, 13% environ des dons se sont révélés séropositifs. En **Honduras**, en 1983 le taux de séropositivité était maximal dans les départements de l'ouest et de l'est ainsi que dans la région méridionale. On estime que les deux tiers environ des habitants sont exposés, tandis que 11% de dons de sang sont séropositifs. Au **Mexique**, on observe des vecteurs et des mammifères parasités dans de très nombreux états. La maladie a sa prévalence maximale dans les états de la côte du Pacifique, du Chiapas au Nayarit. Bien que la maladie de Chagas est jugée peu grave au Mexique, on connaît quelques cas de méga-viscères, et l'électrocardiogramme (ECG) présente des anomalies chez 13% de séropositifs. Au **Nicaragua**, il n'existe pas de statistiques récentes mais, on sait que des sujets parasités ont été observés dans de nombreux départements. Au **Panama**, on trouve les vecteurs de *T.cruzi* dans dix provinces. Au **Paraguay**, la maladie de Chagas est jugée endémique dans toutes les zones rurales. Il semble que la prévalence de la maladie humaine varie de 10% à 72% dans certaines régions. Au **Pérou**, l'infestation humaine atteint son maximum avec 12% dans les départements d'Arequipa, Moquegua et Tacna. En **Uruguay**, on estime que 13,8% des habitants des régions endémiques sont parasités. Au **Vénézuela**, au cours des années 70, on estimait que 1,2 millions de personnes étaient parasitées.

II. 4. 2. Modes de transmission

Dans le plupart des cas, surtout dans les zones rurales, la maladie de Chagas est transmise à l'homme ou à d'autres mammifères par le contact des déjections des triatomidés infectés (réduvidé hémiptère hématophage) avec le point de piqûre (par grattage) ou avec une muqueuse.

Figure 4. Distribution de la maladie de Chagas humaine dans l' Amerique latine.



D'autres formes de transmission non vectorielle sont représentées par la transmission congénitale (AZOGUE 1985), la transmission transfusionnelle (SCHMUNIS 1991), la voie orale (LAINSON 1980), la transplantation d'organes parasités ou une infestation au laboratoire.

II. 4. 3. Transmission par l'insecte vecteur

En général, on peut imputer la transmission de la maladie de Chagas, à sept espèces principales de vecteurs domiciliaires: *Triatoma infestans*, *T.brasiliensis*, *T.dimidiata*, *T.sordida*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius pallescens*, et *Rhodnius prolixus*. Ces espèces sont caractéristiques des espaces découverts d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud - étendues naturelles (savanes et prairies, mosaïques, forêts-savanes, forêts sèches et vallées désertiques ou semi-désertiques des Andes) - ou écotopes artificiels qui ont conduit certaines espèces de réduves à occuper le milieu péridomestique et même l'intérieur des habitations.

Le taux de transmission de *T.cruzi* pour les différentes espèces de vecteurs dépend de nombreux facteurs: densité de vecteurs, préférences trophiques (source principale de sang lors de repas sanguin: homme, poulet, chien, chat, etc...), longévité, sensibilité à l'infestation, capacité à permettre la multiplication du parasite et à l'excréter, durée séparant un repas de sang de la défécation, sensibilité de l'homme et des réservoirs animaux à l'infestation, distribution des vecteurs et de réservoirs et de l'homme, durée de la parasitémie.

II. 4. 4. Transmission transfusionnelle

Les cas d'infestation post-transfusionnelle par *T.cruzi*, intéressent le plus souvent des adultes. On en connaît plus de 200, mais on pense qu'ils sont beaucoup plus nombreux, soit qu'ils sont inapparents, soit qu'ils passent inaperçus. De toute façon, le risque de transmission est beaucoup plus important par transfusion que par intermédiaire d'un vecteur puisqu'il concerne les régions urbaines. Le taux de séropositivité chez les donneurs de sang dépasse souvent 20% dans les zones de forte endémie d'Argentine et du Brésil, on a observé un taux

atteignant 63% en Bolivie. Même dans les grandes villes urbaines, par exemple Buenos Aires, Caracas, Rio de Janeiro, Santiago et Sao Paulo, le taux de séropositivité dans les banques de sang va de 0.5% à 2%. De plus, des cas de maladie de Chagas aiguë ont été décrits en dehors des zones endémiques, notamment aux Etats-Unis et au Canada, à la suite de transfusions sanguines chez des individus immunodéprimés (GRANT, GOLD, WITTNER et al. 1989; NICKERSON, ORR, et al. 1989). Le risque d'infestation à l'occasion d'une transfusion dépend de nombreux facteurs relatifs: au parasite, au transfusé, à la prévalence de l'infestation dans la région en cause, à la viabilité du parasite dans le sang après conservation à froid (le parasite cesse d'être viable après trois semaines à 4 degrés). Il y a des groupes particulièrement exposés comme celui des hémophiles et immunodéprimés.

II. 4. 5. Transmission congénitale

La maladie de Chagas congénitale est plus répandue qu'on ne le pensait. Elle est connue en Argentine, en Bolivie, au Brésil, au Chili, en Uruguay, et au Venezuela; on a également observé un cas en Suède, chez l'enfant d'une immigrante d'Amérique latine. Selon différentes études, la prévalence de l'infestation congénitale varie de 1.6% à 13% chez les enfants nés d'une mère chagasiche (BITTENCOURT et coll. 1972, 1985; AZOGUE et coll. 1985). La plupart des auteurs n'ont observé aucune différence entre des groupes de femmes, les unes parasitées, les autres exemptes de la maladie de Chagas, qu'il s'agisse d'avortements, du faible poids à la naissance, des prématurés, des morts "in utero" ou du développement foetal. En revanche, d'autres auteurs ont indiqué que l'infestation de la mère peut provoquer la mort du foetus ou un accouchement prématuré. Par contre, dans des modèles expérimentaux on a observé un retard de la croissance du foetus chez les souris infectées, même s'il n'y avait pas de transmission congénitale (CARLIER et coll. 1985).

II. 4. 6. Transmission au cours de l'allaitement maternel

Bien qu'il y ait quelques données où l'on a attribué l'infestation des enfants au fait qu'ils ont

été nourris au sein par des mères chagasiques, il n'y a pas d'études pour confirmer cette hypothèse. D'après des enquêtes menées au Brésil, en Argentine et en Bolivie (BITTENCOURT et coll 1988)), il semble que la transmission du parasite à l'occasion de l'allaitement soit tout à fait improbable, ainsi il n'est pas justifié de déconseiller à une femme parasitée d'allaiter son enfant.

II. 4. 7. Transmission à l'occasion d'une greffe d'organe

Des études menées par CHOCAIR (1981) ont permis l'observation des épisodes aigus chez des greffés ayant reçu un organe d'un chagasiche chronique, et le parasite a été isolé dans le sang périphérique. Comme les greffés sont sous traitement immuno-supresseur, leur sensibilité à l'infestation par les parasites du donneur est grandement accrue. De même, les greffés précédemment atteints de la maladie de Chagas chronique peuvent, du fait de ce traitement immuno-supresseur, voir leur mal exacerbé (LEIGUARDA et coll 1990). Un cas de maladie de Chagas aiguë suite à une greffe de moelle osseuse a été décrit en dehors des zones d'endémie (VILLALBA 1992).

II. 4. 8. Tansmission par voie orale

Les études épidémiologiques menées à la suite de deux poussées indépendantes de maladie de Chagas aiguë donnent tout lieu de penser que le parasite avait été transmis par voie orale, du fait de la consommation d'aliments contaminés (LAISON et coll. 1980). Ainsi, il existe un risque potentiel d'infestation humaine lors de la consommation de produits alimentaires contaminés par *T.cruzi*.

II. 4. 9. Infestation accidentelle au laboratoire

Le travail expérimental avec *T.cruzi* exige des précautions particulières pour assurer la sécurité des manipulateurs. Les contaminations au laboratoire, heureusement rares, sont

généralement la conséquence d'une piqûre avec une aiguille contaminée (HOFFLIN et coll 1987). Aussi, les blessures de la peau et des muqueuses oculaires, nasales et buccales lors d'un contact avec des produits contaminés peuvent être des voies d'infection.

III. ASPECTS CLINIQUES

On distingue trois phases dans la maladie de Chagas: une phase aiguë, de courte durée; une longue phase de latence, dite phase indéterminée, et une phase chronique prolongée.

III. 1. Phase aiguë

La phase aiguë se caractérise par un état de malaise général accompagné de manifestations cliniques diverses. Les symptômes peuvent être bénins et atypiques, de sorte que la maladie passe souvent inaperçue à ce stade, elle n'est diagnostiquée que dans 1 à 2% des cas. Dans le cas d'une absence de traitement spécifique, les symptômes peuvent rester pendant environ 2 mois. Bien que la phase aiguë puisse se manifester à n'importe quel âge, les plus touchés sont souvent les enfants moins de 10 ans avec une mortalité de 2 à 8%.

L'inflammation locale, au niveau de la porte d'entrée du parasite, est appelée chagome. Quand la porte d'entrée est conjonctivale ou palpébrale, un complexe ophtalmo-ganglionnaire rougeâtre et indolore est observé, il comporte un oedème bipalpébral unilatéral caractéristique et une adénopathie régionale. Le chagome oculaire, ou signe de Romana, est présent dans la plupart des malades découverts au stade de l'infestation récente (Figure 5). Dans les autres parties du corps, l'infestation est moins caractéristique et elle peut évoquer d'autres infections. Les symptômes généraux de la maladie de Chagas en phase aiguë sont la fièvre, l'hépatosplénomégalie, des polyadénopathies, des gastroentérites, des manifestations respiratoires, cutanées et nerveuses dues à des lésions de cellules ganglionnaires du système nerveux végétatif. Parfois aussi, on note sur l'électrocardiogramme ou la radiographie des anomalies imputables à une myocardite aiguë; par exemple, la radiographie du thorax peut révéler une cardiomégalie et les anomalies de l'ECG peuvent montrer une tachycardie sinusale avec allongement du segment PR, altérations de l'onde T et bas voltage du complexe ORS. Ces lésions cardiaques évoluent cependant dans la majorité des cas vers une guérison sans séquelles. La mort des suites d'une myocardite aiguë se produit dans 2-3% des cas. Durant cette phase, les parasites se multiplient abondamment dans l'organisme, les tissus les plus couramment parasités sont le cœur (Figure 6a), les muscles squelettiques, les muscles lisses et

Figure 5. Le signe de Romana, manifestation clinique caractéristique observée dans la phase aiguë de certaines cas de maladie de Chagas.



Cliché: Dr. Juan Alava P.

le tissu nerveux. Les cas graves s'accompagnent parfois de méningo-encéphalite ou la mortalité peut atteindre 50%.

Il faut remarquer aussi que la maladie peut arriver sans symptômes apparent. Mais à ce stade aigu, le diagnostic de la maladie de Chagas peut être établi par la mise en évidence du trypomastigote de *T.cruzi* dans le sang périphérique à l'examen microscopique (Figure 6b).

III. 2. Phase indéterminée

Elle commence environ 8 à 10 semaines plus tard, que la phase aiguë ait été silencieuse ou non. Cette phase de latence clinique peut durer de 10 à 20 ans ou même indéfiniment. Elle se caractérise par l'absence de symptômes cliniques chez un sujet qui conserve sa pleine capacité physique et ne manifeste aucune anomalie à l'électrocardiogramme ni à la radiographie du thorax. Par contre, la sérologie reste positive tandis que la parasitémie est indécelable par les méthodes directes. Pendant cette phase, la plupart des patients ignorent qu'ils sont parasités et constituent donc un réservoir d'infestation important.

III. 3. Phase chronique

C'est alors que débute la phase chronique où surviennent des complications tardives, et des séquelles différencées des lésions nerveuses profondes consécutives à la parasitose généralisée de la phase aiguë septicémique et tissulaire. En pratique, 30% de sujets infectés ont une atteinte cardiaque, digestive ou neurologique, les autres ne manifestant jamais d'atteinte organique. Dans cette phase, les parasites disparaissent de la circulation sanguine où ils sont non détectables par des méthodes directes car la majorité des parasites sont dans les tissus.

Les séquelles cardiaques (**cardiopathie chagásique**) sont, de beaucoup, les plus fréquentes et sont à l'origine de 85% des décès dus à la maladie de Chagas. Cette forme est la plus étudiée, la mieux connue et la plus facile à diagnostiquer. Les symptômes cliniques dépendent du degré d'atteinte myocardique, de la présence de troubles du rythme et du degré

Figure 6a) Amastigotes de *Trypanosoma cruzi* dans les cellules de l'hôte.

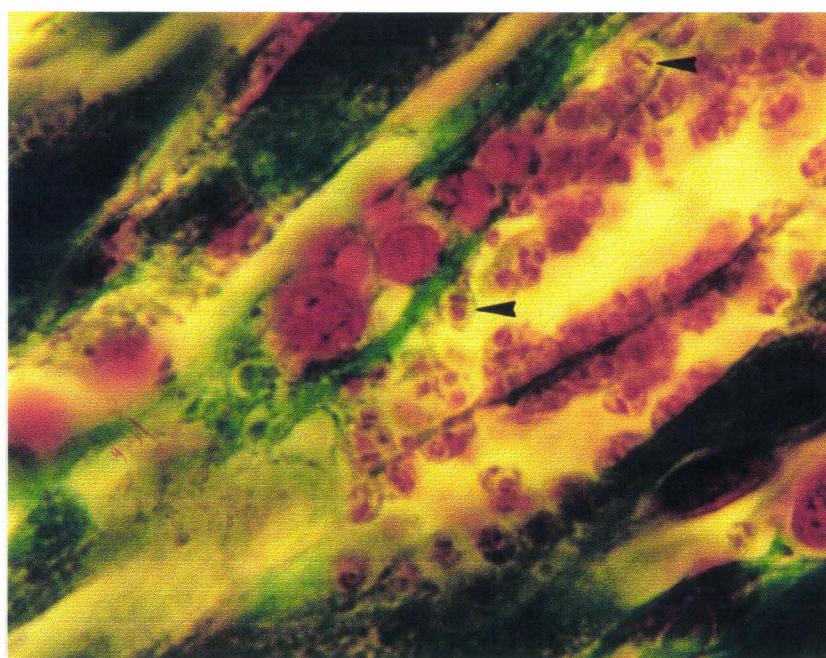
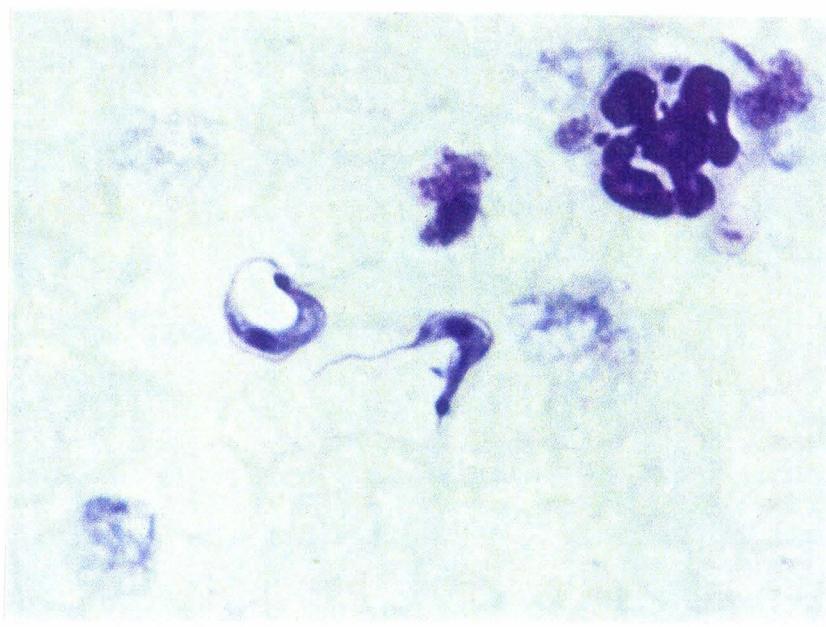


Figure 6b) Trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* dans la circulation sanguine.



d'insuffisance cardiaque. La symptomatologie est dominée par des palpitations, des étourdissements, des syncopes, une dyspnée, un oedème et des douleurs thoraciques. La radiographie du thorax permet d'apprécier l'hypertrophie cardiaque tandis que l'électrocardiogramme révèle des troubles typiques du rythme et de la conduction ventriculaire. La complication la plus grave est l'embolie pulmonaire, aboutissant à la mort subite. La phase chronique peut s'accompagner d'une arythmie de n'importe quel type. On note fréquemment un syndrome de bradycardie-tachycardie où alternent des accès de bradycardie sinusale et un bloc sino-auriculaire, ainsi que des extrasystoles ventriculaires.

Les séquelles digestives (**viscéropathie chagasiche**). L'appareil digestif peut être atteint chez le chagasiche chronique, en n'importe quel point, mais le plus souvent au niveau de l'oesophage et du côlon atteignant parfois des dimensions monstueuses. On note parfois une dilatation progressive de l'oesophage, accompagnée de régurgitation et de dysphagie plus ou moins sévère. La radiologie de l'oesophage peut révéler des anomalies de la contraction aux stades initiaux de la maladie. De même, le manque de coordination des mouvements du côlon aboutit à une constipation intense et à une importante dilatation. Les complications les plus graves de ce mégacôlon sont les fécalomes et le volvulus aigu. Un mégaoesophage et un mégacôlon peuvent coexister avec une cardiopathie plus ou moins importante (DE REZENDE. J.M. 1979).

La maladie de Chagas chronique peut déterminer une atteinte du système nerveux central, périphérique ou végétatif (**neuropathie chagasiche**). Les altérations neurologiques sont les moins étudiées, dans certaines régions d'endémie, on note des cas de parésie, de troubles fonctionnels cérébelleux, de convulsions et de troubles psychiatriques qui sont la conséquence de lésions du SNC ou de lésions secondaires à un épisode aigu de méningo-encéphalite survenu en phase aiguë.

III. 4. Diagnostic

Il existe plusieurs façons de mettre en évidence la présence du parasite chez un malade infecté par *T.cruzi*. Mais le problème se pose au niveau de la spécificité et la sensibilité des différentes méthodologies qui ont été décrites. De même, la phase dans laquelle se trouve le sujet soupçonné d'être infecté joue un rôle pour le choix de la méthode adéquate. On peut dire qu'il existe les méthodes suivantes:

III. 4. 1. Méthodes parasitologiques

Examen direct: très utile pendant la phase aiguë de la maladie, celui-ci consiste en l'observation microscopique des trypomastigotes dans le sang périphérique. Les techniques les plus souvent utilisées sont le frottis mince, la goutte épaisse ou l'examen à l'état frais. Dans les deux premières, on doit chercher le parasite après coloration, par contre à l'état frais, la recherche est plus facile du fait de la mobilité du parasite. Cette technique peut être améliorée par la concentration de parasites (HOFF 1974) ou par l'examen au microscope de l'interface ("buffy coat") obtenue entre les érythrocytes et la couenne sanguine constituée de leucocytes après centrifugation du sang recueilli en tube capillaire.

Méthodes indirectes: on utilise le xénodiagnostic qui consiste à faire piquer le malade par des triatomines non parasités élevés au laboratoire (BRUMT 1914). Environ 40 nymphes sont réparties à raison de 10 par boîtes et les boîtes sont placées sur le malade présumé de façon qu'il puisse être piqué par les insectes. On examine les triatomines 30 puis 60 jours plus tard, à la recherche de trypanosomes dans leurs selles ou leur intestin.

L'hémoculture est une technique pratiquée afin d'amplifier le parasite en milieu de culture liquide approprié. Cela consiste à prélever un échantillon de sang de patient que l'on centrifuge avant l'inoculation du milieu afin de suivre la croissance des parasites dans les cas positifs.

III. 4. 2. Méthodes sérologiques

La démonstration d'anticorps spécifiques anti-*T.cruzi* dans les sérums de patients est importante pour le diagnostic de la trypanosomiase américaine. Parmi les diverses épreuves sérologiques pouvant servir au diagnostic de l'infestation par *T.cruzi*, les plus utilisées sont les suivantes:

Réaction de fixation ou de déviation du complément: dite de GUERREIRO MACHADO 1913, est la plus utilisée. Lorsqu'elle est effectuée avec un antigène extrait de trypanosomes de culture, elle est assez sensible et spécifique. Plusieurs améliorations ont été apportées à cette technique afin d'augmenter ses performances (TANDON et coll. 1979, GARCIA et coll. 1995).

Epreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI): celle-ci consiste à fixer des formes parasitaires, en général des épimastigotes, au formaldéhyde ou glutaraldéhyde comme source d'antigènes sur des lames avant de les incuber avec les sérums de patients (CAMARGO 1966). Cette réaction permet de dépister l'infection en phase aiguë précocément par rapport à l'hémagglutination indirecte (CERISOLA et coll. 1970). Dernièrement, des formes parasitaires correspondant aux amastigotes ont été utilisées dans le but d'améliorer à la fois la spécificité et la sensibilité du test (MATSUMOTO 1993).

Epreuve d'hémagglutination indirecte (HI): cette réaction consiste à fixer l'antigène parasitaire à la surface des globules rouges. Les antigènes sont des fractions polysaccharidiques de *T.cruzi* obtenus selon la technique de FURTADO et PELLEGRINO 1956. Des produits parasitaires glycoprotéiques peuvent être utilisés aussi. Ces globules rouges sensibilisés peuvent s'agglutiner en présence d'anticorps anti-*T.cruzi*.

Epreuve d'agglutination directe: les sérums de patients chagasiques peuvent induire l'agglutination de formes vivantes du parasite, mais ce phénomène est observé lors de l'utilisation de sérums d'individus normaux. Pour améliorer le test, l'antigène est constitué

d'épimastigotes entiers traités par la trypsine et fixés au formaldéhyde avant d'être filtrés pour empêcher une auto-agglutination. Le traitement au 2-mercaptopropanoïde permet d'augmenter la spécificité (STORNI et coll. 1975).

Agglutination au latex, on se sert de particules de polystyrène (latex) sur lesquelles sont adsorbés des extraits de *T.cruzi*; après incubation avec les sérum de patients chagasiques, les anticorps reconnaissent l'antigène parasitaire et vont provoquer ainsi une réaction d'agglutination (HUNGERER et coll. 1970).

Epreuve immunoenzymatique (ELISA: pour Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), d'une façon analogue à des tests d'immunofluorescence, les réactions immunoenzymatiques peuvent être réalisées avec des extraits parasitaires et plus récemment des antigènes purifiés adsorbés sur une plaque en polyvinyle ou sur divers autres supports. Ainsi, SCHECHTER et coll. (1983), DRAGON et coll. (1985) ont utilisé une glycoprotéine de 90 kDa de poids moléculaire (GP90) avec une sensibilité et une spécificité non négligeables. Des anticorps monoclonaux dirigés vis-à-vis des épitopes glycaniques présents, dans les produits d'excrétion-sécrétion du parasite peuvent être utilisés comme marqueurs de la phase aiguë (OUAISI 1991). Des polypeptides parasitaires obtenus par génie génétique ont été éprouvés avec des résultats plus ou moins satisfaisants (CETRON et coll. 1992, KRIEGER et coll. 1992, , GRUBER et ZINGALES 1993). Dans le contexte de l'ELISA, des peptides synthétiques dérivés des antigènes parasitaires libérés pendant la phase aiguë de l'infection (SAPA antigens) et aussi dérivés des antigènes de la forme trypomastigote (VERGARA et coll. 1992, PERALTA et coll. 1994) ont été utilisés avec un succès relatif.

D'autres techniques utilisent la réaction ELISA pour la détection des antigènes parasitaires circulants plutôt que des anticorps dans les sérum et/ou liquides biologiques des patients. Ainsi, des antigènes circulants ont déjà été mis en évidence dans les sérum (ARAUJO et coll. 1981) et dans les urines des patients chagasiques (FREILIJ et coll 1987). Cette approche peut avoir un intérêt pour le diagnostic de la maladie de Chagas congénitale et pour l'évaluation des effets d'un traitement.

D'autres techniques dérivées de l'ELISA se sont développées et correspondent à des tests mettant en compétition des anticorps de patients et des anticorps monoclonaux produits vis-à-vis d'antigène(s) du parasite. Ainsi LEMESRE et coll. 1986 ont développé le CEIA (pour "competitive enzyme immunosorbent assay"). PAN et coll. 1992 ont développé le EIA pour "enzyme immuno assay" qui utilise des sphères de polystyrène sensibilisées avec des antigènes parasitaires.

Finalement, la technique du Dot a été utilisée pour tester le pouvoir diagnostic d'antigènes solubles et aussi d'antigènes recombinants (LORCA et coll. 1992, CORRAL et coll. 1992).

III. 4. 3. Méthodes moléculaires

Récemment, avec le développement de techniques de biologie moléculaire, le diagnostic de la maladie de Chagas a également bénéficié de cette approche. Ainsi, la mise au point de la réaction d'amplification enzymatique (PCR pour Polymerase Chain Reaction) est un progrès notable puisqu'elle permet de détecter des quantités minuscules d'ADN parasitaire voir 0,015 fentogrammes même en présence d'un très grand excès d'ADN humain comme c'est le cas dans le sang de sujets infectés. Cette méthode permet, en outre, d'identifier différentes souches de *T.cruzi* ce qui peut être avantageux pour les études cliniques et épidémiologiques. Ainsi, plusieurs travaux ont été réalisés en utilisant la PCR, celle-ci a permis d'amplifier différentes régions de l'ADN parasitaire (STURM 1989, AVILA 1991, RUSSOMANDO 1992, DIAZ 1992, AVILA 1993, GONZALEZ 1994, WINCKER 1994).

III. 5. Traitement

Actuellement, le traitement de la maladie de Chagas est basé sur l'utilisation de deux produits chimiques: le benznidazole et le nifurtimox. On dit qu'ils sont plus efficaces quand ils sont administrés précocément après l'infection, malheureusement cette situation n'est pas toujours évidente. De plus, il y a des controverses concernants leur efficacité. Ainsi, CERISOLA et coll 1974 ont trouvé 81% de guérison chez les patients chagasiques en phase aiguë qui ont suivi un

traitement avec le nifurtimox en Argentine, par contre, des patients chagasiqes en phase aiguë qui ont suivi le même traitement au Brésil ont obtenu une guérison qui varie de 33.3 à 38.4% (RASSI et FERREIRA 1971, CANCADO 1985). La même situation a été observée chez les patients chagasiqes en phase aiguë traités, par le benznidazole, 80% de guérison en Argentine (LEDESMA 1988) contre 51.3% au Brésil (RASSI 1982). Cette différence dans la sensibilité de *T. cruzi* au médicament a été corrélée avec l'hétérogénéité des souches parasitaires. Une corrélation entre résistance et distribution géographique a été aussi signalée (ANDRADE et coll. 1985, ANDRADE et coll. 1992). De plus, ces deux produits sont responsables d'effets secondaires correspondant à des atteintes digestives, insommies et neuropathies périphériques. Le nifurtimox est efficace en phase aiguë, mais pratiquement inactif sur les cas chroniques, en revanche, le benznidazole semble être bon dans les formes aiguës et chroniques, mais son pouvoir curatif n'est pas clair. Bref, à l'heure actuelle, le traitement de la maladie de Chagas est décevant (DE CASTRO 1993). La majorité des spécialistes s'accordent à considérer qu'un traitement trypanocide est sans intérêt en phase chronique, chez des malades qui présentent des lésions organiques patentées. Cependant, la recherche de nouveaux produits ayant un potentiel trypanocide se poursuit (CHIARI 1991, FAIRLAMB 1992, AVILA 1993).

III. 5. 1. Evaluation de la guérison

La négativation de la sérologie signe la disparition des trypanosomes de l'organisme. En cas d'infestations aiguës, l' administration de trypanocides entraîne souvent la négativation durable du xénodiagnostic et de la sérologie; cette évolution est considérée comme la preuve de la guérison. En revanche, chez le chagasiqe chronique, il est plus difficile de savoir si les examens parasitologiques sont véritablement négatifs. Le xénodiagnostic constitue la méthode classique, mais elle est peu sensible, d'où un risque de faux négatifs, de plus la méthode est lourde et elle ne peut être réalisée que dans des laboratoires spécialisés. Par contre, lorsque les résultats des examens sérologiques deviennent négatifs, on peut considérer que la guérison **est** certaine. Cependant, la plupart des tests sérologiques conventionnels restent positifs **après** traitement (KRETTLI et coll 1982). Récemment, la détermination du titre d'anticorps lytiques

dirigés contre les trypomastigotes de *T.cruzi*, par un test de lyse en présence du complément, serait le signe d'une infestation en évolution, de sorte que leur disparition ultérieure signifierait la guérison (GALVAO 1993). Deux autres tests ont été envisagés pour évaluer la guérison, ainsi GAZINELLI et coll 1993 ont utilisés une glycoprotéine parasitaire dans un test ELISA. Des antigènes solubles libérés par des trypomastigotes ont été également utilisés (KRAUTZ 1994). Malheureusement, le fait qu'on utilise le parasite total, pour récupérer les antigènes d'excretion sécrétion ou pour la purification de protéines limite son utilisation à grande échelle. Finalement, l'amplification de l'ADN par la technique de PCR a été envisagée avec un succès relatif (BRITTO 1995).

Il y a de rares cas où l'on peut observer une guérison spontanée (ZELEDON et coll. 1988, THOMAZ et DEANE 1984). Mais des études expérimentales suggèrent de prendre ces cas avec beaucoup de précaution (MAGALHAES et ANDRADE 1994).

IV. IMMUNOLOGIE DE L'INFECTION CHAGASIQUE

IV. 1. Résistance naturelle

Les animaux à sang froid et les oiseaux manifestent une immunité naturelle vis-à-vis de l'infection par *T.cruzi* (BRENER 1973). En revanche d'autres ordres de mammifères, notamment l'homme, ont une faible résistance naturelle à l'infection chagásique.

Cependant, il existe une grande variation entre espèces quant à leur degré de susceptibilité au parasite. Par exemple, alors que l'opossum et le tatou présentent une infection non mortelle, caractérisée par une parasitémie très faible en l'absence d'altérations tissulaires, des animaux domestiques comme le chien et le chat, ainsi que certains animaux de laboratoire infectés expérimentalement, présentent une forte parasitémie et des atteintes tissulaires notables. Par ailleurs, l'inoculation de parasites est fatale pour des singes Cebus alors que les singes Rhésus développent une infection qui n'est pas mortelle (TORRES 1958, MARDEN 1970).

IV. 2. Réponse immunitaire au cours de l'infection par *T.cruzi*

Tout d'abord il faut rappeler que le système immunitaire est complexe mais parfaitement cohérent qu'il permet la reconnaissance, le "processing" et la dégradation des molécules du non-soi (antigènes) dangereuses pour l'organisme des vertébrés. La maladie de Chagas n'est pas une exception , puisque l'hôte développe une réponse immune vis-à-vis du *Trypanosoma cruzi*. Ainsi, très rapidement après l'infection, aussi bien chez l'homme que chez les animaux, le nombre de trypomastigotes circulants pendant la phase aiguë de l'infection diminue progressivement et les parasites disparaissent complètement de la circulation sanguine pendant la phase chronique de la maladie. Le parasite persiste dans les tissus de l'hôte durant toute sa vie et stimule ainsi de façon permanente son système immunitaire. Des mécanismes de défense à médiation humorale et cellulaire semblent jouer un rôle important dans la résistance à l'infection chagásique (TRISCHMANN et coll. 1978).

IV. 3. Immunité à médiation humorale

Après une infection par *T.cruzi*, parallèlement à la production d'immunoglobulines non spécifiques, une réponse spécifique se met en place. Cette réponse anticorps est caractérisée d'abord par une prédominance des anticorps de type IgM ensuite des IgG et des IgA (TEXEIRA et SANTOS-BUCH 1974). Elle persistera tout au long de la phase chronique. Au cours de la phase aiguë d'infection, le niveau de parasitémie décrète très rapidement au moment où la réponse anticorps augmente, indiquant le rôle protecteur des anticorps contre les formes circulantes du parasite (KRETTLI et BRENER 1976, BRENER 1980). Ainsi, des animaux mauvais producteurs d'anticorps sont plus sensibles à l'infection chagrasique (KIERSZEMBAUM et HOWARD 1976). Aussi, le transfert de sérum immun à des souris athymiques retarde l'apparition des parasites et prolonge la survie des animaux ainsi transférés (KIERSZEMBAUM 1980). Des évidences indirectes plaident en faveur de l'implication des anticorps spécifiques dans le contrôle de l'infection: des expériences chez la souris ont montré que le transfert de cellules spléniques immunes déplétées en lymphocytes B n'induit pas de protection (SCOTT 1981). Cependant, l'étude de l'infection chagrasique dans le modèle expérimental de la souris a montré le développement d'une importante activation polyclonale, voire non spécifique, des lymphocytes B (ORTIZ-ORTIZ et coll. 1980, D'IMPERIO LIMA et coll. 1985, 1986). Les niveaux d'expression des isotypes sont augmentés, tant au niveau des cellules sécrétant les immunoglobulines qu'au niveau des immunoglobulines sériques, avec une activation préférentielle des isotypes IgG2a et IgG2b (MINOPRIO et coll. 1988, SPINELLA et coll. 1992).

IV. 4. Mécanisme d'action des anticorps

En particulier, les anticorps lytiques semblent jouer un rôle essentiel dans la protection contre le parasite (KRETTLI et BRENER 1982). De plus, certains anticorps anti-*T.cruzi* ont la capacité de se fixer à des composants de surface du parasite et d'inhiber l'adhésion et la pénétration du parasite dans la cellule hôte. Par ailleurs, les anticorps lytiques peuvent induire

une lyse directe du parasite en présence du complément. De même, les anticorps peuvent par le biais des mécanismes de type ADCC participer à l'élimination du parasite. L'existence de ce mécanisme a déjà été confirmée *in vitro* vis-à-vis des formes épimastigotes en utilisant des cellules spléniques de souris ou de rat (ABRAHAMSHON et DA SILVA 1977, SANDERSON et coll. 1978), des éosinophiles et des neutrophiles de rat (LOPEZ et coll. 1978) et des granulocytes humains (MADEIRA et coll. 1979). Des expériences similaires sur les formes trypomastigotes ont montré l'implication des lymphocytes, des éosinophiles et des neutrophiles humains dans le mécanisme d'ADCC (KIERSZEMBAUM et HAYES, 1980). Des travaux récents, *in vitro*, ont montré que des plaquettes de souris en présence d'une fraction d'IgG purifiée à partir de sérum de souris en phase chronique, sont capables de lyser des formes trypomastigotes sanguicoles. Ce phénomène paraît dépendant du récepteur plaquettaire pour la fraction C3b du complément (UMEKITA et MOTA 1989). De même, les mastocytes avec des anticorps de sous-classe IgG1, IgG2a, et IgG2b pourraient être impliqués dans la destruction de trypomastigotes sanguicoles par un mécanisme d'ADCC (TAMBOURGI et coll 1989).

IV. 5. Immunité à médiation cellulaire

A côté de la réponse humorale développée au cours de l'infection, le rôle de l'immunité cellulaire dans la résistance à l'infection est loin d'être négligeable. Les réactions d'hypersensibilité retardée ont été étudiées chez l'homme et les animaux de laboratoire infectés par le parasite. Le signe de Romana, caractérisé par une infiltration de lymphocytes et des lésions granulomateuses, est un complexe ophtalmo-ganglionnaire qui se situe au point d'inoculation du parasite par le vecteur. Les lésions histopathologiques rapportées chez les malades chagasiques ressemblent à celles observées chez les malades atteints d'autres infections chroniques donnant naissance à des réactions d'hypersensibilité retardée telles que la tuberculose, la syphilis ou le rhumatisme articulaire aigu (TEXEIRA 1979). Cependant, les résultats de tests cutanés sont très variables en fonction de la nature de l'antigène utilisé (ABRAHAMSOHN et coll. 1981, ZELEDON et PONCE 1974). Le rôle de l'immunité à médiation cellulaire dans l'élimination des parasites lors de la phase aiguë de infection n'est pas

clairement établi. Néanmoins, des évidences obtenues dans les modèles expérimentaux plaignent en faveur de cette possibilité.

IV. 5. 1. Rôle des lymphocytes T

Le rôle des lymphocytes T dans le contrôle de la parasitémie et la sensibilité à l'infection par *T.cruzi* a déjà été démontré (KIERSZEMBAUM et PIENKOWSKI 1979, SCHMUNIS et coll. 1971, RUSSO et coll. 1984, GONZALVES DA COSTA et coll. 1984, TRISCHMAN 1983, TARLETON, 1991). Par exemple, le traitement des souris par des anticorps antithymocytes ou la thymectomie néonatale ainsi que la déplétion de lymphocytes T par des anticorps monoclonaux (anti-CD4 ou anti-CD8) ou l'infection de souris nu/nu, montrent que la parasitémie est supérieure à la normale et les souris ne survivent pas à la phase aiguë. La parasitémie élevée peut être dûe à l'absence de synthèse des anticorps spécifiques par les cellules B et qui nécessitent une collaboration T-B, ou à l'absence de certaines lymphokines T responsables de l'activation de macrophages qui a comme conséquence la lyse des parasites intracellulaires. Une activité de type T auxiliaire, spécifique du parasite, a été décrite (BURGESS et coll. 1981). En effet, des souris ont pu être protégées par transfert passif de clones de lymphocytes T spécifiques de *T.cruzi* (NICKELL et coll. 1987). Par ailleurs, le transfert d'une sous-population enrichie en T confère une meilleure protection vis-à-vis de l'infection comparativement au transfert d'une population riche en B (REED 1980). Cependant, la participation relative des différentes populations lymphocytaires B et T, mais aussi des sous-populations T (CD4 et CD8) dans la résistance à l'infection est très controversée.

Les travaux rapportés par ARAUJO (1989) ont montré que le traitement de souris par des anticorps anti-CD4+ augmente la susceptibilité des animaux à l'infection par rapport aux souris non traitées. Deux sous-populations de lymphocytes T CD4, Th1 et Th2, ont été décrites selon leur profil de sécrétion de lymphokines (MOSSMAN et coll. 1986). Dans le modèle d'infection de la souris par *Leishmania*, une stricte dichotomie a été montrée entre ces deux sous-populations, les lymphocytes Th1 qui secrètent interféron- γ IL-2, TNF-a, et GM-CSF sont associés à la résistance de la souris à l'infection alors que les lymphocytes Th2 qui sécrètent

IL-4, IL-5, IL-10, et un peu de GM-CSF sont responsables de la sensibilité à l'infection (REED et SCOTT, 1993, BRETSCHER et coll. 1992). Dans l'infection par *T.cruzi*, il a été clairement démontré que le interféron- γ (Th1) est capable d'induire *in vivo* la résistance à l'infection en activant les macrophages (JAMES et coll. 1982, PLATA et coll. 1984, REED 1988). D'autres études ont montré aussi que la résistance à l'infection par *T.cruzi* est liée à la sécrétion augmentée de l'IFN- γ par la souris, par exemple les souches: BALB/c normale, BALB/c.Xid et C57BL6/J (TORRICO et coll. 1991, MINOPRIO et coll. 1993, HOFT et coll. 1993). Des lymphokines comme l'IL-2, l'IL-3 ou le GM-CSF (REED et coll. 1984, TARLETON et KUHN 1984, CHOROMANSKI et KUHN 1985, REED et coll. 1987, 1990, HO et coll. 1992) présentent également la propriété d'augmenter la résistance à l'infection par *T.cruzi*. Ainsi, la résistance à l'infection pourrait être dépendante de la stimulation préférentielle des lymphocytes Th1 et/ou de l'inhibition des lymphocytes Th2. Cependant, très tôt dans l'infection, des cytokines telles que l'IL-10 (Th2) sont produites (SILVA et coll. 1992, REED et coll. 1994). Donc, dans l'infection chagásique les deux types de réponse (Th1 et Th2) sont bien présentes et la production de cytokines Th2 semble neutraliser les effets anti-parasitaires des cytokines de type Th1.

Si les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle dans le développement de la résistance à l'infection, il en est de même pour les lymphocytes T CD8+. Ainsi, TARLETON (1990) a montré que des souris résistantes C57BL/6, déplétées en lymphocytes T CD8+ pendant les premières phases de l'infection, deviennent très susceptibles à l'infection par *T.cruzi* par rapport à des souris contrôles. Cependant, le contrôle de l'infection observé pendant la phase chronique ne serait pas assuré par les lymphocytes T CD8+. Le mécanisme d'action de ces cellules CD8+ n'est pas encore bien défini. Toutefois, certains auteurs, leur attribuent un rôle dans la cytotoxicité vis-à-vis des cellules infectées présentant l'antigène parasitaire à leur surface (KUHN et MURNANE 1977, NICKELL et coll. 1993). Elles seraient également capables de lyser des cellules saines ou endommagées de l'hôte présentant des antigènes parasites à leur surface ou d'agir par d'autres mécanismes (RIBEIRO DOS SANTOS et HUDSON 1980, SATO et coll. 1992), De récentes études ont mis en évidence que la B2microglobuline (B2m), une protéine associée aux antigènes de MHC de classe I, est aussi fonctionnelle dans la présentation des antigènes aux

cellules T CD8+. En effet, des souris dont le gène codant pour la B2m a été rendu inactif, n'expriment pas les produits du gène MHC de classe I et comme conséquence, l'activité cytotoxique des leurs cellules CD8+ est quasiment absente. Cependant, chez ces souris B2m-déficientes (B2m-), le développement des cellules T CD4 est apparemment normal. L'infection par *T.cruzi* de souris B2m- a pour conséquence une moindre résistance à l'infection par rapport à des souris B2m+ (TARLETON 1992). Cependant, bien que la susceptibilité à *T.cruzi* soit augmentée chez les souris B2m-, elles donnent une meilleure réponse que les B2m+ en terme de production de lymphokines puisque les souris déficientes en B2m produisent des taux plus élevés d'IL-2 et d'IFN- γ après stimulation par des mitogènes. Ces taux importants d'IL-2 et d'IFN- γ chez les souris B2m- impliquent: 1) que la suppression de la production d'IL-2 et de l'expression des récepteurs à IL-2, qui a été décrite au cours de la phase aiguë de l'infection à *T.cruzi*, n'est pas directement liée à l'absence de cellules T CD8+, et que des facteurs autres que les cellules T CD8+ sont probablement responsables de l'immunosuppression au cours de cette infection. 2) Puisque les souris B2m- produisent des taux élevés d'IFN- γ , cela veut dire que les lymphocytes T CD8+ ne sont pas les principales cellules productrices d'IFN- γ dans l'infection chagásique ou, peut-être, qu'ils correspondent à une vaine tentative du système immunitaire de l'hôte pour contrôler l'infection. Toutefois, des travaux récents ont mis l'accent sur le rôle des lymphocytes T CD4 et CD8. Ainsi des souris CD4- et CD8- présentent des taux de parasitémie et mortalité élevés par rapport à des souris CD4+ et CD8+, le profil de sécrétion de lymphokines est aussi différent chez les souris CD4- et CD8- mais une stricte dichotomie Th1-Th2 n'est pas évidente (ROTTENBERG et coll. 1993, 1995a,b).

Un schéma global montrant l'importance des populations cellulaires suivant la phase de l'infection a été proposé (TARLETON 1991). Il suggère que les lymphocytes T seraient responsables du contrôle de l'infection pendant ses premières phases. Leur rôle décrète progressivement pour laisser la place aux cellules B productrices d'anticorps qui vont maintenir la résistance observée pendant la phase chronique. Cependant, de récentes études ont montré que les lymphocytes T peuvent jouer un rôle sur la réPLICATION du parasite pendant la phase aiguë mais aussi durant la phase chronique (TARLETON 1995).

IV. 5. 2. Rôle du macrophage

Trypanosoma cruzi est un parasite à multiplication strictement intracellulaire qui peut infecter *in vivo* différents types de cellules phagocytaires comme les macrophages, ou non phagocytaires comme les cellules nerveuses, les cardiocytes, les cellules endothéliales. De nombreux mécanismes ont été évoqués pour expliquer la pénétration du parasite dans les cellules. Le macrophage, en particulier, représente une cellule hôte pour *T.cruzi*, cependant, une fois activé, il joue un rôle très important dans l'immunité vis-à-vis du parasite. Certains auteurs ont montré que dans le cas de *T.cruzi*, l'activation du macrophage serait sous la dépendance de certains facteurs produits par les cellules phagocytaires (NOGUEIRA et coll. 1981). Les premiers travaux sur les mécanismes de cytotoxicité des macrophages vis-à-vis du parasite ont mis en cause les métabolites de l'oxygène générés par l'explosion respiratoire qui suit l'infection du parasite (NATHAN et coll. 1979). Cependant, si le macrophage est capable de détruire des parasites intracellulaires, ce phénomène serait médié par un mécanisme indépendant du métabolisme de l'oxygène (McCABE et MULLINS 1990, VRAY et coll. 1991). Il est vraisemblable que des dérivés nitrés soient impliqués dans l'activité trypanocide de ces cellules (RUSSO et coll. 1989, GAZINELLI et coll. 1992, VESPA et coll. 1994). D'autres auteurs ont montré que certains interleukines, comme l'IL-4, sont capables d'activer les macrophages pour augmenter leur pouvoir de phagocytoses et l'activité trypanocide (WIRTH 1989).

V. MECANISMES D'ECHAPPEMENT ET IMMUNOPATHOLOGIE

V. 1. Mécanismes d'échappement

Au cours de son évolution, le parasite a développé des mécanismes d'échappement au système de défense de l'organisme, en particulier pour éviter la lyse par le complément. Ainsi, les formes épimastigotes, non infectieuses, qui se développent chez l'insecte sont extrêmement sensibles au système lytique du complément de l'hôte vertébré. Par contre, les trypomastigotes métacycliques, forme infectieuse présente dans les fèces du vecteur et les formes sanguines de l'hôte mammifère, résistent à la lyse par le complément. La capacité du parasite à échapper à la lyse par le système du complément est due au fait que la surface des trypomastigotes se comporte différemment de celle des épimastigotes en regard de l'assemblage d'une C3 convertase alterne efficace. Par ailleurs, les trypomastigotes ont la capacité de libérer une protéine qui inhibe la formation d'une C3 convertase alterne en phase liquide ou associée à une membrane (FISCHER et coll. 1988). En fait, les différentes formes parasitaires sont capables de fixer le C3 par la voie alterne. Cependant, les formes infectieuses sont incapables d'activer la C3 convertase de la voie alterne car celle-ci fixe faiblement le facteur amplificateur B et le facteur H (protéolytique) (JOINER et coll. 1986, SCHENKMAN et coll. 1986). Un autre mécanisme a été décrit pour la souche Y de *T.cruzi* qui produit une molécule semblable au DAF (decay-accelerating-factor) des cellules de mammifères qui interfère avec la formation d'un C3b actif et prévient normalement l'auto-activation de la voie alterne chez les mammifères. Finalement, le C3 fixé sur la membrane du trypomastigote est dégradé en C3bi inactif marquant l'arrêt de la cascade qui conduit au C5b-9, complexe lytique du complément. D'autres travaux ont montré que les amastigotes peuvent être trouvés dans la circulation sanguine et qu'ils échappent à la lyse par le complément malgré la formation du complexe C5b-9. Il semble que le complexe C5b-9 ne soit pas inséré dans la membrane parasitaire et qu'ainsi, le pore lytique ne se forme pas (Iida et coll. 1989).

Le parasite *T.cruzi*, est un parasite à multiplication intracellulaire, une fois dans la cellule, il s'échappe du phagolysosome pour se diviser dans le cytoplasme de la cellule. Cette possibilité est due au fait que le parasite sécrète une hémolysine dont l'activité est optimale à pH acide.

Cette protéine est immunologiquement apparentée au composant C9 du complément et à la perforine de souris. Elle est capable de former des pores dans la membrane du phagolysosome, ce qui permet au parasite de s'échapper dans le cytoplasme de la cellule (ANDREWS et WHITLOW, 1989, ANDREWS et coll. 1990, LEY et coll. 1990). La propriété de la trans-sialidase de *T.cruzi* de transférer à la surface du parasite les molécules d'acide sialique pourrait faciliter l'action de l'hémolysine de *T.cruzi* et contribuer à la résistance à la lyse par le complément (KIPNIS et coll. 1981, SCHENKMAN et EICHINGER 1993, HALL et JOINER 1993). D'autres facteurs peuvent contribuer à la survie du parasite chez son hôte. Par exemple, le fait que les parasites sont capables d'ingérer des molécules de l'hôte à leur surface (CHESS et coll. 1983) qui les protègent face aux mécanismes de défense de l'hôte. Un facteur additionnel qui pourrait être impliqué dans l'échappement du parasite à la réponse immunitaire est sa capacité à libérer des antigènes qui pourraient dévier la réponse immunitaire.

L'immunosuppression a été également associée depuis longtemps à l'infection chagasiqne aiguë aussi bien chez l'homme que dans les modèles expérimentaux. On sait que des trypomastigotes sanguicoles sont capables d'inhiber la capacité de prolifération des lymphocytes à un traitement par des mitogènes tels que la concanavaline A (Con A) ou le lipopolisaccharide (LPS). De même, des cellules spléniques normales en incubation avec des cellules spléniques de souris infectées ne sont pas capables de proliférer suite à l'addition de Con A ou LPS (RAMOS et coll. 1979, MALECKAR et KIERSZEBEAM 1983). Bien que le mécanisme de cette immunosuppression soit loin d'être élucidé, il y a des suggestions pour expliquer l'anergie observée pendant la phase aiguë de l'infection par *T.cruzi*. Ainsi, certains auteurs parlent de cellules T suppressives (RAMOS et coll. 1979), de macrophages suppresseurs (REED et coll. 1983) ou de cellules NK (HATCHER et coll. 1981). Par ailleurs, des altérations au niveau de l'expression de certains marqueurs lymphocytaires comme le CD3, CD4, CD8, TcR et le récepteur à l'IL-2 ont été montré (SZTEIN et coll. 1990, SZTEIN et KIERSZENBAUM 1992). Les produits de sécrétion du parasite seraient impliqués dans le phénomène d'immunosuppression (KIERSZENBAUM et coll. 1990). Par ailleurs, la prolifération lymphocytaire est restaurée après addition de l'IL-2 exogène (TARLETON et KUHN 1984, CHOROMANSKI et KUHN 1987) ce qui suggère que la suppression de la

production de l'IL-2 joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis du parasite (HAREL-BELLN et coll. 1983). De récents travaux ont mis en évidence que l'infection par *T.cruzi* inhibe d'une façon sélective l'expression des gènes codant pour l'IL-2 aussi bien que d'autres gènes impliqués dans l'activation du gène codant pour l'IL-2 et dans la prolifération lymphocytaire, tels que les gènes *c-myc* et *c-fos* (CRABTREE 1989, SOONG et TARLETON 1992). Enfin, KIERSZEBEAM et coll. (1995) ont montré que *T.cruzi*, aussi bien que les produits libérés par des formes trypomastigotes ou TIF (pour Trypanosome Immunosuppressive Factor) sont capables d'induire une diminution de la transcription du gène codant pour la protéine 55 (p55) du récepteur à l'IL-2 mais non du gènes *c-myc* et *c-fos*. Il semble donc que l'immunosuppression est un phénomène complexe qui serait la résultante de plusieurs facteurs de l'hôte et/ou du parasite.

V.2. Immunopathologie

V. 2. 1. Activation polyclonale des lymphocytes T

Au cours de l'infection aiguë, les lymphocytes T sont pour la plupart activés. Les lymphocytes T, CD8+, exercent des fonctions cytotoxiques non spécifiques ou des fonctions suppressives. Les lymphocytes T, CD4+, présentent des fonctions auxiliaires vis-à-vis des lymphocytes B puisque la déplétion des animaux par un anticorps monoclonal anti-CD4 *in vitro* abolit totalement l'activation polyclonale de ces dernières. La population de lymphocytes T CD4-CD8-, qui représente un très faible pourcentage des cellules spléniques est nettement augmentée au cours de la phase aiguë d'infection (MINOPRIO 1986, 1987, 1989). Cet état d'activation ou proliferation polyclonale pourrait expliquer, en partie, le phénomène d'immunosuppression. En effet, les cellules seraient dans un état d'activation maximale si bien qu'elles ne peuvent répondre à d'autres stimuli. Comme il a déjà été mentionné, les cellules T CD4 sont importantes pour le contrôle de la parasitémie, mais participent également à l'induction des phénomènes d'autoimmunité. Ainsi, chez les souris déplétées en T CD4, ni l'activation polyclonale des cellules B, ni la réponse des cellules T CD8 n'a été observée après

l'infection par *T.cruzi*. Les souris déplétées en T CD4 présentaient une pathologie moins grande au niveau des tissus.

V. 2. 2. Activation polyclonale des lymphocytes B

Il est connu depuis longtemps que l'infection humaine ou expérimentale par *T.cruzi* entraîne une hypergammaglobulinémie importante. Il y a une augmentation de la synthèse des IgG aussi bien que des IgM. Cette hypergammaglobulinémie est concomitante à une élévation massive du nombre de lymphocytes sécrétant des immunoglobulines, dans la rate ou les ganglions périphériques (D'IMPERIO LIMA et coll. 1985, 1986). Le profil isotypique de ces immunoglobulines est caractérisé par une augmentation préférentielle des isotypes IgG2a et IgG2b. La plupart de ces immunoglobulines n'ont pas de spécificité antiparasitaire. La régulation de la réponse immune se trouve alors perturbée, ce qui conduit à la perte du contrôle de la tolérance aux antigènes du soi, ainsi se déclenche un phénomène d'autoimmunité avec une production de quantités élevées d'autoanticorps (MINOPRIO et coll. 1988, SPINELLA et coll. 1989). Certains auteurs évoquent la présence d'une population lymphocytaire CD4-Th2 qui serait responsable de l'induction de l'activation polyclonale B comparable à celle observée chez les animaux en phase chronique avec une augmentation du taux des anticorps de type IgG2a et IgG2b (SPINELLA et coll. 1990).

V. 2. 3. Pathologie chronique et lymphocytes T autoréactifs

La maladie de Chagas présente sa forme la plus grave au cours de la phase chronique, lorsque les parasites sont rares dans le circulation et dans les tissus. A ce stade, les nombreux infiltrats inflammatoires composés de cellules mononucléées responsables de lésions cardiaques ou nerveuses ne sont pas directement associés à des parasites tissulaires (BEN-YOUNES-CHENNOUFI et coll. 1988). En effet, la cardiopathie chagasiche a pu être reproduite par transfert de cellules immunocompétentes d'animaux chroniques à des animaux sains syngéniques (LAGUENS 1981). Plus tard HONTEBEYRIE-JOSCOWICKZ et coll. (1987)

ont montré que les lymphocytes CD4 sont responsables de ce transfert. Des lignées cellulaires obtenus à partir d'organes lymphoides ou du sang de souris infectées sont capables de reproduire la pathologie, après stimulation par un extrait parasitaire total, lorsqu'elles sont inoculées à des animaux sains soit par voie systémique soit par voie intraneurale en l'absence de tout parasite. Curieusement, la spécificité de ces lignées n'est pas restreinte aux antigènes parasites. Elles reconnaissent aussi des antigènes du système nerveux de la souris, leur conférant un caractère autoréactif.

V. 3. Réactivité croisée entre des antigènes parasites et des composants de l'hôte.

L'origine de la pathologie autoimmune dans la maladie de Chagas n'est pas encore totalement élucidée. Cependant, deux hypothèses sont privilégiées pour expliquer ce phénomène: a) Une forte réponse polyclonale T-dépendante pendant la phase aiguë et chronique de l'infection, responsable pour la prolifération de clones autoréactifs; b) Des antigènes parasites portent des séquences en commun avec des molécules de l'hôte mammifère, ce qui pose la question de la réactivité croisée impliquée dans le développement de l'auto-immunité (HUDSON et HINDMARSH 1985).

En effet, en ce qui concerne la deuxième hypothèse, depuis la description des auto-anticorps qui sont capables de réagir avec des cellules cardiaques normales par COSSIO et coll. (1974), plusieurs travaux ont montré la présence d'auto-anticorps dans les sérums de souris infectées par *T.cruzi* ou de patients atteints de la maladie de Chagas. Ainsi, des IgG anti-laminine ont été caractérisées dans la maladie de Chagas (SZARFMAN et col. 1982). De plus, des IgG purifiées à partir des sérums de patients chagasiques en phase chronique sont capables de réagir avec les récepteurs B-adrénnergiques du cœur (BORDA et coll. 1984). Les auto-anticorps qui présentent une réactivité avec les neurones des mammifères ont été détectés dans les sérums de souris infectées par *T.cruzi* (OUAISSI 1989), ainsi que des anticorps qui réagissent à la fois vis-à-vis des protéines ribosomales humaines et du parasite ont été également mis en évidence dans le sérum de patients chagasiques (BONFA et coll. 1993, SKEIKY et coll. 1993). De même, des

sérum provenant de patients chagasiques avec ou sans symptômes cliniques, contiennent de taux d'anticorps dirigés contre des antigènes tels que l'actine, la myosine, la tubuline, la myoglobine, la spectrine, la laminine, ainsi que le fragment 3 de globules rouges (UNTERKIRCHER 1993). D'autre part, VAN VOORHIS et EISEN (1989) ont caractérisé une protéine de surface de *T.cruzi* associée au flagelle, de poids moléculaire 160 kDa. Les anticorps dirigés vis-à-vis de cette protéine sont capables de réagir avec le tissu nerveux humain, de rat et de souris et reconnaissent ainsi un composant de 48 kDa. L'épitope mis en jeu dans cette réactivité croisée semble être limité à une région de 12 acides aminés (VAN VOORHIS et coll. 1991). Toutefois, les exemples que nous avons discutés n'excluent pas l'hypothèse d'un mimétisme moléculaire consistant en l'expression à la surface du parasite d'antigènes présentant des homologies avec ceux de l'hôte (EISEN et KAHN 1991). Cette stratégie permettrait de détourner la réponse immune de l'hôte, induisant ainsi une réponse de type autoimmun (PETRY et VAN VOORHIS 1991, FELIX et coll. 1993).

**VI. LES ANTIGENES DE *T.CRUZI* POUVANT
JOUER UN ROLE DANS L'INDUCTION D'UNE
IMMUNITE PROTECTRICE.**

En raison de la compléxité du cycle évolutif de *Trypanosoma cruzi*, le seul moyen de lutte contre la maladie de Chagas semble être la lutte antivectorielle. Ainsi, l'OMS et différents organismes latino-américains, en particulier au Brésil et Uruguay, ont lancé des programmes de lutte qui ont abouti à une baisse très significative de la transmission. Cependant, certaines régions ne semblent pas avoir été touchées par ces programmes. Aussi, les migrations, pour raisons économiques, des populations des foyers de transmission active vers les zones urbaines créent des concentrations d'individus infectés autour des grandes villes modifiant ainsi la répartition des zones géographiques affectées non seulement par la maladie de Chagas mais par d'autres maladies comme la Leishmaniose. De nouvelles stratégies de protection contre la maladie de Chagas telle que la vaccination sont controversées (BRENER 1986). En effet, aucun vaccin n'a pu être envisagé jusqu'à maintenant. Les approches moléculaires pour la définition des épitopes et des récepteurs T qui seraient relevant dans l'immunité protectrice pourraient aider à développer de nouvelles stratégies de vaccination sans oublier de poursuivre les efforts pour la lutte contre les vecteurs et le contrôle de la transmission non vectorielle.

Dans le présent chapitre nous essayerons de développer les antigènes parasitaires qui peuvent induire une immunité protectrice.

VI. 1. Les antigènes à potentialités vaccinantes

Des parasites entiers fixés, irradiés ou inactivés et plusieurs antigènes de *T.cruzi* ont été utilisés dans les études d'immunoprotection dans le modèle expérimental. Les résultats montrent que les trypomastigotes induisent un degré de protection meilleur par rapport aux epimastigotes et que les anticorps obtenus après immunisation sont capables de lyser les parasites *in vitro* en présence du complément (ZWEERINK et coll. 1984, ANDREWS et coll. 1985). Parmi les antigènes membranaires, une glycoprotéine de surface, de poids moléculaire 90 kDa, exprimée à tous les stades de développement du parasite a été identifiée (SNARY et HUDSON 1979). Cette molécule est capable d'induire chez la souris une protection significative vis-à-vis de l'infection par *T.cruzi* (SCOTT et SNARY 1979). Un autre composant

de 90 kDa qui représente une glycoprotéine de surface des trypomastigotes métacycliques (TEIXEIRA et YOSHIDA 1986) a été testée pour son activité protectrice en association avec divers adjuvants (GONZALEZ et coll. 1991). Cependant, on ignore l'importance relative des deux parties glycaniques et protéiques dans l'induction de cette immunité protectrice. Une autre molécule glycoprotéique de 72 kDa, spécifique des stades épimastigote et trypomastigote métacycliques a été utilisée dans des études d'immunoprotection chez la souris. En effet, cette molécule est capable d'induire par immunisation un degré de protection significatif après infection par des trypomastigotes métacycliques. Cependant, aucune résistance n'est développée après infection par des trypomastigotes sanguicoles (SNARY 1983). Récemment, deux glycoprotéines de 45 et 68 kDa de poids moléculaire, purifiées à partir d'épimastigotes ont été utilisées dans un protocole d'immunisation après leur incorporation dans un complexe appelé ISCOM (pour Immunostimulating complex). Il a été suggéré que l'ISCOM permet un meilleure présentation de l'antigène au système immunitaire. En utilisant cette approche, un degré de protection significatif a été obtenu, associé à une réponse immune humorale et cellulaire (ARAUJO et MOREIN 1991). Une autre glycoprotéine membranaire de 56 kDa purifiée à partir d'épimastigotes, utilisée dans les expériences d'immunoprotection chez la souris, semble capable d'induire une faible protection vis-à-vis d'une infection léthale par *T.cruzi* (HARTH, 1994). En ce qui concerne les **antigènes flagellaires**, SEGURA et coll (1977) ont testé différentes préparations antigéniques obtenues à partir d'épimastigotes de la souche Tulahuen correspondant aux extraits suivants: un homogénat total, une fraction membranaire, et une fraction flagellaire. Ainsi, les animaux immunisés avec la fraction flagellaire sont protégés. De plus, les souris immunisées avec la fraction flagellaire développent une pathologie cardiaque beaucoup plus réduite que les souris contrôles (RUIZ et coll. 1985). Ces résultats ont été confirmés avec l'utilisation d'une préparation antigénique flagellaire lyophylisée en association avec *Bordetella pertussis* comme adjuvant. Les souris immunisées avec cette préparation montrent une diminution de la parasitémie et de la mortalité lors de l'infection pour *T.cruzi* (RUIZ et coll. 1986). En plus, des anticorps monoclonaux anti-fraction flagellaire sont capables par transfert passif d'induire un degré de protection significatif (SEGURA et coll. 1986). Enfin, une fraction antigénique dérivée de la préparation flagellaire et contenant des composants

de poids moléculaires entre 50 et 150 kDa, induit une protection de 50% chez la souris (RUIZ et coll. 1990).

ROTTENBERG et coll. (1988) ont montré que des souris immunisées avec la fraction flagellaire présentent une réponse humorale mais développent aussi une réaction d'hypersensibilité retardée vis-à-vis de l'antigène parasitaire. Des travaux récents de clonage et de séquençage des antigènes de la fraction flagellaire ont permis de caractériser une séquence de 19 acides aminés. Le peptide synthétique correspondant est capable par immunisation chez la souris d'induire les mêmes propriétés immunologiques que celles obtenues avec la fraction flagellaire à savoir une réponse humorale et cellulaire (BUA et coll. 1991). Les protéines présentes dans le bâtonnet flagellar ou appelé PAR (pour Paraflagellar Rod Proteins) sont des structures uniques au flagelle du parasite (DE SOUZA and SOURO PADRON 1980), et sont capables d'induire par immunisation une protection vis-à-vis de l'infection expérimentale pour *T.cruzi* (WRIGHTSMAN et coll. 1995). Cependant, toutes les expériences de protection réalisées jusqu'à présent sont d'une portée limitée puisqu'elles représentent le résultat de l'immunisation avec une fraction antigénique composée de plusieurs molécules. Concernant les antigènes d'excrétion-sécrétion ou ESA, ils ont été déjà décrits dans certaines infections parasitaires naturelles ou expérimentales et correspondent à des produits libérés par le parasite dans le milieu extérieur. Ces antigènes sont généralement très immunogènes. Ainsi, dans le cas de la schistosomiase, l'immunisation de rats avec les produits d'excrétion-sécrétion du parasite ou SRP (Schistosomula Released Products) induit un niveau de protection significatif vis-à-vis de l'infection par *Schistosoma mansoni* (DAMONNEVILLE et coll. 1986). De même, dans le cas de la toxoplasmose, le transfert passif d'anticorps anti-ES chez le rat Fischer nude est capable d'induire un bon niveau de protection (DARCY et coll. 1988). Cependant, dans le cas de la Fascioliasis, l'immunisation avec des produits d'excrétion-sécrétion n'induit pas une protection vis-à-vis de l'infection par *Fasciola hepatica* (HAROUM et HILLYER 1986). Chez les trypanosomatidés, les antigènes d'excrétion-sécrétion sont appelés aussi exoantigènes (WEITZ 1960). CERBAN et coll. (1991) ont montré que l'immunisation des souris avec de exoantigènes entraîne une baisse de la parasitémie par rapport aux souris contrôles. De même le transfert passif de cellules ganglionnaires provenant de souris immunisés avec un exoantigène de

poid moléculaire 55 kDa est capable d'induire une protection à niveau de la parasitémie par rapport aux souris contrôles (GRUPPI et coll. 1995). Il faut noter que très peu de travaux ont été consacrés à l'étude du rôle biologique de ces antigènes dans le développement de l'immunité anti-*T.cruzi*. Cependant, OUAISSI et coll. (1990) ont caractérisé les immunogènes majeurs parmi les ESA des formes trypomastigotes. Par ailleurs, OUAISSI et coll. (1992) ont cloné et séquencé un ADNc codant pour une protéine de 24 kDa parmi les ESA. Enfin, les ESA sont capables d'induire par immunisation chez la souris BALB/c et le rat Fischer une protection significative contre l'infection par *T.cruzi* (TAIBI et coll. 1993). D'autres antigènes ont été testés, par exemple, trois protéines de poids moléculaire 45, 30 et 25 kDa ayant une affinité pour le glutathione (TcGBP) ont été caractérisées à partir d'épimastigotes. L'immunisation des souris par les TcGBP en association avec *Bordetella pertussis* et de l'alum (BpAl) entraîne une forte diminution de la parasitémie et protège de la mortalité en phase aiguë de l'infection (PLUMAS-MARTY et coll. 1993). Cependant, à l'heure actuelle il n'existe pas une molécule parasitaire native ou recombinante qui soit capable d'induire une réponse protectrice sans conséquence pathologique chez l'hôte. Il semble, donc indispensable d'identifier à l'échelle moléculaire les antigènes pouvant induire une protection vis-à-vis de l'infection chagásique et n'ayant pas comme conséquence le développement d'une pathologie autoimmune.

**VII. LA MALADIE DE CHAGAS DANS
L'EQUATEUR**

VII. 1. Historique et distribution géographique

En Equateur, la maladie de Chagas a été mise en évidence pour la première fois en 1927 chez deux enfants de la province de Guayas (ARTEAGA 1929). Cependant, la seule étude épidémiologique qui a été réalisée dans la période 1949-1953, n'a pas montré l'existence de cas de Chagas ni d'infection des vecteurs potentiels (ESPINOSA 1955). Depuis lors, d'autres études ont pu établir la présence de cette maladie parasitaire dans quatre provinces de la région cotière du pays: Guayas, El Oro, Manabi et Los Ríos et dans les vallées de deux provinces montagneuses: Loja et Pichincha (DEFRANC 1987), ainsi que dans la région Amazonienne (AMUNARRIZ et coll. 1991). De toute façon, il n'y a pas de données précises concernant la répartition géographique des vecteurs, la prévalence de l'infestation humaine et on peut dire, d'après les cas isolés qui ont été décrit, que c'est dans la province de Guayas qu'ont été diagnostiqués la plupart des cas de trypanosomiase humaine mais celle-ci est présente par ailleurs dans plusieurs provinces du pays (Figure 7).

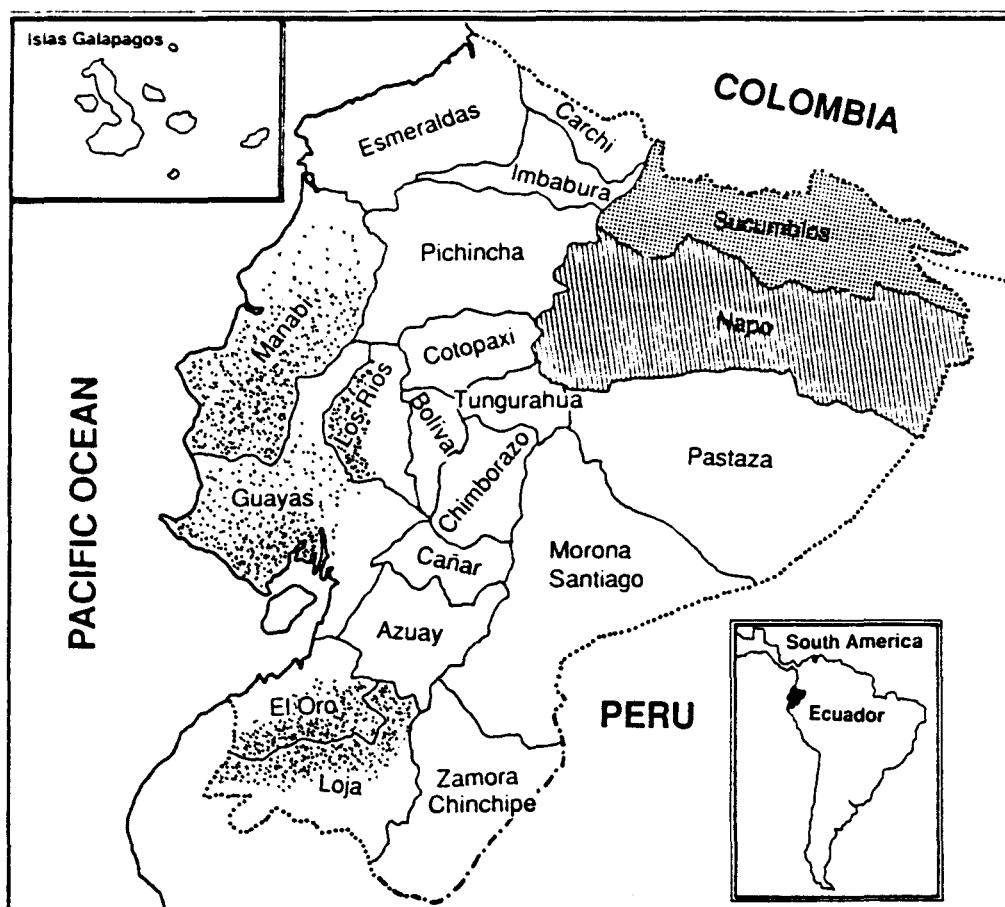
VII. 2. Le parasite

Même si l'identification de l'espèce *T.cruzi* est relativement facile sur la base de critères biologiques et morphologiques, il n'y a pas beaucoup de données concernant la caractérisation du parasite en Equateur. La seule étude biochimique qui a été faite révèle la présence de souches correspondant au zymodème 1 (Z1) dans la province de El Oro (WIDMER et coll. 1985).

VII. 3. Les vecteurs

En Equateur les espèces les plus importantes sont *Triatoma dimidiata*, *T.carrioni*, *Pastrongylus chilensis*, *Rhodnius ecuadoriensis* et *Rhodnius prolixus*. Mais, on trouve aussi de *Rhodnius robustus*, *R.pictipes*, et *Panstrongylus geniculata* dans la région amazonienne (DEFRANC 1982). Le taux d'infestation par *T.cruzi* dans une étude menée dans la ville de

Figure 7. Distribution géographique de la maladie de Chagas dans l'Equateur.



Adapté de Amunarriz, M. et coll. 1991. J. Trop. Med. Hyg. 94: 145

Guayaquil est de l'ordre de 49.83%. Dans cette région en particulier, il n'y a que *Triatoma dimidiata*, et bien que les rongeurs, le poulet et le rat constituent sa principale source de repas sanguins (GOMEZ LINCE 1968) il y a toujours un risque pour l'homme. Dans une autre étude faite à Loja et El Oro on trouve 9.5% de vecteurs porteurs *T.cruzi* (CUEVA et ROMERO 1987). Dans la province de Manabi le taux d'infestation de *Triatoma dimidiata* par *T.cruzi* était de 25% (ANDRADE et coll. 1980).

VII. 4. Réservoir animaux

Dans la quasi-totalité des pays où l'infestation par *T.cruzi* est endémique, on observe des cycles de transmission faisant intervenir de très nombreux hôtes. A l'heure actuelle, plus de 150 espèces réparties entre 24 familles d'animaux sauvages et domestiques ou péridomestiques sont infestées par *T.cruzi*. Cependant, des études développées à Guayaquil (GOMEZ LINCE 1968) ont montré que l'opossum (*Didelphis azarae*) et le rat (*Rattus norvegicus*) sont les seuls hôtes réservoirs et même si des chats, chiens, chauves-souris, tatous, chevreaux, et des paresseux ont été étudiés, ils ont toujours été négatifs. L'isolement de *T.cruzi* chez les animaux est important pour identifier les principaux animaux réservoirs et surtout pour évaluer le risque d'introduction de souches sylvatiques dans le cycle domestique, il semble que des études dans les autres régions endémique sont absolument nécessaires.

VII. 5. Infestation humaine

D'après les études qui ont été faites l'infestation humaine atteint son maximum, avec 45.3%, dans la province de El Oro (KAWABATA 1987). Dans la province de Manabi, 19% de sujets examinés étaient séropositifs (ANDRADE 1980). Dans la province de Napo et Sucumbios, 6% de la population examinées étaient positifs pour *T.cruzi* (AMUNARRIZ et coll. 1995). Concernant la province de Guayas, même si dans le passé c'est là qu'on avait découvert la plupart des cas, il s'agissait de cas isolés où soupçonnés. Par exemple, jusqu'à 1958 il y avait

305 cas aigus, pendant la période 1963-1967, 2160 sujets ont été examinés et 64 (2.9%), ont été positifs pour l'observation directe du parasite dans le sang (GOMEZ LINCE 1968), mais il manque des données réelles (anciennes ou récentes) sur la prévalence de cette parasitose dans la province de Guayas. On trouve la même situation dans les provinces de Loja et El Oro. (CUEVA 1987).

Au niveau de la pathologie, on trouve des troubles de l'appareil digestif autant que des problèmes cardiaques associés à la maladie du Chagas (GALINDO 1958). Neamoins, des cas où coexistent les deux manifestations ont été également décrits (CUEVA 1987).

Au niveau des banques de sang, il manque des études pour déterminer le taux de séropositivité même dans les zones de forte endémicité. Mais, il paraît qu'il y a des programmes pour la recherche du parasite chez les donneurs de sang (OMS 1992).

De toute façon, il y a plusieurs méthodes de lutte contre cette maladie, notamment le diagnostic avec la prise en charge clinique et le traitement symptomatique des différentes formes cliniques, la lutte antivectorielle -soit par voie chimique soit par l'amélioration de l'habitat-, la prévention de la transmission par transfusion, la prévention de la transmission congénitale, etc. Cependant, bien que les connaissances scientifiques et techniques permettent d'espérer que la trypanosomiase américaine sera contrôlée, rares sont les pays qui ont entrepris un programme de lutte. La raison tient principalement aux contraintes d'ordre politique et économique. En particulier, en Equateur cette maladie est souvent sous-estimée et il y a une absence d'études épidémiologiques sérieuses à propos de la maladie de Chagas.

VIII. RESULTATS

VIII. 1. TRAVAUX PERSONNELS

Article 1

AMELIORATION DE LA SPECIFICITE DE L'IDENTIFICATION DE *Trypanosoma cruzi* PAR LA REACTION DE POLYMERASE EN CHAINE (PCR) EN UTILISANT UN OLIGONUCLEOTIDE DERIVE DE LA SEQUENCE AMINO-TERMINALE DE LA PROTEINE Tc24.(Sous presse.

Parasitology 1995)

Le diagnostique de la maladie de Chagas pose de sérieux problèmes, notamment pendant la phase chronique de l'infection où les parasites sont absents de la circulation sanguine. Toutefois, l'identification des antigènes parasitaires à potentialités diagnostiques reste une voie de recherche intéressante pour le développement de tests simples, spécifiques et sensibles pour le diagnostic de masse. Au cours de cette étude, la valeur diagnostique de la protéine recombinante (Tc24) de *Trypanosoma cruzi* a été étudiée.

Les principaux résultats sont les suivants:

1. Des anticorps dirigés contre la protéine Tc24 ont été détectés dans les infections naturelles et expérimentales à *T.cruzi*. Cependant, les sérums de souris infectées par *Trypanosoma rangeli* reconnaissaient faiblement la protéine Tc24.
2. Les sérums de souris immunisées par la protéine Tc24 réagissaient contre un polypeptide de 21 kDa présent dans les extraits de *T.rangeli*.
3. L'analyse détaillée de la réponse anticorps contre un peptide 20-40 localisé dans le domaine amino-terminal de la Tc24 suggérait que cette séquence n'était pas exprimée par l'antigène de 21 kDa de *T.rangeli*.
4. La réaction PCR utilisant des oligonucléotides correspondant au peptide 20-26 démontrait la spécificité de ces sondes oligonucléotidiques pour l'identification de *T.cruzi*. De plus, des signaux positifs ont été trouvés avec des échantillons sanguins de souris infectées par *T.cruzi*.
5. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la PCR basée sur l'utilisation des oligonucleotides correspondant au peptide 20-26 pourrait être un outil puissant pour un diagnostic spécifique de la maladie de Chagas.

Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by Polymerase Chain Reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein

IN PRESS: PARASITOLOGY. EDITORS F. E. G.COX and C. ARME

AUTHORS

A. TAIBI, A. GUEVARA-ESPINOZA, R. SCHÖNECK, B. YAHIAOUI and A. OUAISSI

RUNNING TITLE:

Tc24 as a tool for Chagas' disease diagnosis

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité INSERM U415

Institut Pasteur, 59019, Lille cédex FRANCE

A. Guevara-Espinoza is on leave from Department of Clinical Research, Hospital Vozandes, Quito - Ecuador, and supported by Grant from WHO-TDR Programme.
Reprints requests to : Dr Ali Ouaissi

SUMMARY

In the present study, the diagnostic value of *Trypanosoma cruzi* recombinant protein (Tc24) was examined. Although antibodies against Tc24 were detected during natural and experimental *T. cruzi* infections, specificity studies revealed that sera from *T. rangeli* infected mice also recognized to some extent Tc24 protein. In addition, sera from Tc24 immunized mice reacted against a 21 kDa polypeptide in *T. rangeli* extracts. Detailed analysis of the antibody response against a 20-40 peptide localized in the Tc24 amino-terminal domain suggests that this sequence is not expressed by *T. rangeli* 21 kDa antigen. Therefore, the PCR reaction using oligonucleotides corresponding to a 20-26 peptide clearly demonstrated the specificity of the oligoprobes for *T. cruzi* identification. Positive signals were also found when using blood samples from *T. cruzi* infected mice. Taken together, these results suggest that the PCR based 20-26 assay may be useful in the specific diagnosis of Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, Tc24 recombinant protein, diagnosis, PCR.

INTRODUCTION

The acute phase of Chagas' disease is characterized by high parasitemia levels and diagnosis can easily be accomplished by looking for the presence of the parasite in blood smears. During the chronic phase due to low parasitemia the diagnosis is usually done by indirect methods such as xenodiagnosis and/or serology. However, xenodiagnosis is tedious, and the sensitivity is low, and most of the serological methods, although highly sensitive, are sometimes non-specific especially in areas where *Leishmania* and/or *Trypanosoma rangeli* coexist with *T. cruzi*.

Many attempts have been made to identify specific components of the parasite with a potential use in the diagnosis of Chagas' disease. Thus, the whole parasite (Landivar *et al.* 1992), soluble antigens (Corral, Orn & Grinstein, 1992) and glycoproteins (Schechter *et al.* 1983) are currently used in serological methods. More recently, recombinant surface (Cetron *et al.* 1992; Gruber & Zingales, 1993) cytoplasmic and flagellar (Krieger *et al.* 1992) *T. cruzi* antigens have been tested with some success. The Polymerase Chain Reaction (PCR) with specific oligonucleotides (Avila *et al.* 1991; Diaz, Nussenzweig & Gonzalez, 1992; Avila *et al.* 1993) and even synthetic peptides (Vergara *et al.* 1992) have also been used.

In previous reports, we have screened an epimastigote cDNA expression library using a monoclonal antibody, Tcr7, reacting with a 24-25 kDa parasite polypeptide. cDNAs clones encoding a 24 kDa protein have been isolated and sequenced (Ouaissi *et al.* 1992). Further studies allowed us to isolate cDNA clones encoding the 24 kDa protein from a trypomastigote cDNA library using antibodies raised against *T. cruzi* excretory/secretory antigens (Taibi *et al.* 1993). In the present study we have subcloned the cDNA encoding the *T. cruzi* 24 kDa polypeptide (Tc24) within the pGEX-2T expression system and examined the diagnostic value of the fusion protein by using ELISA and the Western blot techniques. The use of molecular approaches allowed us to define a Tc24 specific domain which could be a useful probe for diagnosis of Chagas' disease.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

Trypanosoma cruzi Y and *T. rangeli* strains were used throughout this study. Parasite antigens were prepared as described elsewhere (Ouaissi *et al.* 1991).

Human sera

Sera samples were obtained from 56 chronic chagasic patients (age range 20-47 years) and 6 acute chagasic individuals (age range 3 months to 17 years). Control sera were obtained from 9 healthy individuals (1-66 years) inhabitants of rural areas of Santa Fe and Santiago del Estero (Argentina) (Martin *et al.* 1990). The characterization of sera was done both by direct microscopic observation of hemoflagellates and by immunofluorescent assays. To determine specificity, sera from patients infected with parasites other than *T. cruzi*, (*Leishmania braziliensis braziliensis* (5), *Leishmania guyanensis* (5), *Toxoplasma gondii* (6), *Schistosoma mansoni* (6), and *Echinococcus granulosus* (5)) were also included in the study.

Mice sera

Eight weeks old BALB/c mice (n=10) were infected with 2×10^2 blood derived *T. cruzi* trypomastigotes i.p. After 2, 10, 17 and 23 days post-infection, blood was collected from the orbital sinus of each mouse. 150 days later, surviving mice (n=6) were bled to obtain chronic mouse sera. Sera from mice infected with other parasites *Leishmania major* (4), *Schistosoma mansoni* (5), *Toxoplasma gondii* (5), and *Trypanosoma rangeli* (pool of 4 mice), were used as controls.

Two mice were infected by *T. cruzi* (Tulahuen strain) and bled 150 days post-infection.

Peptide synthesis, subcloning and purification of a trypomastigote recombinant antigen

The 20-40 peptide derived from the primary sequence of the 24 kDa protein (Tc24) was synthesized and coupled to ovalbumin as previously described (Taibi *et al.* 1993).

The *T. cruzi* trypomastigote cDNA clone encoding Tc24 (Taibi *et al.* 1993) was purified and subcloned in a pGEX-2T plasmid known to be a high expression vector.

The pGEX-2T vector directs the synthesis of foreign polypeptides in *Escherichia coli* as fusion peptide with the 26 kDa *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase (Sj26). The cDNA insert encoding the Tc24 protein, was ligated in the corresponding cloning site of the plasmid and the products were allowed to express in *E. coli*. Positive clones were selected and the purification of the fusion protein was carried out as described (Smith & Johnson, 1988). The purity of the recombinant protein was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

Immunization procedures

Tc24 fusion protein and the 20-40 peptide conjugated to ovalbumin (20-40-OVA) were used to immunize BALB/c mice by the i. p. route to obtain immune sera. For that purpose, two mice were inoculated three times at two weeks intervals with 50 µg of recombinant Tc24; or 20-40-OVA, in association with 30 µl of BpAl as adjuvant (VAXICOQ, Institut Mérieux, Lyon, France: 4 IU of *Bordetella pertussis* and 1.25 mg of aluminium hydroxide/500µl). Two weeks after the last immunization, mice were bled by cardiac puncture and sera were recovered and stored at -20°C until used. Control sera were obtained from non-immunized mice and mice immunized with Sj26 recombinant protein or ovalbumin. Pre-immune sera were obtained from all mice before immunization.

Immunoblotting

After SDS-PAGE, recombinant Tc24 was transferred to nitrocellulose sheets (Towbin, Staehlin & Gordon, 1979). Strips were blocked with 5% milk powder pH 7.4 in PBS for 1 hour at room temperature and incubated overnight at 4°C with acute or chronic *T. cruzi* infected human and mice sera diluted 1/50 in 5% milk powder pH 7.4 PBS. Control sera from humans and mice infected with *L. brasiliensis*, *S. mansoni*, or *T. gondii* were also analyzed. Sera from *Trypanosoma rangeli* infected mice were also used. Strips were then washed and incubated for 2 hours at room temperature with the respective horseradish peroxidase labeled (Diagnostics Pasteur, 92430 Marnes-la-Coquette-France) anti-human IgG,A,M (H+L) or anti-mouse IgG

(H+L) diluted 1/500 in pH 7.4 PBS. The antibodies bound to the nitrocellulose sheets were revealed using 4-chloro-1-naphthol as substrate (Bio-Rad Laboratories, CA 94547, USA).

Sera from mice immunized with Tc24 and Sj26 were also tested against NP40 *T. cruzi* and *T. rangeli* epimastigote antigens.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A standard ELISA test (Voller, Bartlett & Bidwell, 1978) was used to detect antibodies against the recombinant Tc24 protein in sera from Chagasic patients and from *T. cruzi* infected BALB/c mice sera. The optimal concentrations of serum, antigen and conjugate were determined by checkerboard titration. Briefly, disposable 96 wells polystyrene microtitration ELISA plates (Nunc, Denmark) were incubated with 100 µl of carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 containing 0.5 µg/ml Tc24 recombinant antigen overnight at 4°C. The unbound material was discarded and the unoccupied sites blocked with 200 µl of PBS pH 7.4 containing 1% BSA and 0.05% Tween 20 for two hours at 37°C. After 5 washes with PBS pH 7.4, 0.1% Tween 20, 100 µl of human or mouse sera 1/100 diluted in 0.3% BSA, 0.05% Tween 20-PBS pH 7.4, were added and incubated for 2 hours at 37°C. Then, wells were washed 5 times and 100 µl of horseradish peroxidase labeled anti-human IgG γ-specific chain (1/5000 diluted) or anti-mouse IgG (1/10000 diluted) were added to the wells and incubated for 1 hour at 37°C. After 5 washes with 0.1% Tween20-PBS pH 7.4 and an additional wash with PBS, 100 µl of 10 mg O-phenyldiamine dihydrochloride (Sigma, St.Louis, MO 63178 USA) dissolved in 20 ml of citrate buffer pH 5.0 plus 20 µl of H₂O₂ were added to each well, and incubated 15 minutes at 37°C. The reaction was stopped by addition of 100 µl of 1N HCl to each well. The absorbance was measured against the blank wells at 492 nm by mean of a "Titertek Multiscan" reader. All the assays were carried out in duplicate.

Since the Tc24 recombinant protein was expressed as a fusion protein with the Sj26, parallel ELISA assays were carried out using the Sj26 recombinant protein alone as antigen in the same conditions as Tc24 fusion protein.

Indirect immunofluorescent antibody test

T. cruzi and *T. rangeli* fixed epimastigotes were allowed to react with sera from mice immunized with either Tc24 fusion protein or the 20-40-OVA coupled peptide. Sera from OVA-immune mice were used as control. The test was performed according to the procedure described previously (Taibi *et al.* 1993).

Preparation of RNA from culture parasites

Total RNA of different parasite cultures (*T. cruzi*, *T. rangeli* epimastigotes, *L. major*, *L. donovani infantum* promastigotes, and *T. gondii* tachyzoites) was prepared from guanidium-lysed parasites by cesium chloride purification.

Purification of DNA from blood samples and culture parasites

Heparinized blood samples from normal, acute and chronic *T. cruzi* infected BALB/c mice were drawn and treated with ammonium chloride in order to avoid red blood cells, and DNA from blood samples and culture parasites was isolated using SDS method as previously described (Diaz, Nussenzweig & Gonzalez, 1992).

Polymerase chain reaction

Total RNA from both *T. cruzi* and *T. rangeli* epimastigotes was reverse transcribed (RT) by Superscript Reverse Transcriptase (GIBCO-BRL, Gaithersburg, USA). PCR was performed using RT products and DNA purified from culture parasites and blood samples. Two oligonucleotides derived from *T. cruzi* 24 kDa cDNA sequence (Ouaissi *et al.* 1992) were used:

T1: 5' GACGGCAAGAACGCCAAGGAC 3' encoding peptides, position: 20-26.

T2: 5' TCACCGCTCTCCGGCACGTTGTC 3' encoding peptides, position: 207-Stop.

2 μ l and 1 μ g of TR products and purified DNA were used respectively for PCR amplification. Each 100 μ l reaction contained 100 pmol of each primer and 2.5 U of Taq DNA polymerase (APPLIGENE, Illkirch, France), and was subjected to 35 cycles of amplification in a DNA thermal cycler (PERKIN ELMER, Norwalk, USA). After denaturation (5 min at 94°C), each cycle consisted of 1 min at 94°C, 1 min at 62°C, 2 min at 72°C followed by one cycle of 7 min at 72°C to complete the cDNAs.

A 5 µl aliquot of each reaction was run on a 2% agarose gel to check the efficiency and specificity of the amplification reaction.

Northern and Southern blots

cDNA probes were labeled with [α - 32 P] dCTP using megaprime DNA labelling system and Northern blot was carried out using the procedures previously described (Schöneck et al. 1994). Tc24 cDNA labelling and Southern blot were performed using a nonradioactive ECL system (Fluorescein Gene Images labelling and detection systems; Amersham, Buckinghamshire, England). For the Southern blot an internal oligonucleotide named T3 derived from *T. cruzi* 24 kDa cDNA sequence was also used. T3: 5' ATTGCCAGGCGATTCCCTCGT 3' encoding peptides, position: 34-40. The oligonucleotide probe was labeled by tailing with digoxigenin dUTP and the Southern blot was performed as described by manufacturer (Boehringer Mannheim, France).

RESULTS

Expression of Tc 24 fusion protein

pBluescript Tc24 clone was subcloned into *Sma* I of pGEX vector. The 26 kDa glutathione S-transferase (GST), and the Sj26-Tc24 fusion protein were produced and purified on glutathione-agarose beads. As shown in figure 1-IA, after Coomassie blue staining of SDS PAGE containing purified material, the apparent molecular weight of Tc 24 fusion protein is 54 kDa, and the size of the Sj26 expressed in pGEX-2T was 28 kDa (figure 1-IB). Mouse immune serum produced against Tc24 fusion protein revealed a 24 kDa polypeptide when reacted in Western blot against total trypomastigote extract (figure 1-IIB). In contrast, no reactivity was observed against *T. cruzi* antigens when using anti-Sj26 immune serum (figure 1-IIA).

Detection of specific IgG antibodies against Tc24 fusion protein in chagasic patients sera by using ELISA

As shown in figure 2, the mean optical density value obtained with chronic phase chagasic human sera ($OD=1.17\pm0.51$) was significantly higher than that observed with endemic controls (0.205 ± 0.042); $p<10^{-4}$). If one considers the upper limit of normal values as five standard deviations above the mean optical density of the endemic control group, specific IgG antibodies reacting with Tc24 fusion protein could be detected in 50 (89%) of the chronic phase chagasic sera tested, and only one serum out of six acute phase sera tested so far was positive. None of sera from patients infected with schistosomiasis, hydatid disease, acute or chronic toxoplasmosis showed positive reaction. Moreover, no reactivity was observed when using sera from healthy individuals living in endemic areas or sera from patients infected with *L. braziliensis braziliensis* or *L. braziliensis guanensis*.

All the sera used in this experiment were also tested against Sj26 GST alone and no reactivity was observed.

Western blot analysis of chagasic patient sera against Tc24 fusion protein

As shown in figure 3, none of the control sera reacted against the recombinant protein. In contrast, two sera from three acutely infected patients, and all sera from chronically infected individuals, revealed a high reactivity against a component of 54 kDa which is also recognized by anti Tc24 fusion protein antibodies .

Detection of anti-Tc24 antigen specific antibodies in *T. cruzi* infected mice sera by ELISA

We further evaluated the possible use of Tc24 fusion peptide in ELISA for the detection of specific antibodies in *T. cruzi* infected mice sera. As shown in figure 4, high optical density values ($OD=1.56\pm0.08$) were obtained in the case of chronic mouse sera when compared with sera from mice immunized with Tc24 fusion peptide ($OD=1.82$). Kinetic studies of antibody responses against Tc24 antigen showed a significant increase in the OD values at 17 days post-infection (Fisher's exact test, $p<10^{-4}$ OD value of Tc 17 compared with that of NMS and Tc 2). Compared to the result obtained with *L. major* and *T. gondii* infected mouse sera, a positive reactivity was obtained when using sera from *T. rangeli* infected mice ($p<10^{-3}$ OD value compared with that of NMS). A weak positive reaction was also seen with *S. mansoni* infected mice sera. This could be due to the Sj26 peptide which forms part of the fusion protein.

The anti-Tc 24 fusion protein and anti-Sj26 GST antibodies were used as controls and showed that the concentration used for the coating of the antigens is sufficient for the detection of specific antibodies.

Western blot analysis of *T. cruzi* infected mice sera against Tc24 fusion protein

Mouse immune serum to Tc24 fusion peptide revealed two major bands: the 54 kDa polypeptide corresponding to the Tc24-Sj26 GST fusion peptide and the 28 kDa component corresponding to Sj26 GST protein (figure 5-IO).

All chronic sera from *T. cruzi* infected mice were highly reactive with Tc24

fusion peptide (figure 5-I; Lanes: J, K, L, M and N). A kinetic study of the antibody response against the protein showed that a weak positive reaction occurred when using sera from *T. cruzi* infected mice 17 days p.i. (figure 5-I; Lane: I), whereas, sera from 2 and 10 days p.i. were negative (figure 5-I; Lanes: G and H). Moreover, no reactivity was observed when using sera from *L. major* and *T. gondii* infected mice or non infected mice (figure 5-I; Lanes: A, D and E respectively). However, Tc24 recombinant protein was recognized by sera from *T. rangeli* infected mice (figure 5-I; Lanes: B and C). Surprisingly, when sera from mice immunized with Tc24 fusion protein were reacted against *T. rangeli* total extracts, a band of molecular mass 21 kDa (named Tr21) was revealed (figure 5-II; Lane: B). This observation suggested that the Tc24 and Tr21 proteins are not identical but share a cross-reactive epitope(s).

Mouse antibodies to the 20-40 peptide derived from the primary sequence of Tc24 protein failed to react against *T. rangeli* epimastigotes

In order to better analyse the cross-reactivity between Tc24 and Tr21, we decided to test mouse antibodies to a 20-40 peptide of Tc24 protein recognized *T. rangeli*. In a previous study, we have shown that *T. cruzi* Tc24 protein is distributed on the surface and in the intracellular compartment of both trypomastigote and amastigote stages. However, in the epimastigote forms the localization of this protein was mainly associated with the flagellum (Taibi et al. 1993). Similar distribution was observed when using anti 20-40 coupled peptide (figure 6; C). In contrast in the case of *T. rangeli* no reactivity could be seen when using anti 20-40 coupled peptide (figure 6; D), whereas the anti-Tc24 fusion protein showed positive reaction against both *T. cruzi* and *T. rangeli* epimastigotes (figure 6; A and B respectively).

Molecular probes demonstrate the *T. cruzi* specificity of the 20-40 amino-terminal sequence

a) ***Northern blot.*** The above observations prompted us to examine, using other molecular approaches, whether the 20-40 amino-terminal sequence is *T. cruzi* specific. In a first step, a Northern blot of total RNA prepared from different protozoan parasite species was hybridized with labeled Tc24 cDNA insert. As shown in figure

7-I; Lanes A and D, a single transcript of 1100 bp was revealed in RNA samples from *T. cruzi* and *T. rangeli*. In contrast, no positive signal could be seen when using RNA from other parasites (figure 7-I; Lanes: B, C and E). Interestingly, when a labeled probe corresponding to the N-terminal domain of Tc24 protein was hybridized to parasites RNA, only *T. cruzi* RNA showed a positive signal similar to that obtained using the full length cDNA (figure 7-II; Lane: A).

b) PCR and Southern blot . In order to establish more accurately the *T. cruzi* specificity of the N-terminal region of Tc24, complementary investigations were done using PCR reaction and oligonucleotides corresponding to the 20-40 peptide sequence. As shown in figure 8, a fragment of an expected size of 550 bp was visualized when using *T. cruzi* epimastigote RT products (figure 8.A; Lane: A). In contrast, no band could be seen in the case of *T. rangeli* DNA or RT products (figure 8.A; Lanes: B and J).

In order to demonstrate the specificity of the bands obtained after amplification, labeled Tc24 cDNA was used to probe a Southern blot of the PCR products. As shown in figure 8.B; Lane A, the band at position of 550 bp in *T. cruzi* RT products was revealed by Tc24 cDNA probe. Furthermore, two bands of 550 and 1500 bp were visualized in the case of blood from *T. cruzi* infected mice (figure 8.B; Lanes: D, E, F, G and H). In contrast, no positive signal was seen in the case of *T. rangeli* DNA or RT products (figure 8.B; Lanes: B and J). Interestingly the same bands of 550 and 1500 bp were displayed in the PCR products when using an internal oligonucleotide (T3) derived from Tc24 primary sequence, therefore demonstrating the specific amplification of Tc24 gene fragment(s) (figure 8.C).

DISCUSSION

Serological diagnosis of Chagas' disease is still controversial (Ross & Novoa-Montero, 1993; Carvalho *et al.* 1993; Zicker *et al.* 1990). This is in part due to the antigenic cross-reactivity between *T. cruzi* and other protozoan parasites prevailing in the same endemic areas. Thus, the use of parasite fractions or defined molecules could allow for the development of specific diagnosis test for the disease. Direct methods of parasitological diagnosis could be used during acute phase of the disease and congenital infection (Freilij, Muller & Gonzalez Cappa, 1983). In contrast, using these techniques, a weak sensitivity (50%) was obtained for the diagnosis of the chronic phase (Chiari *et al.* 1979).

In recent years, different *T. cruzi* recombinant antigens have been described for their potential use in the diagnosis of Chagas' disease (Gruber & Zingales, 1993; Krieger *et al.* 1992; Lorca *et al.* 1992; Affranchino *et al.* 1989). Moreover, it was demonstrated that, synthetic peptides derived from the sequences of some *T. cruzi* recombinant antigens could also be used for diagnosis (Vergara *et al.* 1992; Burns *et al.* 1992). However, the study of the specificity of these tests needs further evaluation, specially in areas where *T. rangeli* and *T. cruzi* are co-endemic.

In this report, we have used a *T. cruzi* recombinant protein to detect antibodies in sera from *T. cruzi* infected mice and human chagasic patients. The parasite protein of molecular mass 24 kDa is present among trypomastigote excretory-secretory antigens (ESA) (Ouaissi *et al.* 1992; Taibi *et al.* 1993) and is expressed by all *T. cruzi* developmental stages. The results obtained indicate that Tc24 fusion protein could be recognized by sera from infected mice during the acute phase of the disease as early as seventeen days after infection. Moreover, higher OD values were obtained with all chronically infected mouse sera suggesting therefore that Tc24 protein could be considered as a marker of chronic *T. cruzi* infection. Similar results were obtained using chagasic human sera. Indeed, 89% of sera from chronic phase were found to be positive, whereas only 16% of acute phase sera reacted against Tc24 fusion protein.

The antigenicity of Tc24 in humans makes it a possible candidate for serodiagnosis of Chagas' disease. Nevertheless, the specificity studies showed that

sera from *T. rangeli* infected mice, but not *Leishmania* infected patients sera, recognized Tc24 antigen. However, complementary investigations allowed to show that the *T. rangeli* antigen recognized by anti-Tc24 antibodies had a molecular mass of 21 kDa suggesting therefore, that the cross-reactive antigens are not identical but shared common epitope(s).

In order to identify the domains which could be Tc24 specific, we used antibodies previously produced against a 20-40 synthetic peptide present in the N-terminal part of Tc24 (Taibi *et al.* 1993). Interestingly, the results obtained suggested that the 20-40 peptide is Tc24 specific. This possibility was strongly supported by the results obtained using other molecular approaches. Indeed, a labeled cDNA probe corresponding to the N-terminal domain of Tc24 failed to hybridize to *T. rangeli* RNA whereas a positive signal could be visualized by using the full length Tc24 labeled cDNA. Moreover, the PCR assay based on the use of an oligonucleotide corresponding to the 20-26 peptide sequence showed no signal in the case of *T. rangeli* RT products, whereas a band of 550 bp was observed in the case of *T. cruzi* RT products.

Having found that the 20-40 peptide sequence was *T. cruzi* specific, we extended our investigations to DNA from *T. rangeli* parasites as well as samples from *T. cruzi* infected mice. This PCR based assay clearly established that the 20-26 sequence is *T. cruzi* specific. The additional specific bands visualized in Southern blot when using either Tc24 full length cDNA or specific internal oligonucleotide (T3), could be due to the amplification of several copy genes. It is interesting to note that the gene encoding for Tc24 mRNA (an abundant *T. cruzi* mRNA) is organized in at least 20 nearly perfect tandem repeats of 940 bp (Gonzalez *et al.* 1985). Therefore, the pattern obtained after PCR amplification of blood DNA from *T. cruzi* infected mice could result from the multiple gene copies which are organized in a tandem head-to-tail fashion. Indeed, in some DNA samples multiple bands of sizes higher than 550 bp could be visualized (acute phase blood). The presence of one band of 550 bp in the case of RT products (mature mRNA) is in good agreement with this hypothesis. Similar observations have been reported in the case of *T. cruzi* amplification products of kinetoplast minicircle DNA (Avila *et al.* 1993).

In the present study, we provide evidence that even when two antigens have shared epitopes, one might select specific domains and use sensitive techniques such as PCR to develop species-specific diagnosis. Indeed, The PCR technique using parasite-specific DNA probes has been shown to improve parasite diagnosis (Barker Jr, 1990; Rodgers, Popper & Wirth, 1990) and this method has been applied successfully to *T. cruzi* chronic infections (Diaz Nussenzweig & Gonzalez, 1992; Avila *et al.* 1993; Sturm *et al.* 1989). In the case of our Tc24 antigen, recent observations (Krautz *et al.* 1994) indicate that Tc24 recombinant protein is useful to monitor cure of Chagas' disease. Thus, the PCR based 20-26 assay may provide a powerful tool for the diagnosis of Chagas' disease especially in areas where *T. cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania* are co-endemic. In addition, this test would allow us to establish a chemotherapeutic follow up, therefore evaluating the effectiveness of drug treatment. Finally, the 20-26 assay may be applicable in a large scale for blood bank screening.

AKNOWLEDGMENTS

Financial support: These investigations received financial support from INSERM U167-INSERM U415.

REFERENCES

- AFFRANCHINO, J. L., IBANEZ, C. F., LUQUETTI, A. O., RASSI, A., REYES, M. B., MACINA, R. A., ASLUND, L., PETTERSSON, U.
- FRASCH, A. C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **34**, 46-49.
- AVILA, H. A., BORGES PEREIRA, J., THIEMANN, O., DE PAIVA, E., DEGRAVE, W., MOREL, C. M. & SIMPSON, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 2421-2426.
- AVILA, H. A., SIGMAN, D. S., COHEN, L. M., MILLIKAN, R. C. & SIMPSON, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **48**, 211-222.
- BARKER, R. H. Jr. (1990). DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Experimental Parasitology* **70**, 494- 499.
- BURNS, J. M., SCHREFFLER, W. G., ROSMAN, D. E., SLEATH, P. R., MARCH, C. J. & REED, S. G. (1992). Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 1239-1243.
- CARVALHO, M. R., KRIEGER, M. A., ALMEIDA, E., OELEMANN, W., SHIKANAI-YASSUDA, M. A., FERREIRA, A. W., PEREIRA, J. B., SAEZ-ALQUEZAR, A., DORLHIAC, P. E., CHAMONE, D. F. & GOLDENBERG, S. (1993). Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood screening. *Transfusion* **33**, 830-834.
- CETRON, M. S., HOFF, R., KAHN, S., EISEN, H. & VAN VOORHIS W. C. (1992). Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. *Acta Tropica* **50**, 259-266.

- CHIARI, E., DIAZ, J. C. P., LANA, M. & CHIARI, C. A. (1979). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. In "Anais Congreso International Chagas'Disease, Rio de Janeiro, Brasil" N, 1-5.
- CORRAL, R. S., ORN, A. & GRINSTEIN, S. (1992). Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 31-38.
- DIAZ, C., NUSSENZWEIG, V. & GONZALEZ, A. (1992). An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 616-623.
- FREILIJ, H., MULLER, L. & GONZALEZ CAPPA, S. M. (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*. **18**, 327-330.
- GONZALEZ, A., LERNER, T. J., HUECAS, M., SOSA-PINEDA, B., NOGUEIRA, N. & LIZARDI, P. M. (1985). Apparent generation of a segmented mRNA from two separate tandem gene families in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Research* **13**, 5789-5803.
- GRUBER, A. & ZINGALES, B. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Experimental Parasitology* **76**, 1-12.
- KRAUTZ, G. M., GALVAO, L., CANCADO, L. C. M., OUASSI, A. & KRETLI, A. U. (1994). Use of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen to monitor cure of human Chagas' disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz (suppl I)*, 89.
- KRIEGER, M. A., ALMEIDA, E., OELEMANN, W., LAFAILLE, J. J. BORGES PEREIRA, J., KRIEGER, H., CARVALHO, M. R. & GOLDENBERG, S. (1992). Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 427-234.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LANDIVAR, W. H. C., NAKASA, T., TACHIBANA, H., PAZ, K. C & TATENO, S. (1992). Seropositivity to *Trypanosoma cruzi* in blood donors in Santa Cruz, Bolivia. *Journal of Infectious Diseases* **166**, 1464-1465.

- LORCA, M., GONZALEZ, A., VELOSO, C., REYES, V. & VERGARA, U. (1992). Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas' disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 44-49.
- MARTIN, U. O., TAIBI, A., LOYENS, M., MAIDANA, C., CORNETTE, J., CAUDIOTI, C., MARTELLEUR, A., AFCHAIN, D., MARTY, B., VELGE, P., OUAISSI, A. & 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. *Medical Sciences Research* **18**, 725-726.
- OUAISSI, A., AGUIRRE, T., PLUMAS-MARTY, B., PIRAS, M., SCHÖNECK, R., GRASS-MASSE, H., TAIBI, A., LOYENS, M., TARTAR, A., CAPRON, A. & PIRAS, R. (1992). Cloning and sequencing of 24-kDa *Trypanosoma cruzi*-specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by monoclonal antibody. *Biology of the Cell* **75**, 1-17.
- OUAISSI, M. A., TAIBI, A., LOYENS, M., MARTIN, U., AFCHAIN, D., MAIDANA, C., CLAUDIOTI, 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 human Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **45**, 214-225.
- RODGERS, M. R., POPPER, S. J. & WIRTH, D. F. (1990). Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* **71**, 267-275.
- ROSS, A. & NOVOA-MONTERO, D. (1993). Comparability and reliability of ELISA, immunofluorescence, and indirect hemagglutination assays for *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Journal of Infectious Diseases* **168**, 1581-1584.
- SCHECHTER, M., VOLLMER, A., MARINKELLE, C. J., FLINT, J.E., GUHL, F. & MILES, M. A. (1983). Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of South American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet* **22**, 939-941.

- SCHÖNECK, R., PLUMAS-MARTY, B., TAIBI, A. BILLAUT-MULOT, O., LOYENS, M., GRAS-MASSE, H., CAPRON, A., & OUASSI, A. (1994) *Trypanosoma cruzi* cDNA encodes a tandemly repeated domain structure characteristic of small stress proteins and glutathione S-transferases. *Biology of the Cell* **80**, 1-10.
- SMITH, D. B. & JOHNSON, K. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Gluthatione-S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- STURM, N. R., DEGRAVE, W., MOREL, C. & SIMPSOM, L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 205-214.
- TAIBI, A., PLUMAS-MARTY, B., GUEVARA ESPINOZA, A., SCHÖNECK, R., PESSOA, H., LOYENS, M., PIRAS, R., AGUIRRE, T., GRASS-MASSE, H., BOSSUS, M., TARTAR, A., CAPRON, A. & OUASSI, A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *Journal of Immunology* **151**, 2676-2689.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **76**, 4350-4354.
- VERGARA, U., VELOSO, C., GONZALEZ, A. & LORCA, M. (1992). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 39-43.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., & BIDWELL, D. E. (1978). Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* **31**, 507-520.
- ZICKER, F., SMITH, P. G., LUQUETTI, A. O. & OLIVEIRA, O. S. (1990). Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA

and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bulletin of the World Health Organization* **68**, 465-471.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. I- Coomassie blue stained 13% SDS-polyacrylamide gel containing Tc24 fusion protein (A); Sj26 (GST) alone (B), after purification on glutathione beads. II- Western blot of trypomastigotes extract using mouse serum anti-Sj26 (GST) (A), and serum from mouse immunized with Tc24 fusion protein (B).

Figure 2. Western blot of Tc24 fusion protein reacted with normal human serum (A) or sera from patients infected with one of the following: *Schistosoma mansoni* (B); *Toxoplasma gondii* (C); *Leishmania braziliensis guyanensis* (D); *L. donovani* (E); *Trypanosoma cruzi* acutely infected patients (F, G, H); *T. cruzi* chronically infected patients (I, J, K, L, M, N, O). Lanes P and Q correspond to Tc24 protein revealed with normal and Tc24 immune mouse sera respectively.

Figure 3. Detection of specific IgG antibody response against Tc24 fusion protein by ELISA using sera from patients infected with: *L. braziliensis braziliensis* (Lbb); *L. braziliensis guyanensis* (Lbg); *T. gondii* (ATg: acutely infected patients; CTg: chronically infected patients); *Echinococcus granulosus* (Eg); *S. mansoni* (Sm); *T. cruzi* (CAP and CCP correspond to acutely and chronically infected patients, respectively). Lane NE correspond to normal endemic sera.

Figure 4. I-Western blot of Tc24 fusion protein using normal mouse serum (A); Sera from mice infected with the following: *Trypanosoma rangeli* (B, C); *L. major* (D); *T. gondii* (E); *S. mansoni* (F); *T. cruzi* (G, H and I corresponding to 2, 10 and 17 days post-infection respectively); *T. cruzi* chronically infected mice (J, K, L, M, N). Lane O represent Tc24 fusion protein reacted with serum from Tc24 imunized mouse. II-Western blot of total *T. cruzi* (A) and *T. rangeli* (B) antigens reacted with mouse immune serum to Tc24 recombinant protein.

Figure 5. Detection of antibody response against Tc24 fusion protein (—) and Sj26 (GST) alone (—) by ELISA using sera from *T. cruzi* infected BALB/c mice (2, 10, 17 and 23 days after *T. cruzi* infection); chronically infected mouse sera (CMS); sera from mice infected with *L. major* (Lm), *T. rangeli* (Tr), *S. mansoni* (Sm), *T. gondii* (Tg) and normal mouse sera (NMS).

Mouse antisera to the Tc24 fusion protein (anti-Tc24) or Sj26 (GST) alone (anti-Sj26) were also used as control.

Figure 6. Analysis of the reactivity of mouse antibodies against the Tc24 fusion protein or the 20-40 synthetic peptide derived from the Tc24 primary sequence using formaldehyde fixed parasites. A, C and E: *T. cruzi* epimastigotes reacted with anti-Tc24, anti-20-40OVA and anti-OVA mice immune sera, respectively. B, D and F: *T. rangeli* epimastigotes reacted with anti-Tc24, anti-20-40OVA and anti-OVA mice immune sera, respectively. Control test using anti-OVA immune serum reacted with *T. cruzi* and *T. rangeli* epimastigotes showed negative reaction (E and F respectively). This represents a typical control immunofluorescence reaction with anti-Sj26 immune serum.

Figure 7. Northern blot of 10 µg total RNA from *T. cruzi* epimastigotes (A); *L. major* (B); *L. donovani* (C); *T. rangeli* epimastigotes (D); *T. gondii* (E); hybridized with [α -³²P] dCTP labeled probes: I- Tc24 full length cDNA; II- Tc24-”N-term” cDNA.

Figure 8. **A.** Ethidium bromide-stained 2% agarose gel containing PCR products. Samples were processed as described in Materials and Methods. **B.** Southern blot of gel shown in I hybridized with a fluoresceine-labeled Tc24 cDNA. **C.** Southern blot of another agarose gel prepared in the same conditions as that represented in I, and hybridized with a digoxigenin-labeled oligonucleotide T3. PCR products load on the gels correspond to the following templates: RT products of *T. cruzi* and *T. rangeli* (A and B respectively); DNA samples from blood of *T. cruzi* Y strain infected mice [acute phase sample (C); chronic phase samples (D, E and F)]; DNA from blood of *T. cruzi* Tulahuen strain chronically infected mice (G and H); DNA from normal blood mouse (I) and DNA from *T. rangeli* epimastigotes (J). All blood samples from chronically infected mice were checked for the presence of parasites by microscopic examination and none of them contained detectable parasites.

Figure 1

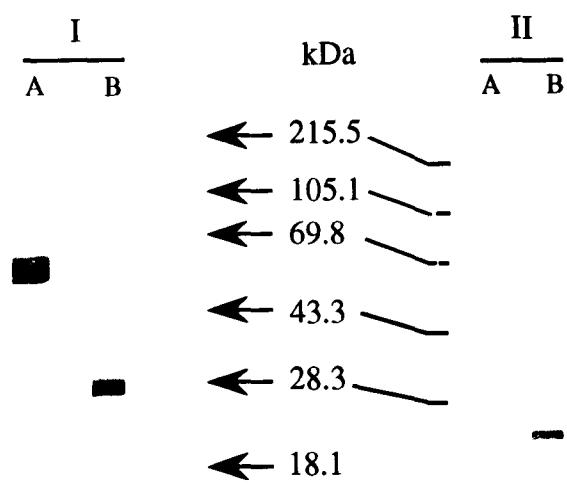


Figure 2

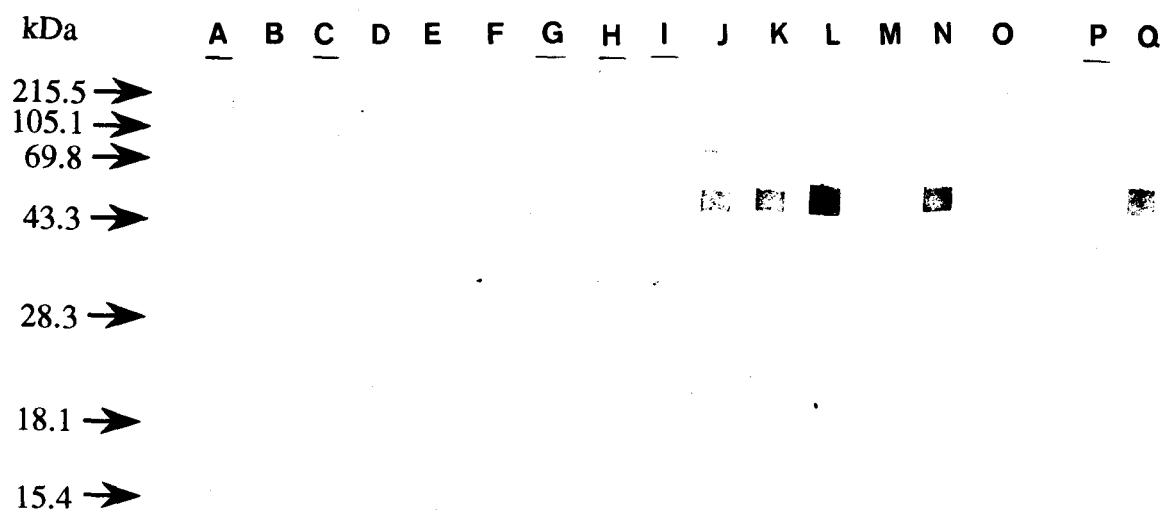


Figure 3

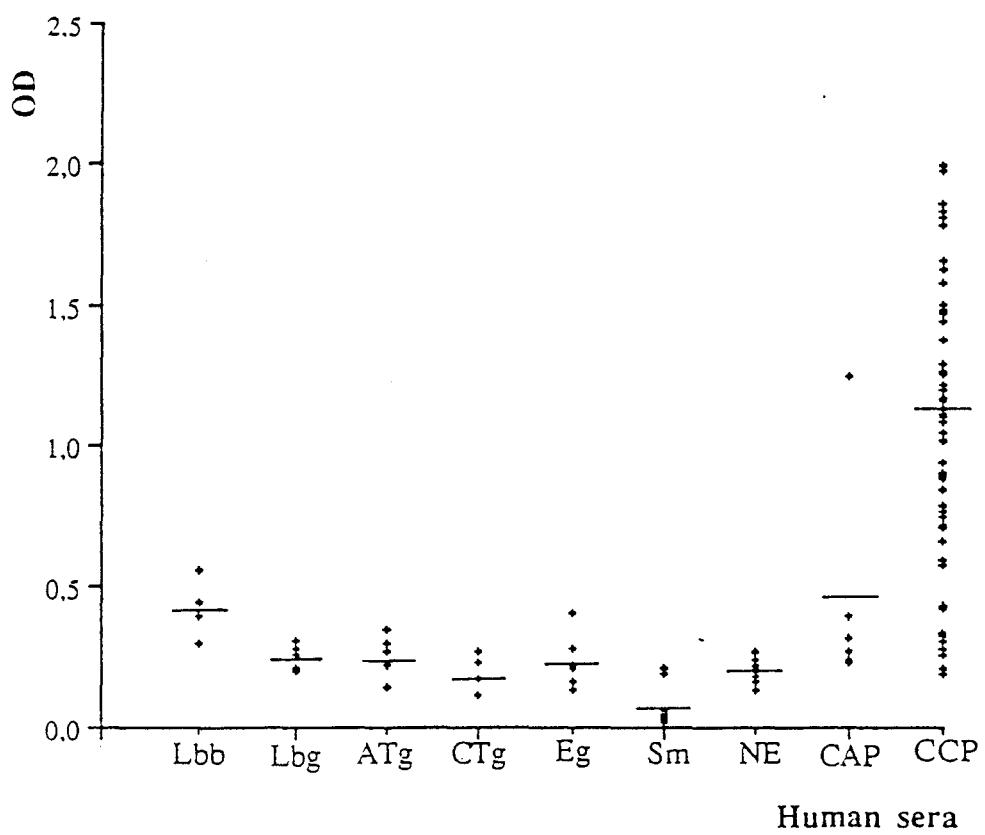


Figure 4

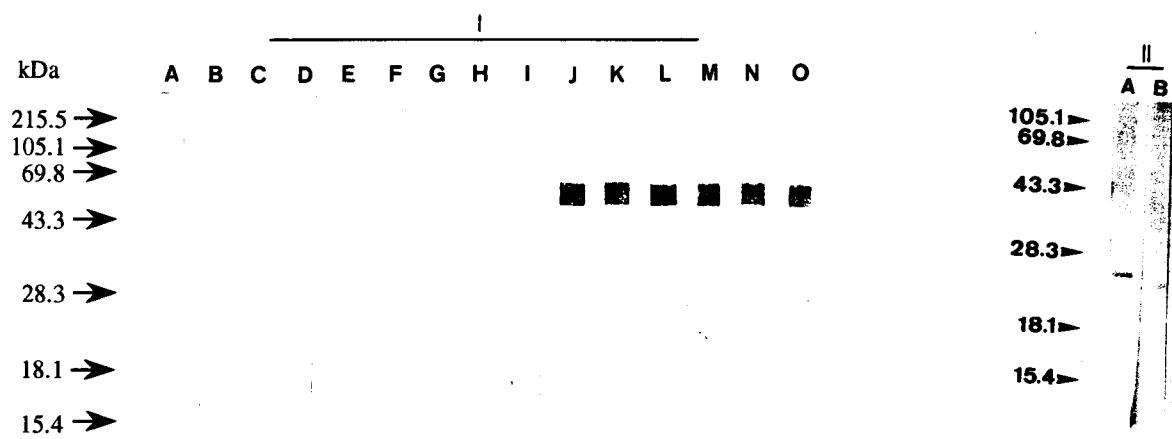


Figure 5

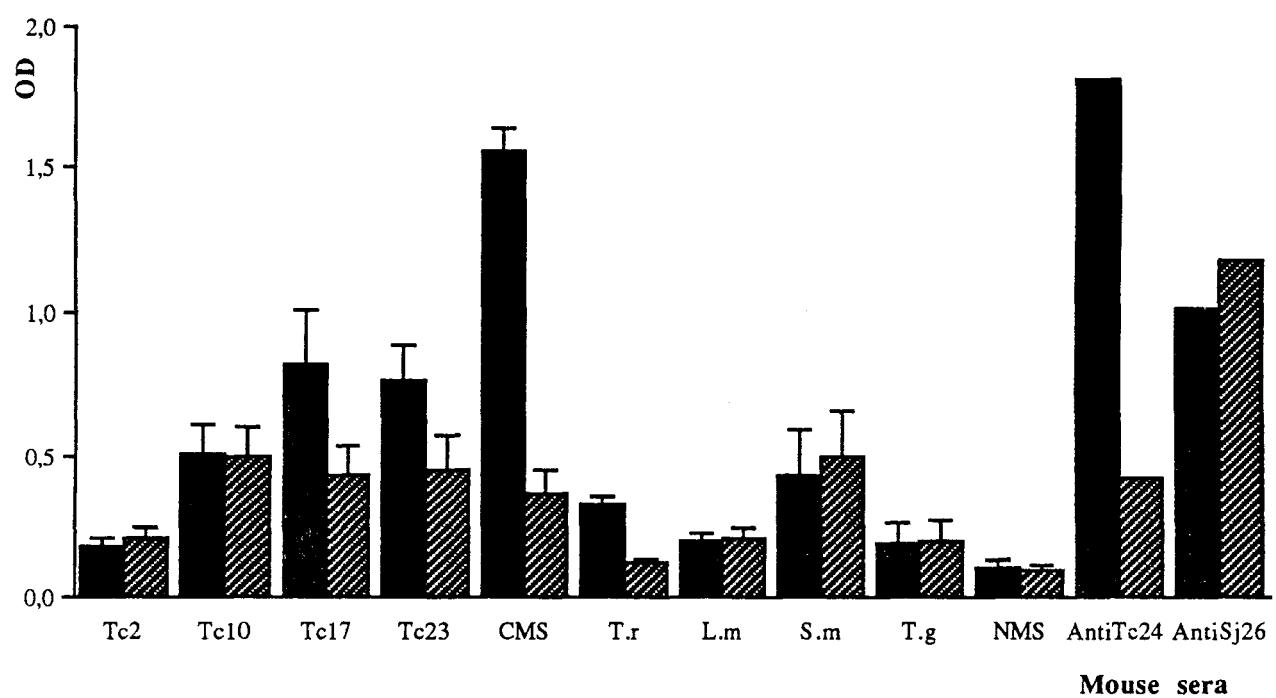


Figure 6

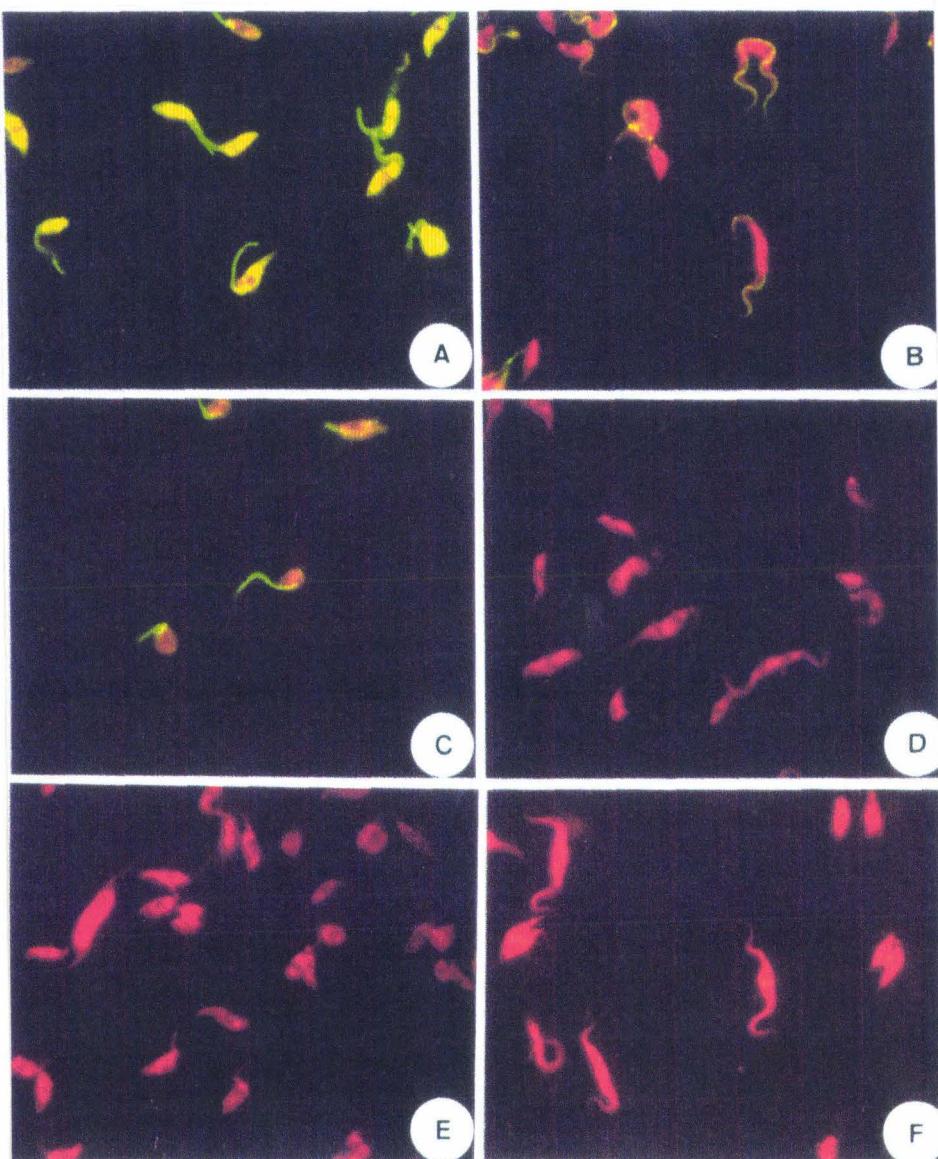


Figure 7

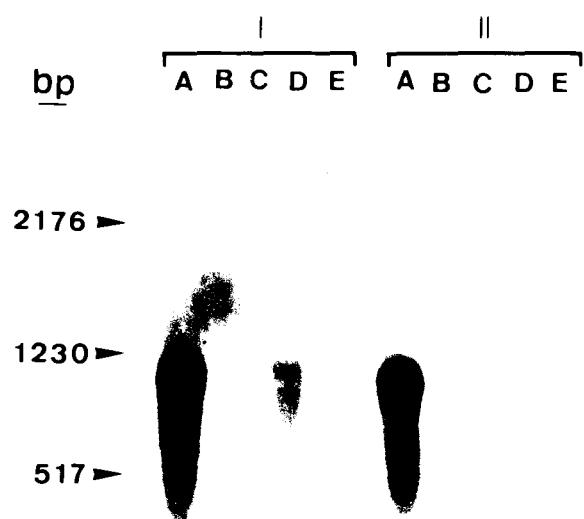
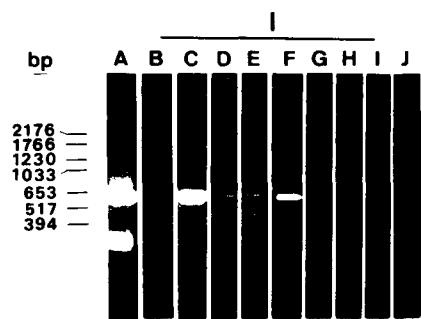


Figure 8



Article 2

UN ANTIGENE RECOMBINANT DE *Trypanosoma cruzi* UTILE POUR LA SURVEILLANCE DU TRAITEMENT DE LA MALADIE DE CHAGAS: RAPPORT CONCERNANT DEUX CAS EN EQUATEUR. (Sous presse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1995)

Quand le diagnostic des patients infectées par *T.cruzi* est réalisé pendant la phase aiguë de l'infection, un traitement spécifique est recommandé. Cependant, l'évaluation de la guérison est difficile car les tests sérologiques conventionnels restent positifs des années après le succès d'un traitement. Ainsi, il est nécessaire d'avoir une méthode simple et fiable pour contrôler la guérison. Au cours de cette étude, nous décrivons un test simple ELISA réalisé avec une protéine recombinante de *T.cruzi* (rTc24) comme antigène.

Ce travail montre:

1. Deux patients chagasiques Equatoriennes en phase aiguë de la maladie dont le diagnostic a été établi par un examen microscopique de frottis sanguin ont fait l'objet de cette étude.
2. Des échantillons de sérums de ces deux patients obtenus avant et deux mois après le traitement ont été analysés par ELISA en utilisant l'antigène rTc24. Les résultats obtenus montrent que les sérums des patients, prélevé avant le traitement, présentent une forte réactivité en ELISA vis-à-vis de Tc24. En revanche, les sérums de ces mêmes patients après traitement sont négatifs.
3. Par contre, avec le test d'immunofluorescence indirecte utilisant comme antigène des épimastigotes, aucune différence significative n'est observée entre les valeurs pré- et post-traitement.
4. De même, la réactivité du sérum des patients chagasiques contre l'antigène rTc24 a été analysée par Western blot. Les sérums post-traitement, montrent une très faible signal vis-à-vis de Tc24 comparativement à la réaction fortement positive obtenue avec le sérum pré-traitement.
5. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de la protéine rTc24 dans le test ELISA pourrait être extrêmement utile pour contrôler l'efficacité thérapeutique au cours de la phase aiguë de la maladie de Chagas après un traitement spécifique.

SHORT REPORT:

IN PRESS: TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE. EDITOR: J. R. BAKER

TITLE: A RECOMBINANT *Trypanosoma cruzi* ANTIGEN USEFUL TO MONITOR CURE OF CHAGAS' DISEASE: REPORT OF TWO ECUADORIAN CASES.

AUTHORS: A.G. Guevara^{1,2,*}, A. Taibi¹, J. Alava³, R.H. Guderian² and A. Ouassis^{1†}.

¹Centre d'Inmunologie et de Biologie Parasitaire, Unité 415, Institut Pasteur-Lille, 1 rue du Pr.Calmette, 59019-Lille Cedex, FRANCE.

²Department of Clinical Research, Hospital Vozandes-Quito, Villalengua 267. Box 17-17-691. Quito-ECUADOR.

³Universidad Técnica de Manabi. Portoviejo-Manabi-ECUADOR

* Corresponding author.

† A.G.G has a scholarship from WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. This work has been supported by a WHO-TDR grant to A.G.G.

Chagas'disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. In the chronic phase it can induce severe cardiac, digestive or neurological disturbances. Most of the human infections are detected in the chronic phase and treatment in such case is controversial. In cases where infected patients are diagnosed in the acute phase of infection specific treatment is highly recommended (CASTRO, 1993). Since conventional serological tests remain positive for years after successful treatment, a simple and safe procedure to assess cure is needed (ANDRADE et al., 1988; GAZINELLI et al. 1988b). On the other hand, negative xenodiagnosis tests have been used as evidence of effective treatment. However, this method is cruel and time-consuming since results are expected some 30 days after vector feeding in treated hosts (BRENER, 1979). Similar constraints are faced when using haemocultures (CAMARGO, 1979). Considerable efforts have been made to improve the efficiency and simplicity in monitoring cure after specific treatment in Chagas' disease. A complement mediated-lysis test (CoML) has been proposed (GALVAO et al., 1993), but limitations such as the use of living trypomastigote forms restrains its wide use. An Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) using soluble and/or excretory-secretory products (ES) from a *T.cruzi* culture as antigen seems to be ideal to replace the CoML test (KRAUTZ et al., 1994). As indicated earlier, the use of living parasite forms to produce sufficient amounts of ES antigens to be used in the ELISA test is a limiting factor.

In the present study, the use of a simple ELISA test utilizing a recombinant *T.cruzi* protein (rTc24) as an effective antigen to monitor cure in acute chagasic patients after treatment with benznidazole, is reported. Previously, a *T.cruzi* trypomastigote cDNA encoding a 24kDa (Tc24) protein which is present among the parasite released antigens, has been characterized (TAIBI et al., 1993). In order to produce a high amounts of rTc24 protein, the corresponding cDNA insert was subcloned in pGEX-2T vector expression system and the fusion protein was purified

as described by SMITH, 1988.

Two patients from an endemic area of Ecuador, province of Manabi, were found positive for acute *T.cruzi* infection by direct observation of trypomastigotes in blood smears. The first patient (CH001) presented with the typical Romana' sign, characteristic of acute Chagas'disease (Figure 1) as well as with mild clinical symptoms of fever and headache. The second patient (CH002) presented only with fever and general malaise. Serum samples from both patients were obtained before and two months after treatment which consisted of Benznidazole 3 mg/kg BID for 60 days. Sera samples were analyzed by ELISA using rTc24 as antigen as described by TAIBI et al., 1995. The results obtained clearly indicated that the post-treatment sera had become negative as compared to the pre-treatment values (Table 1). In contrast, indirect immunofluorescence, using formalin fixed epimastigotes as antigen, showed little or no difference in the pre and post-treatment values. Furthermore, the reactivity of patient (CH001) serum against rTc24 antigen was analyzed by western blot. A weak positive signal was observed against rTc24 with post-treatment serum as compared to the strong positive reaction obtained with pre-treatment serum (Figure 1, panel B). These findings suggest that the use of rTc24 in an ELISA test could be extremely useful to monitor the therapeutical response in acute Chagas'disease after specific treatment. Indeed, we have tested sera from chagasic patients from another endemic area of Ecuador, El Oro province, which did not receive any specific treatment for Chagas'disease. As shown in table 1, panel B, these sera showed a strong reactivity against rTc24. Large scale field trials will be undertaken to assess the usefulness of rTc24 as a tool in monitoring the chemotherapeutic response in patients with an acute infection.

REFERENCES

- Andrade, S.G., Freitas, L.A.R., Peyrol, S., Pimentel, A.R. & Sadigursky, M. (1988). *Trypanosoma cruzi* antigens detected by immunoelectron microscopy in the spleen of mice serologically positive but parasitologically cured by chemotherapy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **21**, 41-42.
- Brener, Z. (1979). Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the western hemisphere. In: *Pharmaceutical Therapy*. Jaffe, J.J. (editor), Editorial Pergamon Press Ltd., pp. 71-90.
- Camargo, M.E. & Funayama, G.K. (1979). Diagnostico de Laboratorio. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Brener, Z. & Andrade, Z. (editors). Rio de Janeiro, Editora Guanabara, pp. 175-198.
- Castro, S.L.de (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, **53**, 83-98.
- Galvao, L.M.C., Nunes, R.M.B., Cançado, J.R., Brener, Z. & Kretli, A.U. (1993). Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **87**, 220-223.
- Gazzinelli, R.T., Galvao, L.M.C., Cardoso, J.E., Cançado, J.R., Kretli, A.U., Brener, Z. & Gazzinelli, G. (1988b). Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**, 1795-1800.
- Krautz, G.M., Coutinho, M.G., Galvao, L.M.C., Cançado, J.R. & Kretli, A.U. (1994). Antigenos solúveis liberados por triatomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste de ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **27** (4), 199-207.
- Smith, D.B. & Johnson, K.S. (1980). Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
- Taibi, A., Plumas-Marty, B., Guevara Espinoza, A., Schöneck, R., Pessoa, H., Loyens, M., Piras, R., Aguirre, T., Gras-Masse, H., Bossus, M., Tartar, A., Capron, A. & Ouaissi, A., (1993). *Trypanosoma cruzi*: Immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *Journal of Immunology*, **151** (5), 2676-2689.

Taibi, A., Guevara, A., Schöneck, R., & Ouassis, A. (1995). Improved detection of *Trypanosoma cruzi* infection by Polymerase Chain Reaction. *Parasitology*. (In press)

TABLE 1

A) Results of direct blood examination, ELISA rTc24 and IIF tests for two acute chagasic patients before and 2 months after specific treatment.

Patients	Age	Blood [@] smear	ELISA rTc24*		IIF°titre	
			Before treat.	After treat.	Before treat	After treat
CH001	16	+	0,375	0,151	1/640	1/320
CH002	51	+	0,380	0,172	1/160	1/80

@ + means presence of *T.cruzi* trypanomastigotes in Giemsa stained thick blood examinations.

* The "cut off" value for ELISA rTc24 was determined by testing 33 *T.cruzi*-negative individuals from the endemic area where the patients came from. Absorbance values above the mean plus 4 standard deviations (**0,227**) were considered as positive.

° Indirect Immunofluorescence assay using formalin-fixed epimastigotes.

B) Results of ELISA using rTc24 in chagasic patients without specific treatment

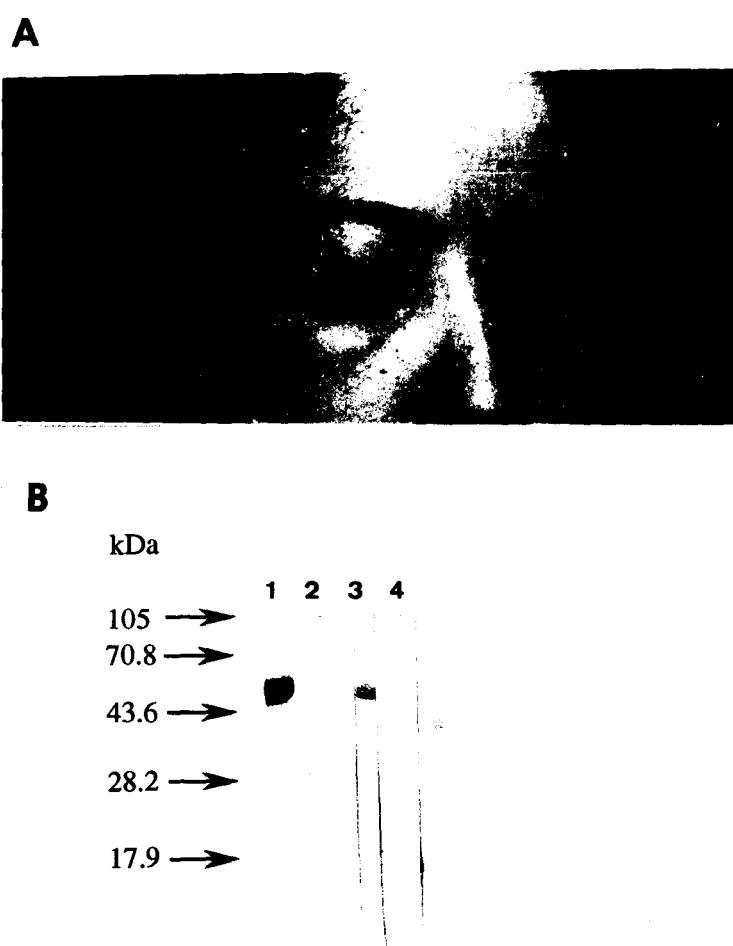
PATIENTS	PROCEDENCE	rTc24* mean (SD)	Total lysate* mean (SD)
n = 55	El Oro	0.808 (0.370)	0.538 (0.086)
n = 19	Quito**	0.050 (0.022)	0.124 (0.050)

* The "cut off" values for ELISA with rTc24 (mean+3SD = **0.267**) and total epimastigote lysate (mean+3SD = **0.216**) as antigen were determined by testing 20 Chagas negative individuals from El Oro province.

** To assess specificity of the antigens, sera of individuals from a non-endemic area were tested also.

LEGEND TO FIGURE 1

- A)** Patient CH001 showing Romana's sign, a typical clinical symptom of acute Chagas'disease.
- B)** Western blot analysis for one of the two patients (CH001) treated during acute Chagas'disease: Lane 1, 13% SDS-PAGE showing Tc24 fusion protein after Coomassie blue stain. Immunoblotting with Tc24 fusion protein showing the reactivity of: negative serum (lane 2); serum from patient CH001 before treatment (lane 3); and serum from patient CH001 after treatment (lane 4).



Article 3

UTILISATION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DE 24 kDa DE TRYPANOSOMA CRUZI POUR SUIVRE LA GUERISON DE LA MALADIE DE CHAGAS HUMAINE (J. Clin. Microbiol. 1995, 33: 2086.)

Les patients chagasiques traités sont considérés comme parasitologiquement guéris par la persistence des tests négatifs en hemoculture et anticorps lytiques. Les tests de lyse négatifs indiquent l'absence d'infection active après traitement spécifique. Cependant, ces essais nécessitent des formes parasitaires infectieuses et ne peuvent donc pas être utilisés en routine dans tous les laboratoires. Au cours de cette étude nous avons utilisé en ELISA et Western blot une protéine recombinante de *Trypanosoma cruzi* (rTc24) comme alternative du test de lyse médié par le complément.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

1. Des patients chagasiques traités que nous avons dénommés "dissociated" ($n = 28$) du fait que leur sérum, bien que négatifs par le test de lyse médié par le complément, étaient positifs par la sérologie conventionnelle, ont été testés par ELISA vis-à-vis de la rTc24. Sur 28 patients "dissociated" 22, soit 79% ne réagissent pas avec la protéine recombinante.
2. Par ailleurs, sur 15 patients "dissociated", 11 soit 79,9%, ne reconnaissent pas la rTc24 par Western blot.
3. Par contre, dans le groupe de patients avec infection active malgré le traitement, tous les sérum testés ($n = 41$) reconnaissent la protéine recombinante dans les deux tests.
4. Ainsi, l'antigène recombinant de 24 kDa de *T.cruzi* peut être utilisé pour évaluer la plupart des guérisons de patients chagasiques suite à un traitement spécifique.

**USE OF A 24-kDa *TRYPANOSOMA CRUZI* RECOMBINANT PROTEIN TO MONITOR
CURE OF HUMAN CHAGAS' DISEASE.**

Running Title: Antibodies to rTc24 in Treated Chagas' Disease.

**GREICE M. KRAUTZ,² LÚCIA M. C. GALVÃO,³ J. ROMEU CANÇADO,⁴ ANGEL
GUEVARA-ESPINOZA,⁵ ALI OUAISI⁵ AND ANTONIANA U. KRETTLI^{1*},³**

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Caixa Postal 1743, 30190-002, Belo Horizonte,
Minas Gerais;¹ Departments of Biochemistry and Immunology² and of Parasitology,³ ICB, and
School of Medicine,⁴ Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil and INSERM
research Unit n° 415, Institut Pasteur, Lille, France⁵

*Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ, Caixa Postal 1743, 30190-002, tel (031) 295 35-
66, FAX (031) 295 3115, Belo Horizonte, Minas Gerais.

ABSTRACT

A 24 kDa recombinant protein from *T. cruzi* (rTc24) was evaluated in ELISA and Western blot tests to identify treated chagasic patients considered parasitologically cured, based on persistently negative tests of hemocultures and lytic antibodies. Some of these patients were termed dissociated because their sera, although negative for the complement mediated lysis test, were positive by conventional serology. The negative lysis test indicates the absence of active infection after specific treatment, but this assay requires live and infectious parasites and can not be used easily in a laboratory routine. Here we tested the rTc24 in ELISA and Western blot as an alternative for the complement mediated lysis test. In the group of patients with active infection, despite the treatment (not cured patients), all the sera tested recognized rTc24 in both tests. In the dissociated patients, approximately 80% of the sera did not react with rTc24 in ELISA or Western blot, in agreement with the negative complement mediated lysis tests. Thus, the 24 kDa *T. cruzi* recombinant antigen, when used for initial trials to evaluate cure of chagasic patients submitted to specific treatment, will allow the identification of most but not all cases.

INTRODUCTION

Chagas' disease is one of the main problems of public health in Latin America, where approximately 16 to 18 million people are infected with *Trypanosoma cruzi*. Characterized by an acute phase that lasts approximately 2 months this infection progresses to a life long chronic phase. Most patients are diagnosed during the chronic phase using conventional serology tests (CS), i. e. indirect immunofluorescence (IIF), complement fixation reaction (CFR) and indirect hemagglutination (IH). During the chronic phase, the circulating trypomastigotes are scarce and only detected by indirect methods such as xenodiagnosis and hemoculture. Using repeated testing and modifications of the established hemoculture technique, the sensitivity has recently been increased allowing for the detection of the parasite in 95% of chronic patients (19).

The treatment of Chagas' disease with nitroimidazole derivatives in both acute and recent chronic infections, may prevent pathologic effects in the later stages of disease (6). The indication of such treatment in the chronic phase is still controversial because most treated patients continue to have positive CS, even though their hemocultures becomes less frequently positive than in the untreated, chronically infected patients (7). The serological test of complement mediated lysis (CoML) has been used as an alternative method to determine cure and detects the presence of protective antibodies that circulate during chronic infections, but not in the uninfected immunized host (13). The protective antibodies, so called lytic antibodies, recognize antigens on the surface of living trypomastigotes and represent a distinct class of antibodies from those detected by CS. The latter, found in non-protected immunized hosts, do not recognize living trypomastigotes in the CoML (13) or their antigens of high molecular weights (150-160 kDa) in immunoprecipitation assays (20).

Patients in the chronic phase, consistently positive by the CoML assay, may become negative 6-8 months after specific treatment. Among treated patients, about 20% present repeatedly negative CoML tests for years, although their CS remained positive. These patients, named "dissociated", have been considered cured (14). After a ten year follow-up the negative

hemoculture confirmed that they have in fact resolved the infection (7). Thus, the CS is not a reliable method to asses cure after treatment.

A negative CoML test predicts elimination of *T. cruzi* in treated patients, but this test has practical limitations since it requires live and infectious parasites (15). To identify an antigen(s) specifically recognized by the lytic antibodies, and thus allow for detection of cure through more practical tests such as, ELISA and Western blot has been our goal. Purified *T. cruzi* antigens were recently tested using ELISA, which included the GP57/51 glycoprotein characterized as a cysteine proteinase (21) and trypomastigote excreted-secreted antigens. A high correlation (70 and 90%, respectively) between negative ELISA and CoML was observed (8, 11). Additionally, the glycoconjugate, F2, extracted from trypomastigotes (74 and 96 kDa MW) was recognized by the sera of chagasic patients with positive CoML, but not by sera from dissociated patients (2).

The ideal antigen to be used in tests to replace the CoML is the 160 kDa glycoprotein, considered one of the target epitopes of the lytic antibodies on the surface of the parasite, since only sera from patients that had the lytic antibodies recognized GP160 (20). GP160 purified from trypomastigote surfaces (22) has been characterized as a regulatory protein for C3 convertase activity in the complement system (23), being capable of binding the C3b component. Indeed, C3b had been found on the surface of circulating blood trypomastigotes from mice (16) and binds to culture forms (9). Antibodies against the GP160 induce trypomastigote lysis, probably because they block the regulatory activity of GP160, allowing the complete activation of the complement system (22, 23). Favoring this hypothesis is the previous finding that the Ig-Fc portion of the lytic antibody from chronic chagasic patients, is not necessary for the lysis (10), making more likely the process of activation through the alternative pathway (12).

GP160, isolated in a C3b affinity column, has recently been tested using sera from chagasic patients in Western blots. All sera from non-treated chagasic patients were positive, while sera from dissociated patients were negative, correlating with the negative results of CoML and confirming its applicability as a specific indicator of parasitological cure after treatment (24).

Purification of GP160 and obtaining it in high amounts are limiting factors since 10^{10} parasites yield only 5 μ g of protein, moreover, the protein is rapidly degraded, even when stored at -70°C (22). Due to these technical limitations we have not used GP160 in these present studies, however when available as a recombinant protein its use will be more feasible.

Since purified antigens in ELISA discriminate most patients with negative CoML tests (2, 8, 11) and considering the importance of appropriately monitoring treated chagasic patients; we proceed in a search for an ideal antigen for detecting all cured patients. In this work we describe, for the first time, the use of a recombinant *T. cruzi* protein, rTc24, in ELISA and Western blot in an attempt to identify all the dissociated individuals. Our interest in testing this protein resulted from the recent demonstration of its ability to induce lytic antibodies and to induce protection in 30-40% of immunized mice against *T. cruzi* infections (28).

MATERIALS AND METHODS

Patients. Sera from chronic chagasic patients, with cardiac and indeterminate forms of the disease, all treated and clinically evaluated by Dr. J.R. Cançado were studied. The group was composed of 69 chagasic patients treated with either 3-methyl-4(5'-nitrofurfurylideneamino)-tetrahydro-4H-1,4-thiazine-1-dioxide (nifurtimox) or N-benzil-1-nitro-1-imidazoleacetamide (benznidazole). On the basis of the positive CoML and IIF tests, 41 of these 69 treated patients were considered non-cured. This group includes 14 patients with positive parasitologic test results (hemoculture) and 27 patients with negative hemoculture results. Another group of 28 similarly treated patients had repeatedly negative results with the hemocultures and the CoML test and positive CS for Chagas' disease, namely dissociated and considered cured. A third group of four cured patients was consistently negative by serology (CoML and IIF) and parasitologic test (hemoculture and xenodiagnosis). The control group, of 36 non-chagasic, include individuals from endemic and non endemic areas who had at least three negative serologic results for *T. cruzi*.

Informed consent was obtained from the patients or their guardians and the human experimentation guidelines of the Federal University of Minas Gerais (Belo Horizonte, Brazil) were followed in conducting the clinical research.

Subcloning and purification of Tc24. A *T. cruzi* trypomastigote cDNA clone encoding a 24 kDa protein (Tc24) (28) was purified and subcloned in a pGEX plasmid known to be a high expression vector. The pGEX-2T vector directs the synthesis of foreign polypeptides in *Escherichia coli* as a fusion polypeptide with the 26 kDa *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase (Sj26). The DNA insert encoding the Tc24 protein, was ligated in the corresponding cloning site of the plasmid and the products expressed in *E. coli*. Positive clones were selected and the purification of the fusion protein carried out as described (27). The purity of the recombinant protein was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (17).

ELISA technique. Standard ELISA test (5) was used to detect antibodies against the recombinant Tc24 protein in sera from treated chagasic patients. The optimal concentrations of serum, antigen and conjugate were determined by checkerboard titration. Briefly, Immulon I plates (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, USA) were coated with 100 μ l of 0.5 g/ml of Tc24 recombinant antigen in 0.05 M carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6), and the plates were incubated overnight at 4°C. The unbound material was discarded and all plates were blocked with 200 μ l of 0.15 M phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2) containing 0,05% Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and 1% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) for 2 h at 37°C. After 5 washes with PBS-Tween 20, 100 μ l of human sera diluted 1:100 in PBS-Tween 20 and 0.3% of BSA were added and incubated for 2 h at 37°C. The plates were washed 10 times with PBS-Tween 20, 100 μ l of a 1:1,000 of the dilution of the peroxidase-conjugate anti-human immunoglobulin G (gamma-chain specific) (Sigma Chemical

Co., St. Louis, MO, USA) were added to the wells and incubated for 1 h at 37°C. After 10 washes with PBS-Tween 20, 100µl of a 1:1 mixture of 2,2-azino-di(3-benzthiazolidine sulfonate) (ABTS) and hydrogen peroxide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were added to each well, and incubated 15 minutes at 37°C. The reaction was stopped by adding 50µl of 10% sodium dodecyl sulfate solution to each well. Optical density was measured at 405 nm by using an automated ELISA reader (model 2550 EIA Reader; BIO-RAD Laboratories). All the assays were carried out in duplicate. Since the Tc24 recombinant protein was expressed as a fusion protein with the GST, parallel ELISA assays were carried out using the GST recombinant protein alone as antigen, in the same conditions as Tc24 fusion protein.

Western blot analyses. Seventy-five micrograms of recombinant Tc24 were electrophoresed in a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel, and the proteins were transferred from the gels to nitrocellulose paper (Bio-Rad) (29). After transfer, the nitrocellulose paper was blocked by using a solution of PBS (pH 7.2), 0.05% Tween 20 and 5% delipidized milk and incubated overnight at 4°C. Strips of paper, were then cut and incubated separately with a 1:100 dilution of human chagasic serum for 2 h at room temperature. Control sera from both non-chagasic individuals and chagasic treated and cured were also analyzed. Strips were then washed 3 times in PBS-Tween 20 and incubated for 2 h at room temperature with the alkaline-phosphatase conjugate anti-human immunoglobulin G (heavy- and light-chain specific) (PROMEGA, Madison, WI, USA) diluted 15,000 times in PBS-Tween 20. The strips were washed as before and a 1:1 mixture of nitro blue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-phosphato (BCIP) (PROMEGA, Madison, WI, USA) was added as a substrate. After color development, the reaction was stopped by immersion of the strips in distilled water.

RESULTS

The ability of the fusion protein, rTc24, to detect chagasic infections was evaluated by ELISA, comparing its average reactivity to that obtained with glutathione-S-transferase (GST) isolated from the non-recombinant plasmid. Forty-one sera from treated patients considered non-cured based on the consistently positive results of CS and CoML, and 35 sera from non-chagasic individuals were tested (Fig. 1). Sera from chagasic patients recognized specifically the *T. cruzi* epitope expressed by rTc24 (average absorbance = 0.501), with little reactivity to GST (average absorbance = 0.066) (Fig. 1). Sera from normal individuals reacted weakly with rTc24 (average absorbance = 0.120), probably recognizing the GST portion of the recombinant protein (average absorbance = 0.107). Although sera from non chagasic individuals reacted more strongly with GST than did chagasic sera, these values are not significantly different ($P > 0.05$). The values obtained using the rTc24 specific ELISA were analyzed by subtracting from values obtained in the GST specific ELISA. The cutoff value against the rTc24 protein was defined by average of normal sera absorbances (0.025) plus two standard deviations that resulted in 0.1.

The antibody levels against rTc24 measured by ELISA in individual serum of treated chagasic patients from the different groups as well as from non-chagasic controls are in Fig. 2. All sera from the treated but not-cured patients (14 of them parasitological positive and 20 negative) reacted with rTc24, showing absorbance values greater than 0.1 (Fig. 2). There were no significant difference between the two groups of treated chagasic patients. Within 28 sera from treated dissociated patients (negative CoML, but positive IIF), 22 (79%), showed absorbance values lower than 0.1, similar to the sera from non-chagasic individuals. Sera from 6 dissociated patients showed similar antibody levels to those observed in the treated but not-cured chagasic patients, whereas sera from 4 cured patients (negative CoML and IIF) showed reaction with rTc24 similar to normal sera from individuals, living or not, in endemic areas.

Tested by rTc24 specific Western blot (Figure 3) all the sera from treated but not-cured chagasic patients recognized the fusion protein, regardless of positive (Fig.3A, lanes 2 to 12) or

negative hemocultures (Fig. 3B, lanes 2 to 11). Within the 15 sera from treated dissociated patients, 11 had their ability of recognizing rTc24 lost or decreased (Fig. 4A, lanes 14 to 23 and 4B, lane 24), thus correlating with the negative results of CoML and hemoculture. Sera from dissociated patients with absorbance values higher than 0.2 (Fig 2), recognized rTc24 in Western Blot (Fig. 4B, lanes 25 to 28), whereas two that presented borderline absorbance values (0.1) (Fig. 2) did not react with rTc24 in a Western blot (Fig 4A, lanes 16 and 23). Sera from one cured patient (negative CoML, IIF, and hemoculture) was also negative in the reaction (Fig. 4A, lane 13).

DISCUSSION

CS tests, which are very important for the diagnosis of infection with *T. cruzi* in the chronic phase, have limitations when used as a criterion of therapeutic cure. In a follow up study of 100 treated patients, the levels of cure were only 8% if the negative CS was used as a criterion. However, 60% of these patients had repeatedly negative results using xenodiagnosis (6). In another ten year follow up study of 82 treated patients, only 9% of the patients could have been considered cured by the negative results of CS even though 26% of them, consistently positive by CS, had negative CoML. Such patients, described as "dissociated" have been considered cured and theirs hemocultures, an average of 3.3 tests for each patient, negative (7).

We now evaluated the use of ELISA and Western blot tests using a recombinant 24 kDa protein of *T. cruzi*, as an alternative for the CoML test. This protein is found in the membrane of all the evolutive stages of the parasite, particularly in the flagellum of trypomastigote and epimastigote forms (4, 25, 28). Its gene sequence shows similarities to the sequence of several proteins that bind calcium (4, 18). Tc24 has high antigenicity as determined by the high frequency with which it has been cloned by screening with sera from chagasic patients or animals in experimental chronic phase of infection (4, 18, 25, 28). Tc24 purified from cultured *T. cruzi* has

been used for the specific diagnosis of human Chagas' disease (26). Two synthetic peptides derived from the primary sequence of rTc24 were used to immunize BALB/c mice. One of them decreased up to 50% the mortality in the acute phase, this protection being attributed to an epitope that stimulated the proliferation of T cells. The other peptide, despite inducing significant levels of IgG1 antibodies, did not result in protection (28).

Our results confirm the immunogenicity of Tc24, since all sera from treated but not-cured patients who had active infections in spite of treatment, recognized the fusion protein in ELISA and Western blot. The reactivity was specific for the *T. cruzi* antigen, since those sera recognized weakly the GST from *S. japonicum*. In fact, sera from chagasic patients or normal individuals react weakly with the portion of the recombinant protein non-related to *T. cruzi*, a problem that can be solved by obtaining the recombinant antigens in expression vectors that allow for the separation of the protein of interest.

Specific antibodies against rTc24 persist in approximately 20% of the sera from dissociated patients. It is possible that they produced high levels of antibody against Tc24 before the treatment that persisted after elimination of the parasite. Alternatively, residual antigens of *T. cruzi*, which has been demonstrated in treated and cured mice (3) could induce specific anti-Tc24 antibodies without live parasites.

Despite the high positive correlation between the specific ELISA for rTc24 and CoML, this antigen is not the main target for lytic antibodies. Sera from mice immunized with rTc24 were able to induce lysis of only 15% of the trypomastigote forms (28). Moreover, previous studies have indicated that important targets recognized by the lytic antibodies are glycoconjugates containing the galactosyl terminal residue (1, 2), as well as the GP160 (22) a molecule that seems to block the activation of the C3 convertase present on the surface of the parasite (23).

In conclusion, we demonstrated that it is possible to distinguish between the majority of the dissociated treated patients and the treated but not-cured patients using the 24 kDa protein from *T. cruzi* in ELISA and Western blot assays. This finding has practical implications since it is

possible to synthesize in large amounts pure recombinant proteins and additionally, these are likely more stable than antigens purified from cultured parasites. Such factors make viably the use of recombinants for initial trials to evaluate cure of chagasic patients submitted to specific treatment.

REFERENCES

1. Almeida, I. C., S. R. Milani, P. A. J. Gorin, and L. R. Travassos. 1991. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *J. Immunol.* **146**: 2394-2400.
2. Almeida, I. C., G. M. Krautz, A. U. Krettli, and L. R. Travassos. 1993. Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kDa antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti- α -galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *J. Clin. Lab. Anal.* **7**: 307-316.
3. Andrade, S. G., L. A. R. Freitas, S. Peyrol, A. R. Pimentel, and M. Sadigursky. 1988. *Trypanosoma cruzi* antigens detected by immunoelectron microscopy in the spleen of mice serologically positive but parasitologically cured by chemotherapy. Preliminary report. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **21**: 41-42.
4. Engman, D. M., K. H. Kranse, J. H. Blumin, K. S. Kim, L. V. Kirchhoff, and J. E. Donelson. 1989. A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* **264**: 18627-18631.
5. Engvall, E., and P. Perlmann. 1971. ELISA. Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **8**: 871-94.
6. Ferreira, H. O. 1990. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **23**: 209-211.
7. Galvão, L. M. C., R. M. B. Nunes, J. R. Cançado, Z. Brener, and A. U. Krettli. 1993. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease: a 10 years follow-up study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 220-223.
8. Gazzinelli, R. T., L. M. C. Galvão, G. M. Krautz, A. P. C. A. Lima, J. Scharfstein, and A. U. Krettli. 1993. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote shed antigens to gauge cure in human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 625-635.

9. Joiner, K. A., W. Dias da Silva, M. T. Rimoldi, C. H. Hammer, A. Sher, and T. L. Kipnis. 1988. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertases. *J. Biol. Chem.* **263**: 11327-11335.
10. Kipnis, T. L., A. U. Krettli, and W. Dias da Silva. 1985. Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand. J. Immunol.* **22**: 217-226.
11. Krautz, G. M., M. G. Coutinho, L. M. C. Galvão, J. R. Cançado, and A. U. Krettli. 1994. Antígenos solúveis liberados por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste de ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **27**: 199-207.
12. Krettli, A. U., P. Weisz-Carrington, and R. S. Nussenzweig. 1979. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.* **37**: 416-423.
13. Krettli, A. U., and Z. Brener. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigotes antibodies. *J. Immunol.* **128**: 2009-2012.
14. Krettli, A. U., J. R. Cançado, J. R., and Z. Brener. 1982. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **76**: 334-340.
15. Krettli, A. U. 1984. Protective antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections: detection, functional activity and possible mechanisms of trypomastigote killing *in vivo* and *in vitro*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **79**: 59-65.
16. Krettli, A. U., and L. C. Pontes de Carvalho. 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**: 270-77.

- 17. Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- 18. Lizardi, P., T. J. Lerne, A. Gonzalez, and N. Nogueira.** 1985. Expression in *Escherichia coli* of cDNA clone encoding a hypothetical calcium-binding protein from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, p. 67-70. *In:* R. A. Lerner, R. M. Cahnock and F. Brown (ed.), Cold Spring Harbor Vaccines 85, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- 19. Luz, Z. M. P., M. G. Coutinho, J. R. Cançado, and A. U. Krettli.** 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **27**: 143-148.
- 20. Martins, M. S., L. Hudson, A. U. Krettli, J. R. Cançado, and Z. Brener.** 1985. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **61**: 343-350.
- 21. Murta, A. C. M., P. M. Persechini, T. de Souto Padron, W. de Souza, J. Guimarães, and J. Scharfstein.** 1990. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**: 27-46. -
- 22. Norris, K. A., G. Hart, and M. So.** 1989. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* **57**: 2372-2377.
- 23. Norris, K. A., B. Brat, N. R. Cooper, and M. So.** 1991. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* **147**: 2240-2247.
- 24. Norris, K. A., L. M. C. Galvão, J. E. Schrimpf, J. R. Cançado, and A. U. Krettli.** 1994. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infect. Immun.* **62**: 4072-4074.

- 25. Ouaissi, A., T. Aguirre, B. Plumas-Marty, M. Piras, R. Schoveck, H. Gras-Masse, A. Taibi, M. Loyens, A. Tartar, A. Capron, and R. Piras.** 1992. Cloning and sequencing of a 24-kDa *Trypanosoma cruzi* specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol. Cell* **75**: 11-17.
- 26. Piras, R., T. Aguirre, M. A. Boschetti, and M. M. Piras.** 1990. Purification by a monoclonal antibody of a *Trypanosoma cruzi*- specific antigen useful for serodiagnosis of Chagas' disease. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **8(suppl 2)**: 974.
- 27. Smith, D. B., and K. Johnson.** 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Gluthatione-S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- 28. Taibi, A, B. Plumas-Marty, A. Guevara-Espinoza, R. Schoneck, H. Pessoa, M. Loyens, R. Piras, T. Aguirre, H. Gras-Masse, M. Bossus, A. Tartar, A. Capron, and A. Ouaissi.** 1993. *Trypanosoma cruzi*: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J. Immunol.* **151**: 2676-2689.
- 29. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Comparison of the average reactivity of sera from 41 treated but not cured chagasic patients (TNC) and from 36 non-chagasic individuals (NCh) with the 24 kDa recombinant protein of *T. cruzi* (rTc24) and the glutathione-S-transferase of *S. japonicum* (GST) by ELISA.

FIG. 2. IgG antibodies against the recombinant protein of *T. cruzi*, rTc24, detected by ELISA, using sera of treated but not cured chagasic patients (TNC) with positive (+) or negative (-) hemocultures, treated dissociated (TD), treated cured (TC) and non-chagasic individuals (NCh).

FIG. 3. Western blot of the fusion protein rTc24 using sera from non chagasic individuals (1A and 1B), and from treated but not cured chagasic patients with positive (2-12A) or negative (2-11B) hemocultures.

FIG. 4. Western blot of the fusion protein Tc24 using sera from two non chagasic individuals (12A and 1B), two treated but not-cured patients (4 and 7), one treated cured patient (13A), 15 treated dissociated patients being that 11 were negative by ELISA (14-23A and 24B) and 4 positive (25-28B).

Figure 1

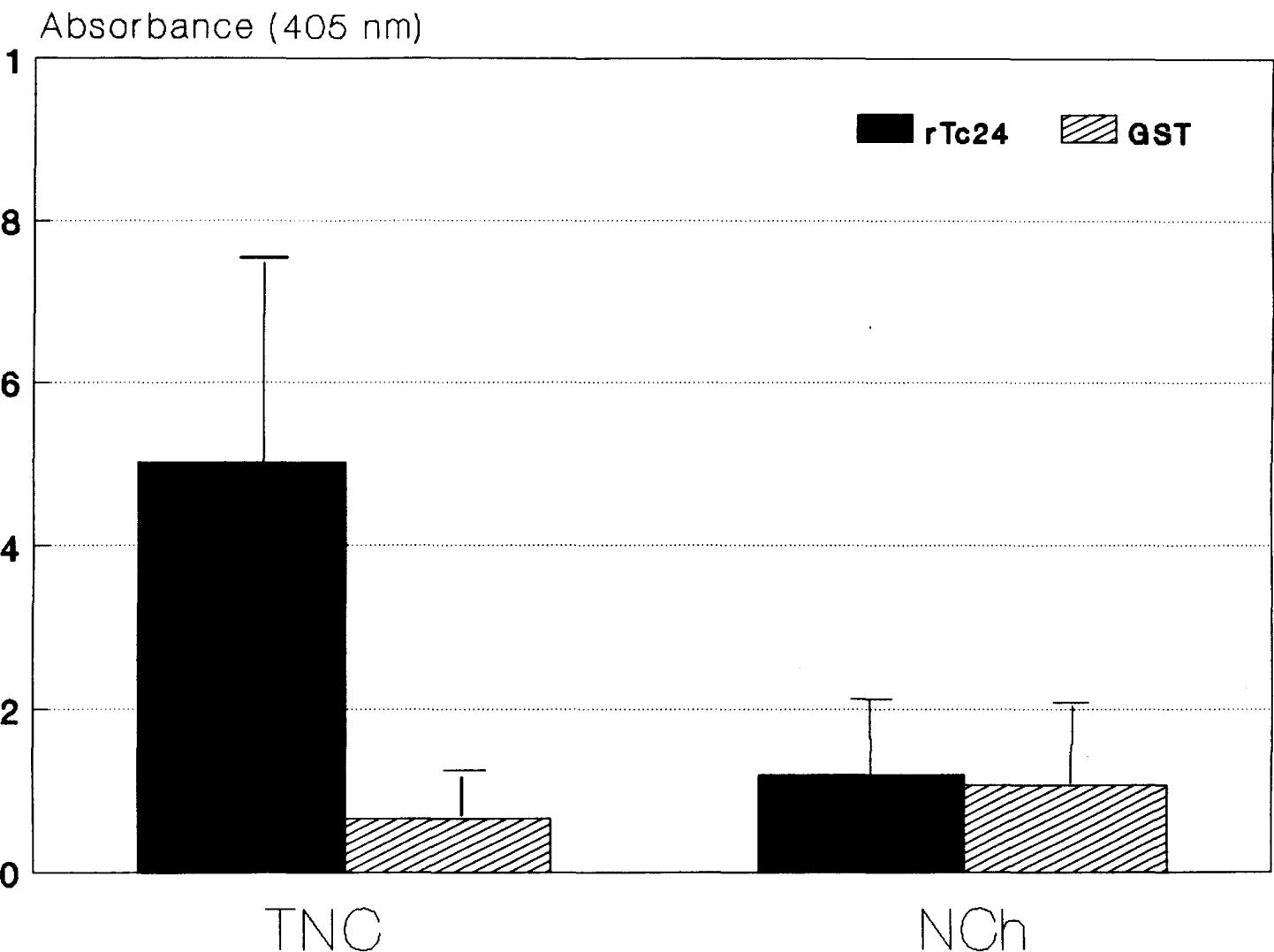


Figure 2

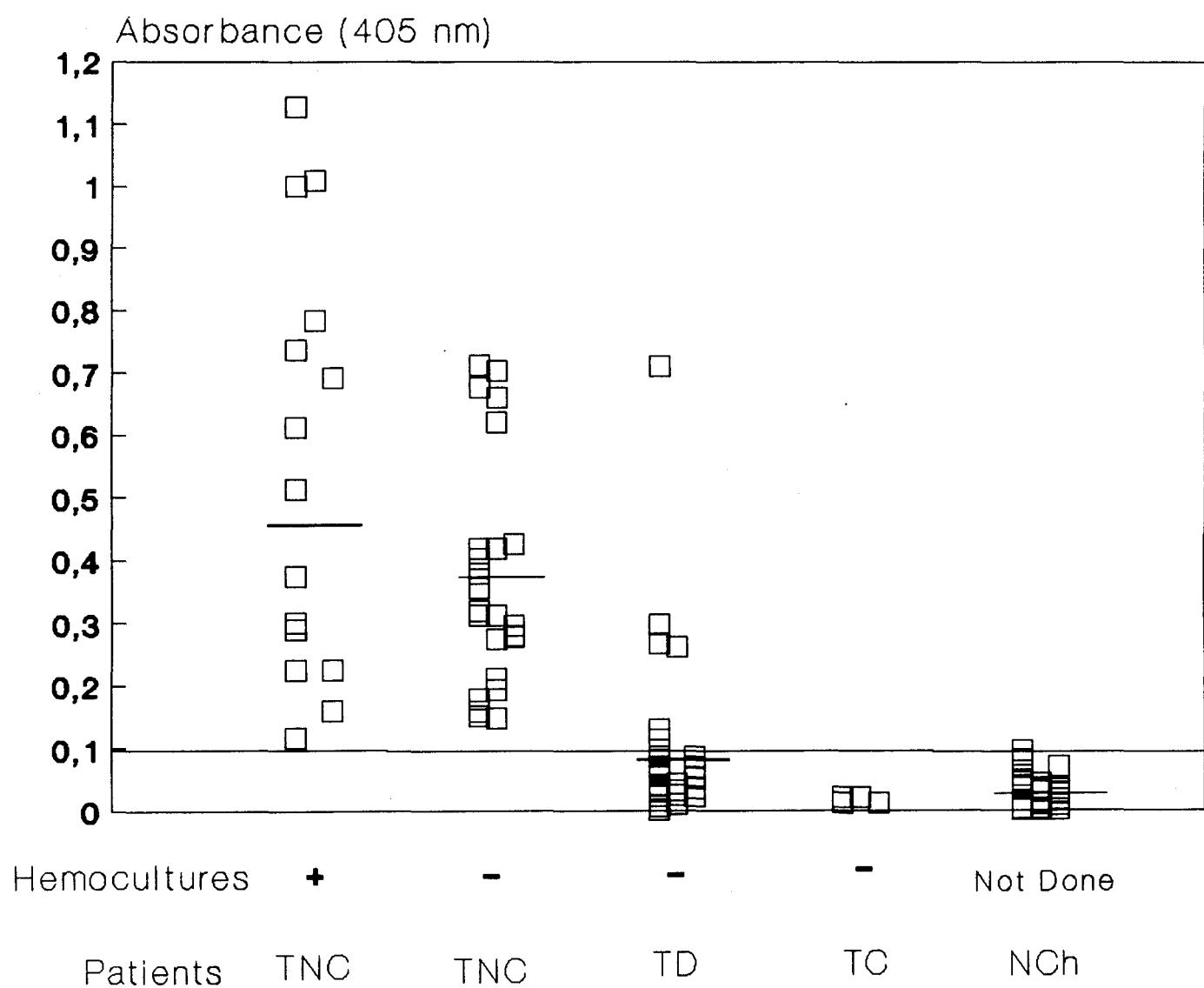


Figure 3

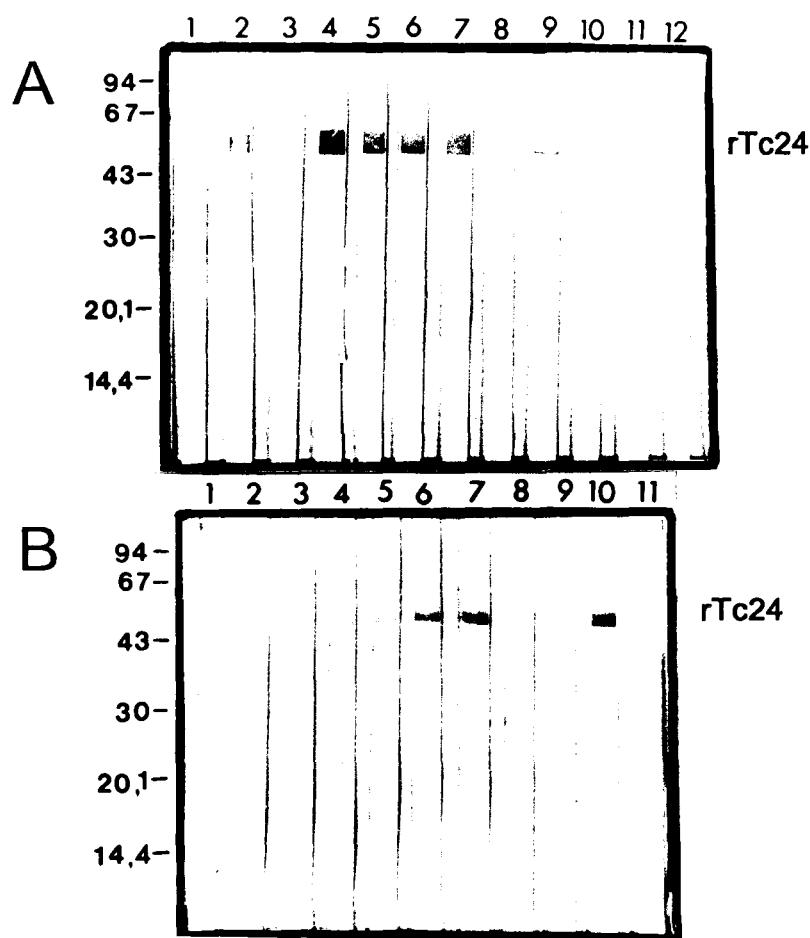
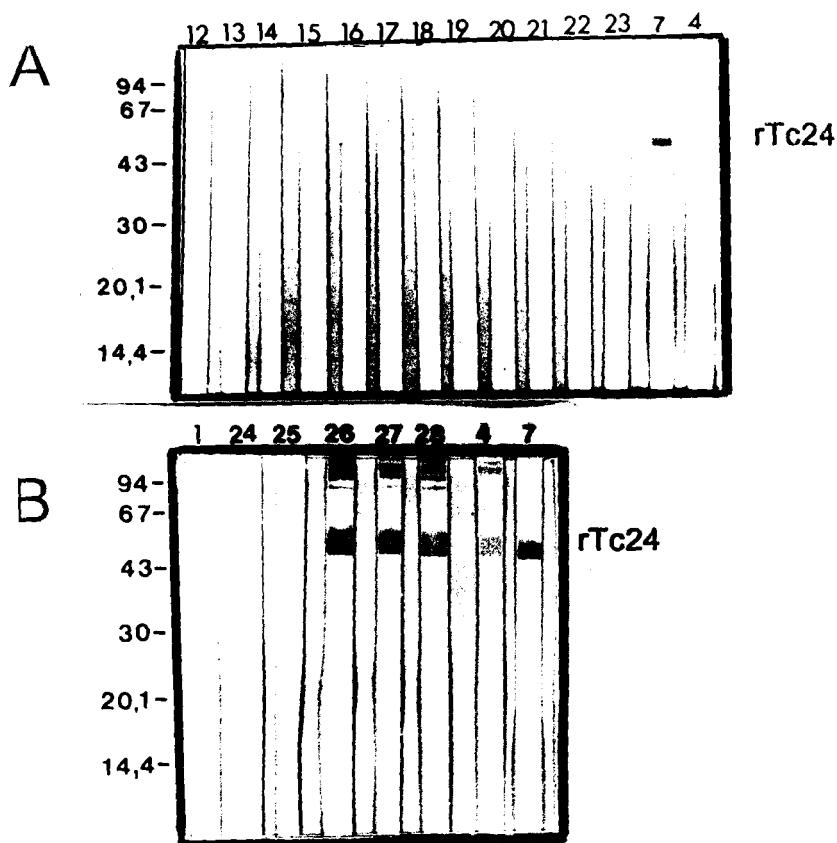


Figure 4



Article 4

UNE PROTEINE RECOMBINANTE IMMUNOPROTECTRICE VIS-À-VIS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* INDUIT UNE PROFIL D'INTERLEUKINES DE TYPE Th1 (Soumis: *Infection and Immunity*. 1995)

Des souris BALB/c et deS rats Fischer mâles immunisés avec les produits d'excrétion-sécrétion sont protégées d'une façon significative vis-à-vis de la mortalité en phase aiguë de l'infection par *T.cruzi*. Les sérums d'animaux immunisés avant infection montrent une réactivité vis-à-vis de deux composants majeurs de 24 et 85 kDa. Ces sérums nous ont permis de cibler une banque d'expression d'ADNc du stade trypomastigote. Dans le présent travail nous avons sous cloné l'ADNc correspondant à la Tc24 dans un vecteur d'expression fort qui nous a permis d'obtenir des quantités suffisantes de Tc24 pour étudier la réponse immune vis-à-vis du composant de 24 kDa dans l'infection expérimentale par *T.cruzi*.

Ce travail montre:

1. La protéine Tc24 est présente dans toutes les souches de *T.cruzi* testées (CL, ECH, C23, Tehuantepec, Tulahuen et Y).
2. De souris BALB/c immunisées avec la protéine recombinante en association avec Bordetella pertussis et de l'alum comme adjuvant sont partiellement protégées contre l'infection lethale par *T.cruzi*.
3. L'étude de la réponse immunitaire cellulaire induite par la protéine recombinante montre que la rTc24 est capable de stimuler la prolifération des cellules T *in vitro*.
4. La protéine Tc24 induit un profil de type Th1 (sécrétion de l'IL2, IFN γ et pas d'IL5 ni d'IL10)
5. Notre étude est le premier travail montrant que l'immunisation avec une protéine parasitaire de *T.cruzi* peu induire un profil de cytokines de type Th1 lié à une activité protectrice.

Title:

**A PROTECTIVE Trypanosoma cruzi RECOMBINANT PROTEIN
INDUCES A Th1-LIKE INTERLEUKIN PROFILE.**

Running title: A Trypanosoma cruzi antigen induces a Th1-like interleukin profile.

SUBMITTED TO INFECTION AND IMMUNITY

Authors:

Ali TAIBI^o, Angel GUEVARA ESPINOZA[§], and Ali OUAISI*

Address:

Research Laboratory on Trypanosomatides.U415 INSERM. Institut Pasteur-LILLE. 1, rue du Pr.Calmette. 59019 LILLE-Cédex-FRANCE.

* To whom correspondence should be addressed.

Tel: 33-20877967. Fax: 33-20877888.

^o Present address: Institute of Molecular Biology. Free University of Brussels (VUB).

65 Pardenstraat. 1640 Sint Genesius Rode. BELGIUM.

§ A.G.E. is on leave from the Department of Clinical Investigations. Hospital Vozandes.17-17-691 Quito. ECUADOR.

ABSTRACT

In previous studies we have shown the protective value of *T.cruzi* excretory/secretory antigens (ESA) as well as a synthetic peptide derived from the primary sequence of a 24 kDa protein present among ESA in mice and rats challenged with *T.cruzi* lethal dose. In the present study, the 24 kDa polypeptide was produced as a fusion protein in the pGEG-2T vector system. Western blot assays revealed that Tc24 is expressed by all *T.cruzi* strains so far examined (CL, ECH, C23, Tehuantepec, Tulahuen, and Y). Furthermore, the immunization of BALB/c mice with Tc24 fusion protein showed that the protein has the capacity to induce a significant level of protection of BALB/c mice against lethal *T.cruzi* infection. Moreover, total splenic cells as well as T-cells from Tc24-immune mice proliferate after specific antigenic stimulation. In addition, splenic cells from *T.cruzi* chronically infected mice recognize the recombinant antigen since they proliferate after *in vitro* stimulation. Moreover, significant levels of IL-2 and IFN-gamma were detected in supernatants from Tc24-immune cells after Tc24 antigen stimulation. In contrast, no detectable amounts of IL-4, IL-5 or IL-10 could be detected in those supernatants. Taken together, these results demonstrated that the recombinant *T.cruzi* antigen is able to induce a Th1-like cytokine profile which could explain the protection achieved when this protein is used as immunizing agent. These results are consistent with other studies indicating that protection against *T.cruzi* in murine model is closely related to T cell immune response and particularly the production of IL-2 and gamma-interferon. To our knowledge, this is the first report showing a protective *T.cruzi* recombinant protein able to induce a Th1-like interleukine profile.

INTRODUCTION

Chagas' disease or American trypanosomiasis, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects around 16-18 million people in Central and South America. Since, there is no efficient chemotherapy for infected patients the actual control of Chagas' disease is restricted to insecticide spraying and serological screening of blood donors (32). Unfortunately, chemotherapy lacks continuity (4) and blood screening after does not detect most early acute cases. A number of studies have revealed that *T. cruzi* is vulnerable to immune attack (12, 26, 27) and this may provide some hope of developing active protection against this pathogen. The arms of the immune system which may account for protection against *T. cruzi* infection include antibodies, T cells (CD4⁺ and CD8⁺), natural killer cells and granulocytes (25). Furthermore, the role of cytokines in immune protection mechanisms has been clearly demonstrated. Administration of IL-2 and IFN-gamma resulted in increased clearance of parasites (9, 19). Moreover, *Xid* mice which control *T. cruzi* infection have been shown to produce higher levels of IFN-gamma and IL-2 and lower levels of IL-10 than susceptible mice (13). In addition, the early production of IFN-gamma during acute murine *T. cruzi* infection has been reported (29). Thus, it is reasonable to assume that any parasite component which could induce increased production of IL-2 and IFN-gamma without tissue pathology would be considered as potential protective antigen.

The need for a vaccine against Chagas' disease remains controversial (5). However, studies performed have revealed that some parasite antigens could confer protection against *T. cruzi* infection in experimental models (2, 3, 8, 24, 33). Although these observations suggested that partial protection against *T. cruzi* could be developed by immunization with parasite antigens, the mechanisms underlying such protective immunity remains unknown.

In previous studies we showed that a synthetic peptide derived from the primary sequence of a 24 kDa protein, present among parasite excretory-secretory antigens, contains a T cell epitope with protective activity (24). Here we evaluated the immunoprotective value of the 24 kDa antigen expressed as a fusion protein, namely rTc24, in the pGEX-2T vector. The results of this study clearly demonstrate that this antigen protects BALB/c mice of lethal *T. cruzi* challenge. In addition, significant levels of IFN-gamma and IL-2 are produced after

immunization with Tc24 recombinant protein. In contrast, no detectable amounts of IL-4, IL-5 or IL-10 were observed. To our knowledge, this is the first report showing a recombinant protein capable to protect against *T. cruzi* lethal challenge and inducing a Th1-like interleukin profile.

MATERIALS AND METHODS

Parasites

Bloodstream derived trypomastigotes of the Y strain of *T. cruzi* were maintained by serial passage in BALB/c mice and used for experimental infections. Culture derived trypomastigotes of different *T. cruzi* strains (CL, ECH, C23, Tehuantepec, Tulahuen and Y) were maintained as described (17) and used for *in vitro* studies.

Preparation of recombinant trypomastigote antigen (rTc24)

A *T. cruzi* trypomastigote cDNA insert encoding a 24 kDa protein (24) was subcloned, and purified in a pGEX-2T plasmid (Pharmacia P-L-Biochemicals Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA) which is known to be a high expression vector. The pGEX-2T vector directs the synthesis of foreign polypeptides in *Escherichia coli* as fusion peptide with the 26 kDa *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase (Sj26). The DNA insert encoding Tc24 was ligated in the corresponding cloning site of the plasmid, and the products were allowed to express in *E. coli*. Positive clones were selected and the purification of the fusion protein was carried out using glutathione agarose beads as described (22). The purity of the recombinant protein was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The protein content was determined using the Folin procedure (11) and samples were aliquoted and stored at -20°C until used.

Immunization and experimental infection

Five weeks old, male BALB/c mice were inoculated three times intraperitoneally (i.p.) at ten days intervals with 20 µg of either rTc24 or Sj26 alone in association with 30 µl of BpAl as adjuvant (VAXICOQ, Institut Mérieux, Lyon France: 4 IU of *Bordetella pertussis* and 1.25 mg of aluminum hydroxide/300 µl). Control groups corresponded to untreated mice and mice immunized with Sj26 mixed with BpAl. Two weeks after the last immunization, mice were

challenged i.p. with 3.5×10^3 bloodstream derived trypomastigotes. Mortality was recorded till 120 days post infection in three independent experiments.

An additional group of BALB/c mice was immunized with rTc24 as described above and used to perform a cellular response studies. In order to examine the cellular response during the acute, intermediate and, chronic phase of *T. cruzi* infection, another group of mice was infected i.p. with 100 trypomastigotes, this allowed mice to survive till chronic phase of experimental Chagas' disease.

Immunoblotting analysis of Tc24 immune sera against different *T. cruzi* strains

This was performed following procedures previously described (30). Briefly, 13% SDS-PAGE was carried out using total epimastigote extracts from different parasite strains (see above). Fractionated parasite proteins were transferred to nitrocellulose sheets. Strips were then saturated with 5% milk and incubated with mouse immune sera to rTc24. After washing, strips were incubated with peroxidase-conjugated antibody to mouse IgG (H+L) (Diagnostic Pasteur, Marnes la Coquette, France). The reaction was revealed with freshly prepared 0.06% (w/v) 4-chloro-1-naphtol (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) and 0.01% hydrogen peroxide in PBS pH 7.2.

Cell proliferative assays

Mice previously immunized with Tc24, were killed by cervical dislocation, spleen was removed and total spleen cells suspensions were prepared in RPMI medium supplemented with 10% foetal calf serum, 2 mM glutamine, 0.07 mM 2-mercaptoethanol, 2mM sodium pyruvate and 100 units/ml gentamicin. Splenic T cells were purified as described (10). 3×10^5 total splenic cells or T cells were added in 96 well flat bottom plates in a final volume of 200 ul of fresh medium. In the case of T cell cultures, accessory cells corresponding to 7.5% of the total number of T cells/well were added. The cell cultures were stimulated with either 10 μ g of rTc24 or Sj26, ovalbumin (OVA) was used as irrelevant protein, and Con A mitogen (1 μ g/ml final) was used as positive control of proliferation. Cell cultures with or without stimuli were

incubated during three days at 37°C, under humidified atmosphere of 5% CO₂. Then, ³H Thymidine (0.5 µCi per well) was added, after additional 16 hours incubation, the cells were harvested onto filters using a multiple automated cell harvester. ³H Thymidine incorporation was quantified by liquid scintillation counting. Each experiment was done in triplicate and the stimulatory index was calculated by dividing the arithmetic mean of cpm from stimulated cultures by the arithmetic mean of cpm from control cultures.

Similar experiments were carried out using cells from *T. cruzi* infected mice as well as from those immune mice which survive the challenge.

Interleukins quantification

IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and, INF-gamma were tested in supernatants from 24 hours cell cultures of splenic cells derived from rTc24-immune mice and from rTc24-immune mice which survive *T. cruzi* challenge and stimulated with either rTc24, Sj26, OVA, ConA or without antigenic stimulation. For IL-2 and INF-gamma a commercially available kit (GENZYME, Cambridge, MA 02139 USA) was used. For IL-4, IL-5 and IL-10 the corresponding monoclonal antibodies were purchased (PharMingen, San Diego, CA 92121, USA) and an ELISA capture assay was developed. The optimal conditions for each interleukin was determined by checkerboard titration. Briefly, 100 µl of rat mAb to mouse interleukins: IL-5 (1 µg/ml), IL-4 (0.5 µg/ml), or IL-10 (2 µg/ml) in carbonate/bicarbonate buffer pH 9.6 were coated in ELISA Maxisorp plates (Nunc, Denmark) overnight at 4°C. Then, wells were washed twice with PBS-0.05% Tween 20 pH 7.4 and blocked with 200 µl/well of PBS-10% foetal calf serum for two hours at room temperature. After three washing steps, 100 µl/well of cell culture supernatants were added in duplicate and incubated overnight at 4°C. Further washing steps were carried out and 100 µl of biotinylated mAbs to IL-5, IL-4, or IL-10 diluted 1:100 in PBS-0.05% Tween-20 were added and incubated for 1 hour at 37°C. Then, wells were washed 5

times and 100 µl of streptavidin-biotinylated-peroxidase diluted 1:2000 in PBS-0.05% Tween-20 were added into each well and allowed to react for 30 minutes at room temperature. Finally, additional washing steps were done and reactions were revealed using OPD (Sigma, Chemical Co. St. Louis. MO. USA) as substrate during 20 minutes at room temperature, 1N HCl was used to stop the reactions. Absorbance was determined in each well at 492 nm using an ELISA reader and the concentration, expressed in picograms/ml, of each interleukin was determined using a linear regression curve of the OD values corresponding to previously calibrated recombinant interleukin standards.

RESULTS AND DISCUSSION

pBluescript Tc24 clone was subcloned into *Sma* I site of pGEX-2T vector. The Sj26-Tc24 (rTc24) fusion protein was produced and purified on glutathione-agarose beads. As shown in Figure 1 (panel A), after Coomassie blue staining of SDS-PAGE containing purified material, the apparent molecular weight of Tc24 fusion protein is around 54 kDa.

The Tc24 antigen appears to be highly conserved. Indeed, mice immune sera raised against rTc24 revealed a 24 kDa polypeptide when reacted in Western blot against total epimastigote extract from different *T. cruzi* strains (e.g. Tulahuen, Tehuantepec, CL, ECH, C23* and Y; Figure 1, panel B). On the contrary, no reactivity against *T. cruzi* antigens was observed when using anti-Sj26 immune serum (Data not shown).

The capacity of rTc24 to induce protection in BALB/c mice was tested using *Bordetella pertussis* and Aluminium hydroxide (BpAl) as adjuvants. The results obtained showed that 12 out of 19 (63%) and 9 out of 12 (75%) mice immunized with the fusion peptide, in a first and second experiment, respectively, survived the acute phase of *T. cruzi* infection. The results of a third experiment shown in Figure 2 clearly indicated that rTc24 was able to induce a significant level of protection against lethal acute *T. cruzi* infection. Indeed, 7 out of 13 (53.8%) mice immunized with rTc24 survived *T. cruzi* challenge whereas only 1 out of 13 (7.6%) non immunized mice survived challenge infection ($p < 0.0001$, χ^2 84.07). None of mice immunized with the Sj26 protein alone survived longer than 30 days post infection.

Complementary experiments were done to test the ability of rTc24 to stimulate the proliferation of T cells from rTc24-immune mice as well as rTc24 immunized mice challenged with *T. cruzi*. As shown in Figure 3-A, total spleen cells and splenic T cells from mice immunized with rTc24 plus BpAl exhibited significant proliferative response to rTc24 *in vitro* challenge. As expected, Sj26 did induce the proliferation of immune cells at lower levels than those obtained with rTc24. In contrast, no significant secondary *in vitro* response was observed

with an unrelated protein such as OVA. On the other side, total spleen cells and T cells from rTc24 vaccinated mice that survive the infection showed a significant degree of proliferation once they were stimulated with rTc24 (Figure 3-B). Interestingly, during experimental *T. cruzi* infection rTc24 induces proliferation of splenic cells from *T. cruzi* infected mice in a time-dependent manner. Thus, as shown in figure 3, panel C, only during the early chronic phase (77 days post infection) proliferation starts to become evident and is reinforced in the chronic phase (90 days after infection), however, proliferation was not seen neither during acute nor along intermediate phase.

Having found that rTc24 was able to induce immune protection in BALB/c mice, it was of interest to determine the interleukin profile of rTc24-immune mice upon stimulation with the antigen as well as from those immune mice which survived the *T. cruzi* challenge. As shown in Figure 4, A and B, spleen cells from rTc24- immunized mice secrete significant quantities of IL-2 and IFN- γ as detected in cell culture supernatants of rTc24 immune cells after *in vitro* stimulation with rTc24. Moreover, higher levels of both cytokines were observed in supernatants of cells from rTc24 protected mice, 90 days after infection. Control tests showed that cells did produce IL-2 and IFN-gamma in response to Sj26 stimulation but to a lower extent than the observed with rTc24, particularly in the case of IFN γ . Furthermore, no interleukins were detected in culture supernatants from either rTc24-immune or protected mice stimulated with OVA.

In contrast, no detectable amounts of IL-4, IL-5 and IL-10 were found in supernatants from rTc24 immune cells nor from protected cells even after 24, 48 and, 72 hours of stimulation with the different antigens (data not shown).

Although, several *T. cruzi* antigens including irradiated or inactivated parasites and fractionated parasite materials were described for their protective role against *T. cruzi* infection in different experimental models our knowledge on the immunological responses elicited by the protective antigens is limited (3, 4, 8, 21, 24, 25, 33).

In previous studies we had been shown that a synthetic peptide derived from the primary sequence of a 24 kDa protein, present among parasite excretory-secretory antigens, contains a T cell epitope with protective activity (24). In the present study we evaluated the immunoprotective value of the 24 kDa antigen expressed as a fusion protein, namely rTc24, in the pGEX-2T

vector. The results of this study clearly demonstrate that, Tc24 which is expressed by all *T. cruzi* strains tested so far (CL, ECH, C23, Tehuantepec, Tulahuen and Y), protects BALB/c mice against lethal *T. cruzi* challenge. Furthermore, significant levels of IFN- γ and IL-2 could be detected in the culture supernatants following *in vitro* stimulation of T cells from rTc24-immune mice as well as from rTc24-immunized and challenged with a lethal *T. cruzi* dose. In contrast, no detectable amounts of IL-4, IL-5 or IL-10 could be evidenced in the culture supernatants of rTc24-stimulated cells. Moreover, analysis of spleen cells proliferation induced by Tc24 protein during *T. cruzi* infection in naive BALB/c mice showed that rTc24 could stimulate the proliferation of cells from infected mice only during the chronic phase of the disease. Interestingly, no proliferation was obtained when Tc24 was tested against normal spleen cells from BALB/c mice and normal human PBMC as well (data not shown), indicating that rTc24 could not induce a mouse polyclonal lymphocyte activation as was already reported for some *T. cruzi* components. Indeed, it was recently reported that *T. cruzi* lysate as well as some parasite recombinant proteins (a ribosomal phosphoprotein "PO", and an immunodominant repeat antigen termed TcD) could induce a significant *in vitro* proliferation of normal human PBMC (18, 31). It is likely that, this polyclonal proliferative response could be related *in vivo* to pathology rather than to immunity.

In previous reports, it has been shown that resistance against *T. cruzi* infection is related to T cell immune response against the parasite and depends on viable population of L3T4 $^{+}$ (CD4 $^{+}$) T lymphocytes (1, 20). In addition, CD8 $^{+}$ MHC-restricted cytotoxic T cells capable to lyse parasite-infected cells were isolated from *T. cruzi* infected mice (15), which support the notion that CD8 $^{+}$ T cells play a key role in the control of *T. cruzi* infection (28). Therefore, T cells may contribute not only as helpers in the anti-parasite antibody response but in the immunity to *T. cruzi* by producing macrophage activating lymphokines or as potential cytotoxic cells for *T. cruzi* infected host cells. Moreover, in experimental *T. cruzi* infection, it was shown that *in vivo* administration of IL-2, IFN γ , or IFN γ inducers to *T. cruzi* infected mice resulted in reduced parasitemia as well as increased levels of protection against lethal infection (6, 9, 19). Furthermore, some *T. cruzi* specific T cell clones producing Th1-cell associated cytokines could induce protection against infection when transferred to naive mice (14, 16). In contrast, Th2-cell

derived cytokines such as IL-10 are known to inhibit IFN γ -mediated microbicidal activity of macrophages against *T. cruzi* (7). Therefore, it appears that the enhancement of T cell subsets producing Th1-derived cytokines could lead to higher levels of protective immunity against *T. cruzi* infection.

Our results are in agreement with the observation that Th1-like cell type may play an important role in resistance against *T. cruzi* infection. Indeed, the data clearly indicated that spleen cells derived from rTc24-immune mice and protected animals produced significant amounts of IL-2 and IFN γ when stimulated *in vitro* with rTc24 protein. Moreover, no IL-4, IL-5 and IL-10 could be evidenced in the supernatants of these cells upon stimulation with rTc24.

To our knowledge, this is the first report indicating that immunization of mice with *T. cruzi* recombinant protein can induce Th1-like interleukin profile and could protect animals against lethal *T. cruzi* challenge. A detailed study of the T cell subpopulation induced and the effector mechanism(s) involved in this protection are under investigation in our laboratory.

AKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by WHO-TDR Special Programme for Tropical Diseases (contract No. T80/181/1 ID: 920396). A.G.E. was granted by WHO-TDR programme.

REFERENCES

1. Araujo, F. G. 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. *Infect. Immun.* **57**: 2246 - 2248.
2. Araujo, F. G. and B. Morein. 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into Iscoms protects against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* **59** (9): 2909 - 2914.
3. Basombrio, M. A. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. *Exp. Parasitol.* **71**: 7 - 8.
4. Basombrio, M. A., M. A. Segura, M. C. Mora and L. Gomez. 1993. Field trial of vaccination against american trypanosomiasis (Chagas' disease) in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49** (1): 143 - 151.
5. Brener, Z. 1986. Why vaccines do not work in Chagas disease?. *Parasitol. Today.* **2**(7): 196 - 197.
6. Choromanski, L. and R. E. H. Kuhn. 1985. Interleukin 2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas'disease. *Infect. Immun.* **50**: 354 357.
7. Gazzinelli, R. T. , I. P. Oswald, S. Hieny, S. L. James and A. Sher. 1992. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves and L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitible by interleukin-10 and transforming growth factor-B. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2501 - 2506.
8. Harth, G. , A. A. Mills, T. Lin, and F. G. Araujo. 1994. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of

Mr 56000: characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. Mol. Microbiol. **11**(2): 261 - 271.

9. James, S. L. , T. L. Kipnis, A. Sher, and R. Hoff. 1982. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. Infect. Immun. **35**: 588 - 593.
10. Julius, M. H. , E. Simpsom, and L. A. Herzenberg. 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol. **3**: 645 - 649.
11. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and J. R. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **93**: 265 - 275.
12. Mota, I. and L.F. Umekita. 1989. The effect of C3 depletion on the clearance of *Trypanosoma cruzi* induced by IgG antibodies. Immunol. Letters. **21**: 223 - 226.
13. Minoprio, P., M. Cury El Cheikh, E. Murphy, M. Hontebeyrie-Joscowicz, R. Coffman, A. coutinho, and A. O'Garra. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. J. Immunol. **151**: 4200 - 4208.
14. Nickell, S. P., A. Gebremichael, R. Hoff, and M. H. Boyer. 1987. Isolation and fucntional characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. **138**: 914 - 921.
15. Nickell, S. P. , G. A. Stryker, and C. Arevalo. 1993. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic -cells that lyse parasite-infected target cells. J. Immunol. **150**: 1446 - 1457.
16. Nickell, S. P., M. Keane, and M. So. 1993. Further characterization of protective *Trypanosoma cruzi* specific CD4⁺ T-cell clones: T helper type 1-like phenotype and reactivity with shed trypomastigote antigens. Infect. Immun. **61**: 3250 - 3258.

17. Ouaissi, A. J. F. Dubremetz, J. P. Kusnierz, J. Cornette, M. Loyens, A. Taibi. B. Marty, P. Velge, F. Rizvi, and A. Capron. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Differential expression and distribution of an 85-kDa polypeptide epitope by *in vitro* developmental stages. *Exp. Parasitol.* **71**: 207 - 217.
18. Piuvezam, M. R., D. M. Russo, J. M. Burns Jr., Y. A. W. Skeiky, K. H. Grabstein and S. G. Reed. 1993. Characterization of responses of Normal Human T Cells to *Trypanosoma cruzi* Antigens. *J. Immunol.* **150(3)**: 916 - 924.
19. Reed, S. G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* **140(12)**: 4342 - 4347.
20. Rodriguez, A. M., D. Afchain, F. Santoro, H. Bazin, and A. Capron. 1983. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. *Parasitenkd.* **69(2)**: 141 - 147.
21. Scott, M. T., and D. Snary. 1979. Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature.* **282**: 73 - 74.
22. Smith, D. B. and K. Johnson. 1988. Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathione-S-transferase. *Gene.* **67**: 31 - 40.
23. Snary, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 126 - 129.
24. Taibi, A., B. Plumas-Marty, A. Guevara Espinoza, R. Schöneck, H. Pessoa, M. Loyens, R. Piras, T. Aguirre, H. Gras-Masse, M. Bossus, A. Tartar, A. Capron and A. Ouaissi. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Immunity-induced in Mice and Rats by Trypomastigote Excretory-secretory Antigens and Identification of a Peptide Sequence Containing a T Cell Epitope with Protective Activity. *J. Immunol.* **151**: 2676-2689.

25. Takle, G. B. and D. Snary. 1993. South American trypanosomiasis (Chagas' disease) pp. 213-216. In: Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections. Edited by K. S. Warren.
26. 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 - 146.
27. Tambourgi, D. V., T. L. Kipnis, and W. Dias da Silva. 1989. *Trypanosoma cruzi*: Antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp. Parasitol.* **68**: 192 - 201.
28. Tarleton, R. L., B. H. Koller, A. Latour and M. Postan. 1992. Susceptibility of B2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*. **356**: 338 - 340.
29. Torrico, F., H. Heremans, M. T. Rivera, E. Van Marck, A. Billiau, and Y. Carlier. 1991. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* **146**: 3626 - 3632.
30. Towbin, H., J. Staehelin and, J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 4350 - 4354.
31. Van Voorhis, W. 1992. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. *J. Immunol.* **148(1)**: 239 - 248.
32. WHO. 1993. Progress: 1991-92. Eleventh Report Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. *Tropical Disease Research*. 67 - 75.
33. Wrightsman, R.A., M.J. Miller, J.L. Saborio, and J.E. Manning. 1995. Pure paraflagellar

rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. **63**(1): 122-125.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Panel A, 13% SDS-PAGE showing the recombinant *T.cruzi* protein (Tc24) after purification on glutathione-agarose beads and Coomassie blue staining. Panel B, reactivity of mice antibodies to Tc24 fusion protein in Western blot assays against crude lysates from different *T.cruzi* strains: Tulahuen (lane 1), Tehuantepec (lane 2), CL (lane 3), ECH (lane 4), C23 (lane 5) and, Y (lane 6). In all the antigen preparations a 24 kDa band is recognized.

Figure 2.- One representative experiment of three independent assays to test the potential protective value of Tc24 fusion protein in experimental *T.cruzi* infection is shown. 53.8% of mice immunized with Tc24 survived after lethal *T.cruzi* challenge, none of the mice immunized with Sj26 alone survived the infection and only one of the non-immune mice survived.

Figure 3.- Cell proliferation studies using: A) Total splenic and nylon wool purified T cells from mice immunized with Tc24 fusion protein and stimulated with the fusion protein itself, Sj26 and ovalbumin. Concanavalin A was used as mitogen. B) Cells from Tc24 vaccinated mice that survived *T.cruzi* lethal challenge. C) Cells from naive *T.cruzi* infected mice stimulated with different antigens including Tc24 fusion protein.

Figure 4.- A) IL-2 determination in supernatants from cell cultures of Tc24 immune mice and from those mice that survived challenge infection, cells were stimulated with different antigens including Tc24. B) IFN-gamma detection in culture supernatants of Tc24 immune mice and from those that survived *T.cruzi* infection.

Figure 1

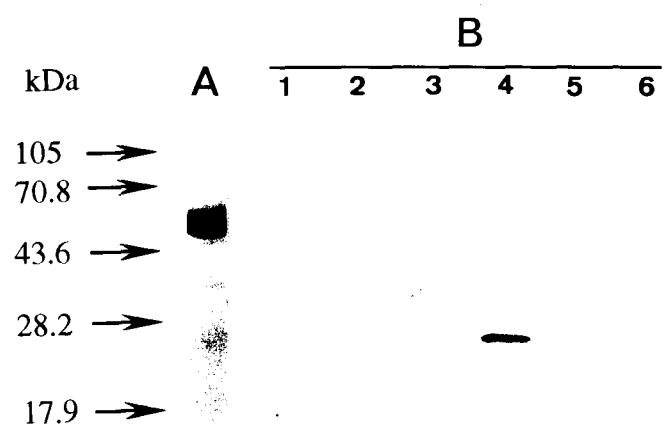


Figure 2

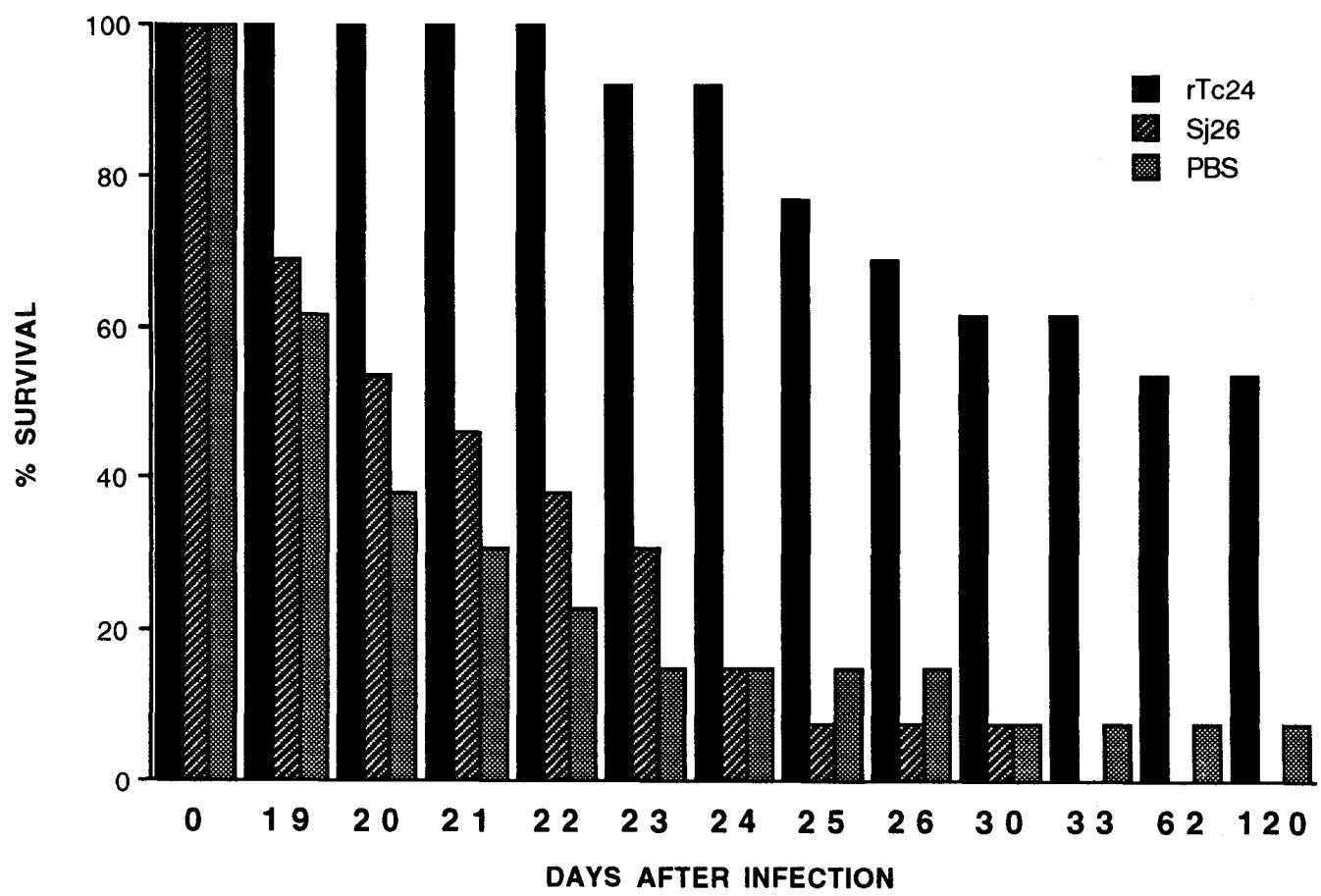


Figure 3

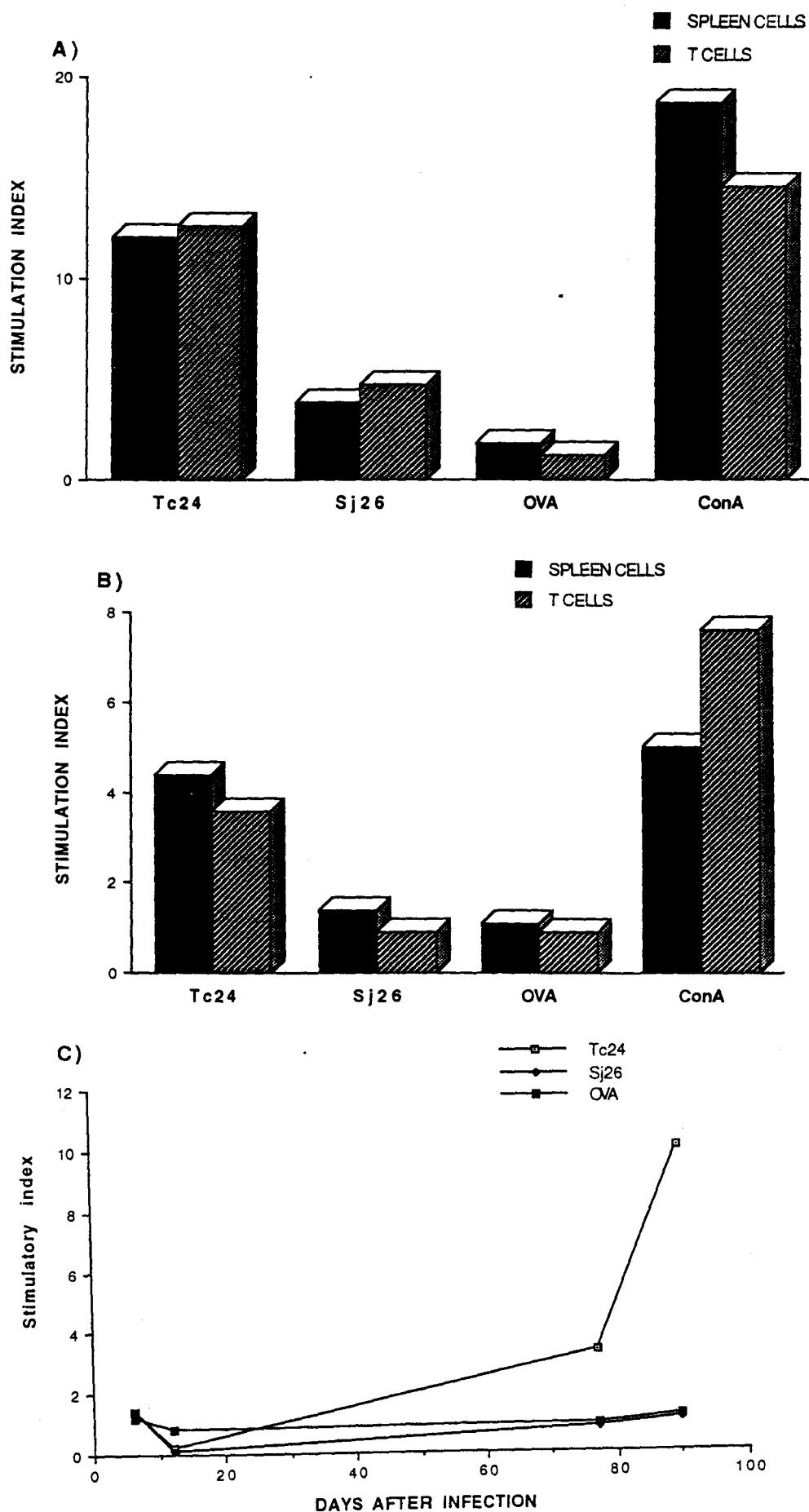
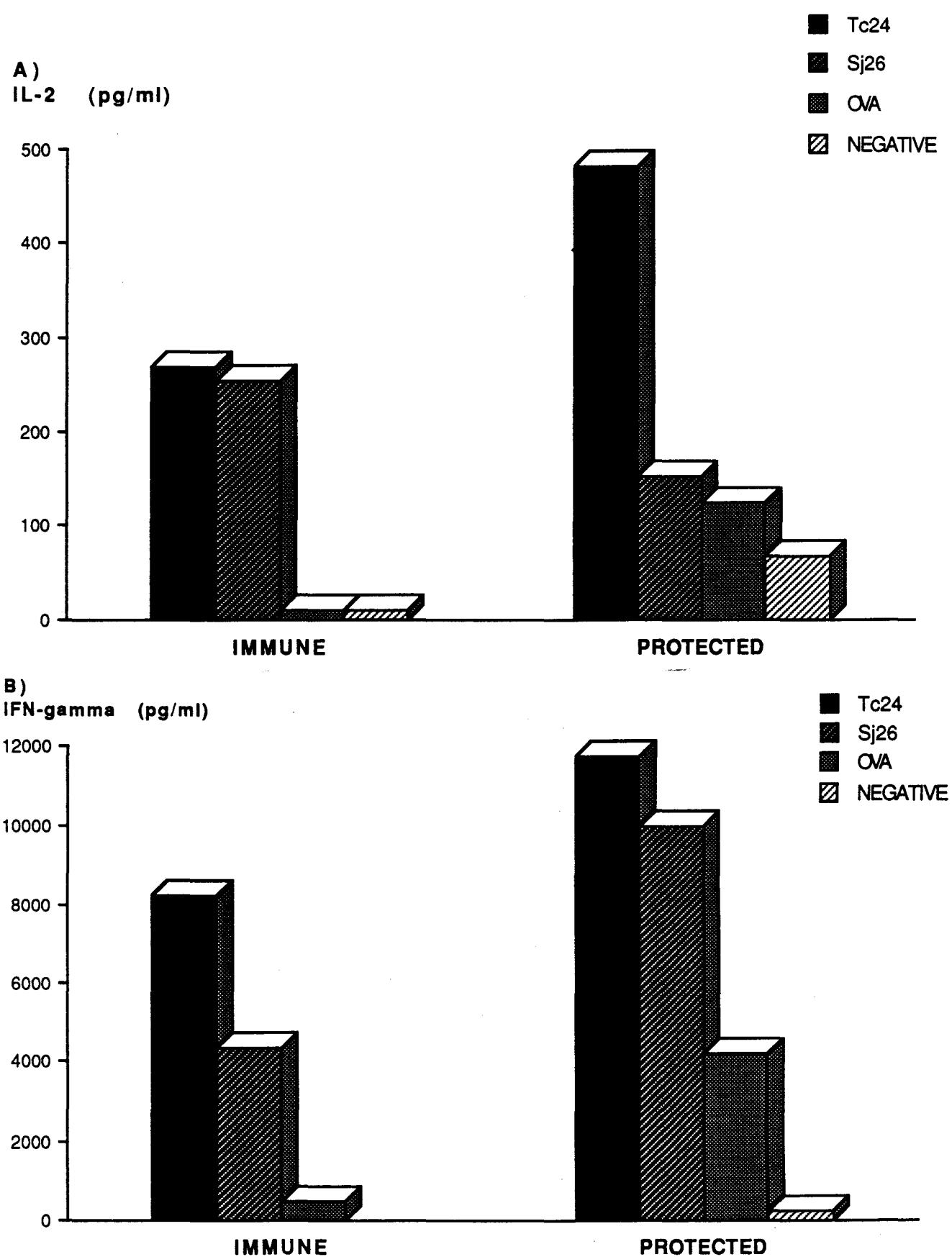


Figure 4



VIII. 2. RESULTATS NON PUBLIES

VIII. 2. 1. ENQUETE SERO-EPIDEMOLOGIQUE DE LA MALADIE DE CHAGAS DANS UNE REGION ENDEMIQUE EN EQUATEUR.

Dans le but d'évaluer l'efficacité de la protéine recombinante rTc24 de *T.cruzi* pour le diagnostic sérologique de la maladie de Chagas, une enquête séro-épidémiologique a été effectuée entre le 8 septembre et le 28 décembre 1994 dans la province (département) de El Oro, située à 600 km à l'ouest de la capitale de l'Equateur (Figure 1). Cette province est considérée comme une région endémique de la maladie de Chagas. L'échantillonnage a été effectué d'une façon aléatoire dans trois villages où des cas d'infections par *T.cruzi* ont été montrés. Au total, 643 prélèvements de sang de 2 à 5 ml sans anticoagulant ont été obtenus par ponction veineuse. Les prélèvements ont été réalisés dans les trois villages suivants: Pinas ($n = 67$), Marcabeli ($n = 204$) et Balsas ($n = 372$). Une heure après le prélèvement la sang a été centrifugé pendant 10 min (3000 t.p.m. à 4°C et le serum congelé dans l'azote liquide jusqu'à son analyse au laboratoire de recherche clinique à l'Hôpital Vozandes de Quito (service du Dr. R. Guderian). Les sérums ont été testés par la technique d'ELISA vis-à-vis d'un extrait parasitaire total obtenu à partir d'épimastigotes de *T.cruzi*. Par la suite, la plupart des sérums positifs vis-à-vis le antigène total ont été testés par la technique ELISA décrite dans l'article 1 en utilisant la protéine recombinante rTc24 comme antigène. Dans les deux tests ELISA les critères de séropositivité, "seuil de positivité", ont été établis sur la base de l'analyse des sérums de patients négatifs provenant de régions endémiques et non-endémiques de l'Equateur. Sur les 643 sujets étudiés, 63 soit 9,4% ont été retrouvés positifs vis-à-vis de l'antigène total. Sur un échantillon de 63 positifs, 4 soit 5,9% correspondent aux patients du village de Pinas, 15 soit 7,3% au Marcabeli, et 44 soit 11,8% au Balsas (tableau I).

De même, sur les 63 sérums positifs, nous avons choisi 55 pour le test ELISA avec la rTc24 comme antigène. Sur les 55 sérums, positifs vis-à-vis de l'antigène total, 50 soit 90,9% reconnaissent l'antigène recombinant. Par ailleurs, les valeurs correspondant à la moyenne de 55 résultats positifs avec l'antigène recombinant (DO: 0,808 +- 0,370) est plus élevée que les valeurs obtenues avec l'antigène total (DO: 0,538 +- 0,086) (figure 2).

Cette étude montre que le développement des techniques sérologiques, sensibles et spécifiques, comme c'est le cas pour le test ELISA-rTc24 que nous avons développé, pourrait être très utile notamment dans la surveillance épidémiologique de la maladie de Chagas en particulier en Equateur.

Figure 1.

Carte de la province d'El Oro, en Equateur, montrant les régions où l'enquête séro-épidémiologique de la maladie de Chagas a été effectuée. Les régions de Marcabeli, Balsas et Pinas sont indiquées avec un cercle.

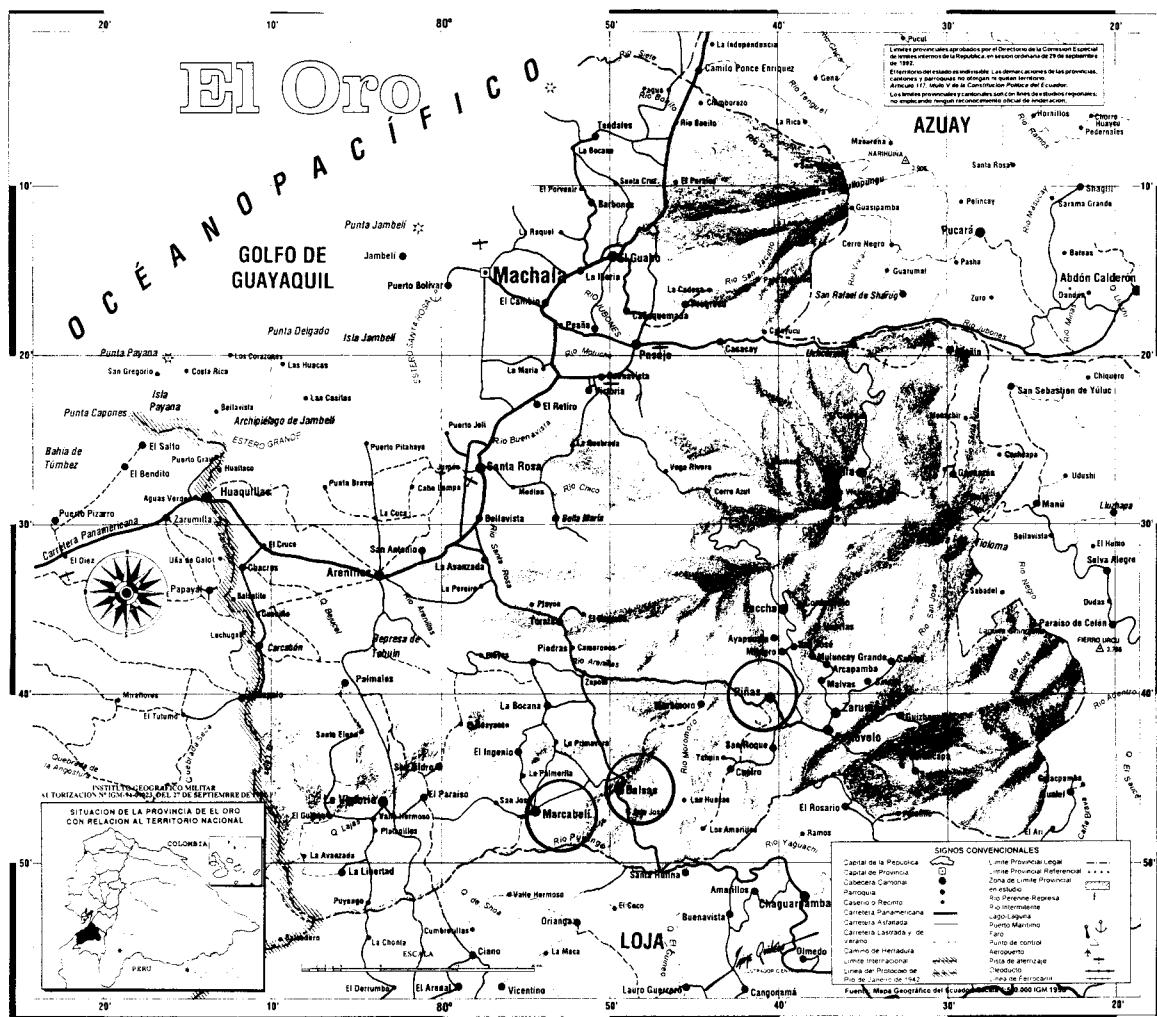


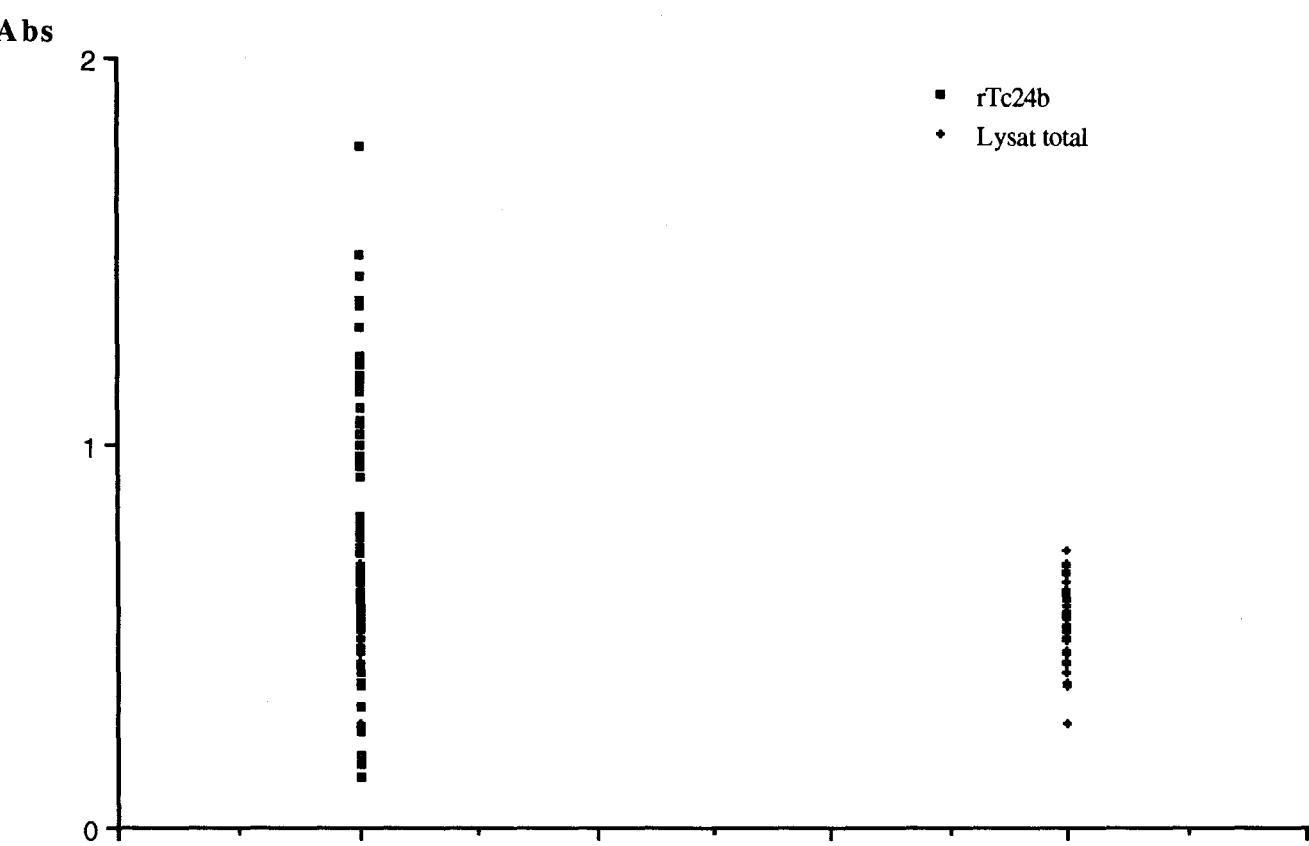
Tableau 1.

Enquête séro-épidémiologique de la maladie de Chagas dans la province d'El Oro, Equateur, en utilisant un test ELISA avec un lysat total des épimastigotes de *Trypanosoma cruzi* comme antigène.

Nombre des individus testés		Positifs	%
TOTAL	(n = 643)	63	9,4
PINAS	(n = 67)	4	5,9
MARCABELI	(n = 204)	15	7,3
BALSAS	(n = 372)	44	11,8

Figure 2.

Sérum de patients chagasiques Equatoriens ($n = 55$) testés par ELISA avec la rTc24 comme antigène..



VIII. 2. 2. RECONNAISSANCE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DE 24 kDa PAR LES SERUMS CHAGASIQUES DE PATIENTS COLOMBIENS, BRESILIENS ET BOLIVIENS.

Le parasite *T.cruzi* présente un polymorphisme au niveau des souches, ce qui peut être une désavantage pour le diagnostic sérologique d'une infection. Afin de valider l'intérêt de notre rTc24 pour le diagnostic de la maladie de Chagas nous avons analysé des sérum chagasiques provenant de différents pays où la maladie de Chagas est endémique. Ainsi, le Dr. Santiago NICHOLLS de l'Institute National de la Santé à Bogota (Colombie) nous a envoyé 20 sérum de patients colombiens chagasiques pour lesquels le diagnostic a été établi par l'épreuve d'immunofluorescence indirecte (IFI). Nous avons testé les sérum vis-à-vis la protéine recombinante Tc24 (rTc24) mais aussi vis-à-vis de l'antigène total pour établir une comparaison. Sur les 20 sérum positifs en IFI, 19 ont été positifs dans les deux tests ELISA utilisés. Cependant, les valeurs de DO obtenus avec la rTc24 ont été beaucoup plus élevées que ceux observés avec l'antigène total (tableau I).

De même, le Pr. Antoniana KRETLI du l'Centre de Recherches Rene Rachou, FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brésil), dans le cadre d'une collaboration, nous a envoyé 85 échantillons (codés) de sérum provenant de sujets brésiliens. Tous les sérum ont été testés en ELISA avec la rTc24 comme antigène. Une fois que le code de chaque échantillon a été révélé, [il existait 23 sérum correspondant à des sujets normaux d'une région non-endémique (Belo Horizonte), 12, à des individus normaux d'une région endémique (Bambui), et 50 à des patients chagasiques non traités], les résultats ont montré que sur les 50 sérum chagasiques 49 soit 98% (moyenne de DO: 1,046 +- 0,430) reconnaissent l'antigène recombinant. Par contre, aucun sérum de sujets normaux endémiques (moyenne DO: 0,283 +- 0,081) ou non endémiques (moyenne: 0,175 +- 0,053) ne présentent de réactivité vis-à-vis de la rTc24 (figure 1).

Compte tenu du fait que notre étude n'a porté que sur des sérum de patients chagasiques en phase chronique, la question sur l'efficacité de la rTc24 pour le diagnostic de l'infection aiguë reste ouverte. Pour répondre à cette question nous avons obtenu du Dr. Frédérique BRENNIERE à l'Institut Bolivien de Biologie d'Altitude à La Paz (Bolivie) 16 échantillons de sérum d'enfants Boliviens chagasiques en la phase aiguë de l'infection. Le diagnostic a été établi après la mise en évidence de trypanosomes dans leur sang périphérique. Sur les 16 échantillons analysés, 15 soit 94 % sont positifs en ELISA vis-à-vis de la rTc24 (moyenne DO: 0,945 +- 0,497) ce qui confirme les résultats obtenus par l'examen parasitologique (tableau II).

Tableau 1.

Sérum de patients chagasiques Colombiens dans la phase chronique de la maladie.

<u>SERUM No.</u>	<u>IF TITRE</u>	<u>ELISA antigène total</u>	<u>ELISA rTc24</u>
1	1: 64	0,270	1,153
2	1: 64	0,301	1,494
3	1: 64	0,294	0,533
4	1: 32	0,341	1,370
5	1: 128	0,494	1,531
6	1: 64	0,189	1,237
7	1: 32	0,352	1,165
8	1: 64	0,330	1,019
9	1: 256	0,203	0,803
10	1: 64	0,261	1,440
11	1: 64	0,481	1,608
12	1: 128	0,273	1,026
13	1: 256	0,331	1,978
14	1: 64	0,066	0,031
15	1: 32	0,197	0,768
16	1: 32	0,195	0,702
17	1: 64	0,247	1,096
18	1: 64	0,247	1,342
19	1: 64	0,320	0,838
20	1: 64	0,180	0,272

"seuil de positivité"

moyen + 2DS: 0,174

moyen + 3DS: 0,267

Figure 1.

Sérum des patients Brésiliennes testés par ELISA avec la rTc24 comme antigène.

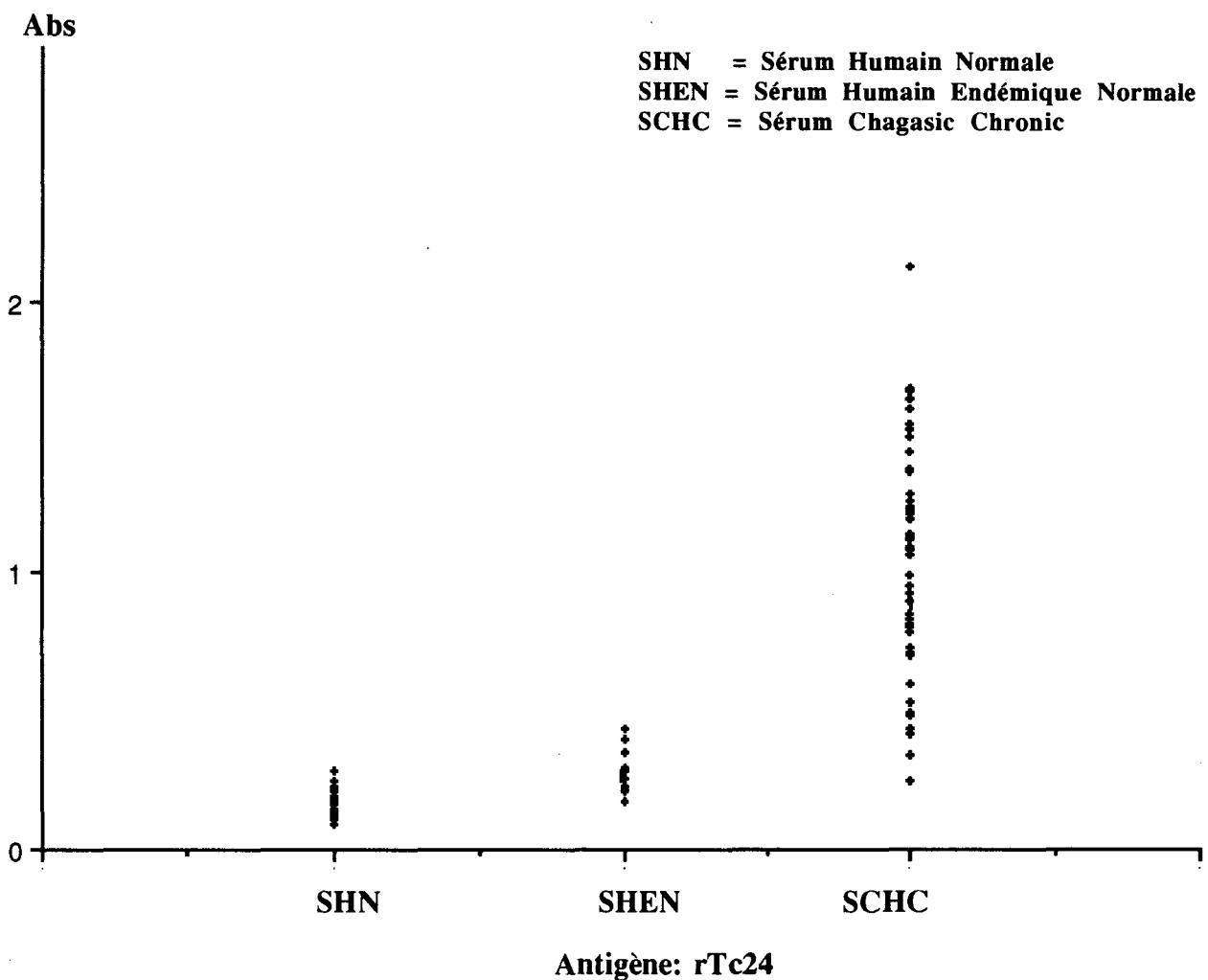


Tableau 2.

Sérum des enfants boliviens prélevés pendant la phase aiguë de la Maladie de Chagas.

ECHANTILLON	"Buffy coat"*	ELISA rTc24
1	+	1,987
2	+	1,419
3	+	0,673
4	+	0,605
5	+	0,425
6	+	0,288
7	+	0,436
8	+	0,942
9	+	0,971
10	+	1,033
11	+	2,016
12	+	0,343
13	+	0,684
14	+	0,697
15	+	0,855
16	+	1,101

IX. DISCUSSION

La maladie de Chagas provoquée par le parasite *Trypanosoma cruzi* reste encore un problème majeur de santé dans les pays d'endémie et hors zones d'endémie. Le moyen qui est considéré comme la plus efficace contre cette maladie est la lutte antivectorielle. Malheureusement, elle n'est pas appliquée de façon régulière. De plus, des problèmes fondamentaux tels que le diagnostic sérologique connaissent certaines difficultés comme un manque de spécificité qui s'explique par l'existence dans la même zone d'endémie, d'infections parasitaires dues à d'autres agents pathogènes qui partagent certaines déterminantes antigéniques avec *T.cruzi*. Un manque de sensibilité et des réactions faussement négatives observées dans certains cas ont été également observés. Un autre problème se pose au niveau de l'évaluation de la guérison après traitement spécifique. En effet, le nombre de tests proposés est très limité et leur réalisation est fastidieuse et difficile. La vaccination est une autre alternative qui a été suggérée pour le contrôle de la maladie. Cependant, étant donné la complexité du parasite, une molécule à potentiel vaccinal doit conférer une protection vis-à-vis de l'infection mais ne doit pas induire de phénomènes autoimmuns. Il s'agit donc d'identifier des composants parasitaires à potentialités vaccinantes et/ou diagnostiques afin d'améliorer les techniques de détection et pouvoir envisager une stratégie vaccinale. Ce travail a pour but de contribuer à la recherche de molécules parasitaires utiles pour le développement de techniques de diagnostic de la maladie de Chagas. Le deuxième volet de ce travail concerne l'étude du pouvoir immunoprotectrice de ces molécules vis-à-vis de l'infection chagásique expérimentale.

En ce qui concerne le diagnostique, il est vrai que les techniques de diagnostic parasitologique (observation directe au microscope, xénodiagnostic, hemoculture, etc..) possèdent une sensibilité non négligeable. Cependant, elles ne sont pas très rapides et demandent parfois des niveaux de parasitémie élevés pour être sensibles. Dans le présent travail, nous avons porté notre intérêt sur l'étude d'une protéine de poids moléculaire 24 kDa présente parmi les produits d'excrétion-sécrétion des trypomastigotes, formes infectantes du parasite. Le clonage et le séquençage de l'ADN codant pour la protéine de 24 kDa a été réalisé

précédemment (OUAISSI et coll. 1992, TAIBI et coll. 1993). Dans un premier temps, nous avons sous cloné l'ADNc codant pour la protéine de 24 kDa dans un vecteur pGEX-2T. Ce plasmide est capable d'induire une forte production, par *Escherichia coli*, de protéines étrangères en fusion avec la glutathione-S-transferase (GST) de *Schistosoma japonicum*, poids moléculaire 26 kDa. En utilisant la protéine de fusion Sj26-Tc24 (rTc24) nous avons développé un test ELISA qui nous à permis de mettre en évidence dans les sérum de souris infectées des anticorps dirigés vis-à-vis de l'antigène recombinant rTc24 à partir de 17 jours après infection. La reconnaissance de cet antigène augmente fortement lorsque nous avons testé des sérum de souris chagasiques chroniques. De plus, en utilisant des sérum provenant de patients chagasiques Argentins, 89% de ces sérum montrent une forte réactivité vis-à-vis de la rTc24 en ELISA. De même, 95% des patients chagasiques Colombiens, 90,9% des patients chagasiques Equatoriennes, 94% des enfants chagasiques Boliviens, et 98% des sérum chagasiques Bresiliens ont un taux élevé d'anticorps IgG anti-rTc24. De plus, des séums chagasiques ont été testé par Western blot et la plupart de ces séums reconnaissent la protéine de 24 kDa. Les études de spécificité antigénique ont montré qu'aucun sérum provenant de patients ou de souris infectées par *Leishmania braziliensis braziliensis*, *L. guayanensis*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* ou *Equinoccocus granulosus* ne reconnaissent la protéine Tc24 en ELISA ou en Western blot. Le test ELISA que nous avons décrit ci-dessus apporte des évidences sur la possibilité de détection des anticorps spécifiques dans les séums de patients chagasiques. Cependant, une faible réactivité en Western blot vis-à-vis de la rTc24 des séums de souris infectées par *Trypanosoma rangeli* a été testé observé. Cependant, l'analyse par Western blot des séums de souris immunisées avec la rTc24 a révélé que ces séums reconnaissent une protéine de poids moléculaire de 21 kDa (Tr21) dans les extraits de *T. rangeli*. Ces observations indiquent que ces deux composants ne sont pas identiques mais présentent des épitopes communs. La suite de notre travail a consisté à identifier les domaines spécifiques pour *T. cruzi* dans la Tc24. En utilisant des anticorps dirigés vis-à-vis d'un peptide synthétique (20 - 40) présent dans la région N-terminale de la Tc24 (TAIBI et coll. 1993), nous avons pu montrer par la technique d'immunofluorescence indirecte que ces anticorps reconnaissent spécifiquement *T. cruzi* par rapport à *T. rangeli*. Ce qui suggère que la séquence

peptidique 20 - 40 est spécifique de la Tc24 de *T.cruzi*. Ces observations nous ont permis développer des approches moléculaires pour valider la spécificité du peptide 20-40 dans l'identification de *T.cruzi*. Ainsi, nous avons montré par la technique du Northern blot que la sonde d'ADNc codant pour la rTc24 marquée au ^{32}P est capable d'hybridier avec l'ARN de *T.cruzi* aussi bien qu'avec l'ARN de *T.rangeli*. En revanche, la sonde d'ADNc codant pour la région N-terminale de rTc24 hibride seulement avec l'ARN de *T.cruzi*. Par la suite nous avons développé une Réaction de Polymerase en Chaîne (PCR) en utilisant des oligonucléotides correspondant au peptide 20-26 comme amorce. En effet, nous avons utilisé des produits de la transcription inverse (RT) de l'ARN de *T.cruzi* et *T.rangeli* comme matrice pour la PCR. Les résultats obtenus montrent que dans le cas des produits RT (ARNm) de *T.cruzi* une bande de 550 paires de bases(pb) a été amplifié par PCR en utilisant les oligonucléotides correspondant au peptide 20 - 40 et à une région localisé dans le domaine C-terminale de la Tc24. En revanche, dans le cas des produits TR (ARNm) de *T.rangeli* aucune amplification n'a été observé. De même, les produits PCR obtenus avec *T.cruzi* ont été hibridé avec une sonde d'ADNc correspondant à la Tc24 par la technique de Southern blot. La bande de 550 pb a été mise en évidence. Par ailleurs, la technique de PCR utilisant des oligonucléotides correspondant au peptide 20-26 a été utilisé pour amplifier l'ADN de *T.cruzi* et de *T.rangeli*. Les résultats obtenus montrent que seul l'ADN de *T.cruzi* a pu être amplifié. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la PCR basée sur les oligonucléotides 20-26 pourrait être un outil intéressant pour le diagnostic spécifique de la maladie de Chagas dans les régions endémiques où *T.cruzi*, *T.rangeli* et *Leishmania* sont co-endémiques.

Concernant l'évaluation de la guérison de la maladie de Chagas après traitement spécifique, les tests sérologiques conventionnels restent positifs des années après le succès d'un traitement. Par ailleurs, le xénodiagnostic a été utilisé pour mettre en évidence l'efficacité d'un traitement. Cependant, cette méthode est cruelle et assez longue puisque les résultats sont obtenus environ 30 jours après avoir nourri le vecteur chez les hôtes traités. Des contraintes similaires sont rencontrées avec l'utilisation d'hémocultures. Le test de lyse médié par le complément (CoML) aussi bien qu'un test ELISA utilisant comme antigène des produits d'excrétion-

sécrétion (ESA) des formes trypomastigotes ont été utilisé pour évaluer la guérison de patients chagasiques après traitement (GALVAO et coll. 1993, KRAUTZ et coll. 1994). Malheureusement, l'utilisation de parasites vivants (trypomastigotes) dans les deux tests est un facteur limitant. Etant donné que la protéine Tc24 est un des composants de ESA, nous avons étudié la réponse anti-Tc24 dans les sérums de patients chagasiques avant et après traitement spécifique. Dans le cas de deux patients chagasiques Equatoriens que nous avons pu analyser, les résultats du test ELISA ont montré que la réactivité vis-à-vis de Tc24 est diminué d'une façon significative après traitement. De même, dans le cas des patients Brésiliens 80% des sérums provenant de patients guéris après traitement spécifique (examen parasitologique négatif) ne réagissent pas vis-à-vis de Tc24 en ELISA ou en Western blot. Ces résultats suggèrent que la protéine Tc24 est un bon marqueur pour suivre l'efficacité du traitement.

Un autre aspect qui a été abordé dans ce travail est celui du rôle de la protéine Tc24 dans l'infection expérimentale à *Trypanosoma cruzi*. Des expériences d'immunisation de souris BALB/c et des rats Fischers mâles avec les produits d'excrétion-sécrétion des formes infectantes de *T.cruzi* en association avec *Bordetella pertussis* et de l'alum comme adjuvant, ont montré de hauts niveaux de protection vis-à-vis de la mortalité en phase aiguë de l'infection chagrasique (TAIBI et coll. 1993). De la même manière, les expériences d'immunisation réalisées chez la souris en utilisant la protéine rTc24 exprimée dans le vecteur pGEX-2T, ont permis d'obtenir un taux de protection significatif en terme de mortalité en phase aiguë. Par ailleurs, l'analyse du profil des interleukines synthétisées par les lymphocytes provenants d'animaux immunisés par la Tc24 et d'animaux immunisés protégés, montre clairement que la protéine Tc24 induit un profil de type Th1. En effet, les cellules spléniques stimulées in vitro par l'antigène homologue secrètent de l'IL2, l'IFN γ et ne produisent pas d'IL5 ni d'IL10. Il faut noter que dans le cas de *T.cruzi*, beaucoup de travaux ont été réalisés dans le but d'identifier des composants parasitaires ayant des potentialités immunoprotectrices. Cependant, à l'exception d'un travail récent montrant l'immunoprotection par transfert passif de clones T, de type Th1, spécifiques de *T.cruzi*, mais dont la cible parasitaire n'a pas été caractérisée (NICKELL et coll. 1993), notre étude est à notre connaissance, le premier travail

montrant que l'immunisation avec une protéine recombinante de *T.cruzi* induit un profil de type Th1 lié à une protection vis-à-vis de l'infection chagásique expérimentale.

En conclusion, notre travail s'inscrit dans le cadre du développement de moyens de contrôle de la maladie de Chagas. Nous avons montré l'importance de la mise au point de techniques de diagnostic hautement sensibles et spécifiques, ainsi que la recherche de protéines parasitaires pouvant jouer un rôle dans la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de l'infection chagasique.

Les techniques que nous avons développées ELISA basée sur la détection d'anticorps anti-Tc24 ainsi que la PCR basée sur l'amplification de fragment d'ADN de *T.cruzi*, pourraient être utilisées pour le diagnostic spécifique de l'infection aiguë et chronique de la maladie de Chagas. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la détection d'anticorps anti-Tc24 par un test ELISA peut remplacer le test de lyse (qui permet de suivre l'efficacité du traitement). L'intérêt d'un tel test est qu'il peut être utilisé en routine dans n'importe quel laboratoire.

Enfin, notre travail a montré la capacité immunoprotectrice de la protéine rTc24, dans l'infection chagrasique expérimentale. Ce qui constitue la première démonstration qu'une molécule d'origine de *T.cruzi* est capable d'orienter sélectivement la réponse immune vers des sous-populations lymphocytaires de type Th1.

X. PERSPECTIVES:

En utilisant les sondes moléculaires que nous avons caractérisés dans notre travail, nous envisageons de réaliser des études épidémiologiques plus étendues dans les pays où la maladie est endémique, notamment Colombie, en Equateur, et en Venezuela. Parallèlement, l'analyse des populations vectorielles, en terme de capacité de transmission de l'infection, est aussi possible en utilisant les outils moléculaires que nous avons développé. Par ailleurs, l'utilisation de la rTc24 pour suivre l'efficacité du traitement permettra en disposant d'un nombre de patients plus important, de mieux juger de la validité de ce test.

Afin de mieux cerner le rôle de la Tc24 dans l'infection naturelle par *T.cruzi*, des études de la réponse immune au cours des infections naturelles par *T.cruzi* seront réalisées. Ces études comprennent l'analyse de la réponse isotypique et la réponse cellulaire chez les patients chagasiques.

Sur le plan expérimental, l'étude du rôle de la Tc24 dans un autre modèle est envisagé. Ainsi, dans la souris BALB/c.XID nous pensons étudier la nature des populations cellulaires induites par Tc24 et le répertoire des VBs, le profil des cytokines, la réponse isotypique, et l'aspect histopathologique.

Les études sur le terrain font l'objet de projets de collaboration avec des laboratoires de l'Equateur, la Colombie et le Vénézuela. Pour les études chez la souris BALB/c.XID, un projet de collaboration avec l'Institut Pasteur de Paris (Unité d'Immunoparasitologie. Dr. Paola Minoprio) a été mis en place. Nous espérons que ces collaborations pourront contribuer au développement des méthodes nouvelles du diagnostic basée sur l'utilisation des outils moléculaires que nous avons développé au laboratoire de recherche sur les trypanosomatidae. Par ailleurs, la collaboration initiée avec l'équipe de recherche de l'Institut Pasteur de Paris nous apportera des informations complémentaires sur les mécanismes immunitaires au niveau humoral et cellulaire induit par Tc24.

XI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABRAHAMSOHN, I. A., H. HELOISA, S. L. BLOTTA and M.A. CUROTTA. 1981. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice treated with Mycobacterium bovis BCG and cyclophosphamide. *Infect. Immun.* 31: 1145.
- ABRAHAMSON, I. A. and W. D. DA SILVA. 1977. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol.* 75: 317.
- AMUNARRIZ, M., A. GUEVARA, M. E. CHICO, and R. H. GUDEIAN. 1995. Seroprevalence of Chagas Disease in the Ecuadorian Amazon region. In preparation.
- AMUNARRIZ, M., M. E. CHICO and R. H. GUDEIAN. 1991. Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. *J. Trop. Med. Hyg.* 94: 145.
- ANDRADE, A., V. VERA DE CORONEL, E. ABRIL, F. AVELLAN and A. CEVALLOS. 1980. Investigacion epidemiologica de la prevalencia de Enfermedad de Chagas en una muestra de poblacion de dos localidades semirurales de la provincia de Manabi. *Galeno.* 2: 6.
- ANDRADE, S. G., A. RASSI, J. B. MAGALHAES, F. FERRIOLLI FILHO and A. O. LUQUETI. 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 624.
- ANDRADE, S. G., J. B. MAGALHAES and A. L. PONTES. 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* of different types. *Bull. World Heal. Organiz.* 63: 721.
- ANDREWS, N. W. and M. B. WHITLOW. 1989. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. *Mol. Bioche. Parasitol.* 33: 249.
- ANDREWS, N. W., C. K. ABRAMS, S. SLATIN and G. GRIFFITHS. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell.* 61: 1277.
- ANDREWS, N. W., M. J. MANSO ALVES, R. I. SCHUMACHER and W; COLLI. 1985. *Trypanosoma cruzi*: protection in mice immunized with 8-methoxypsonalen-inactivated trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 60: 255.
- ARAUJO, F. G. 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on viable population of (L3T4+) T lymphocytes. *Infect. Immun.* 57: 2246.
- ARAUJO, F. G. and B. MOREIN. 1991. Immunization with *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigens incorporated into ISCOMS protects against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.* 59: 2909.
- ARAUJO, F. G., E. CHIARI and J. C. P. DIAS. 1981. Demonstration of *Trypanosoma cruzi* antigen in serum from patients with Chagas'disease. *Lancet.* January 31: 246.
- ARTEAGA, L. 1929. Investigaciones sobre la existencia de la enfermedad de Chagas en la zona del ferrocarril a la Costa. Tesis Doctoral.
- AVILA, H. A., D. S. SIGMAN, L. M. COHEN, R. C. MILLIKAN and L. SIMPSON. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnostic of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 48: 211.
- AVILA, H. A., J. BORGES PEREIRA, O. THIEMANN, E. DE PAIVA, W. DEGRAVE, C. MOREL and L. SIMPSON. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of

chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(9): 2421.

AVILA, J. L., A. AVILA and M. A. POLEGRE. 1993. Inhibitory effects of sinefungin and its cyclic analog on the multiplication of *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48: 112.

AZOGUE, E., C. LA FUENTE and Ch.DARRAS. 1985. Congenital Chagas'disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79: 176.

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

BITTENCOURT, A. L. et coll. 1988. Evaluation of Chagas'disease transmission through breast-feeding. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 83: 37.

BITTENCOURT, A. L., E. MOTA, R. RIERO FILHO, L. G. FERNANDES, P. R. CERQUEIRA DE ALMEIDA, I. SHERLOCK, J. MAGUIRE, J. PIESMAN and C. W. TODD. 1985. Incidence of congenital Chagas'disease in Bahia, Brazil. *J. Trop. Ped.* 31: 242.

BITTENCOURT. A. L., H. S. BARBOSA, T. ROCHA, I. SANTOS and A. SODRE. 1972. Incidencia da transmissão congenita da doença de Chagas em partos prematuros na maternidade Tsylla Balbino (Salvador, Bahia). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 14: 131.

BONFA, E., V. S. T. VIANA, A. C. P. BARRETO, N. H. YOSHINARI and W. COSSERMELLI. 1993. Autoantibodies in Chagas' disease. An antibody cross-reactive with human and *Trypanosoma cruzi* ribosomal proteins. *J. Immunol.* 150: 3917.

BORDA, E., J. PASCUAL, P. M. COSSIO, M. DE LA VEGA, R. M. ARANA and L. A. STERIN-BORDA. 1984. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenergic receptors of myocardium and modulates their activity. *Clin. Exp. Immunol.* 57: 679.

BRENER 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Microbiol.* 27: 347.

BRENER, Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Parasitology.* 18: 247.

BRENER, Z. 1986. Why vaccines do not work in Chagas disease. *Parasitol. Today.* 2: 196.

BRETSCHER, P. A., G. WEI., J. N. MENON and H. BIELEFELDT-OHMANN (1992). Establishment of stable, cell mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257: 539.

BRITTO, C., M. A. CARDOSO, C. M. MONTEIRO VANNI, A. HASSLOCHER-MORENO, S. S. XAVIER, W. OLEEMANN, A. SANTORO, C. PIRMEZ, C. M. MOREL and P. WINCKER. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology.* 110: 241.

BRUMPT, E. 1914. Etude expérimentale de la trypanosomose américaine de C. Chagas. *Bull. Acad. Méd. (Paris).* 67: 428.

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

BURGESS, D. E., R. E. KUHN and K. S. CARLSON. 1981. Induction of parasite-specific

- helper T lymphocytes during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 127: 2092.
- CAMARGO, M. E. 1966. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 8: 227.
- CANCADO, J. R. 1985. Tratamento especifico. In: Cardiopatia Chagásica. Ed. Cançado, J. R. and Chuster, M. Belo Horizonte. Fundação Carlos Chagas. 227.
- CARLIER, Y., M. T. RIVERA, C. TRUYENS, F. PUISSANT and J. MILAIRE. 1987. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: fetal growth retardation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37(3): 534.
- CERBAN, F., A. GRUPPI, S. GEA and E. VOTTERO-CIMA. 1991. IgG isotype profiles induced in mice by two *Trypanosoma cruzi* electronegative antigens. *Int. Arch. Allergy App. Immunol.* 96: 35.
- CERISOLA, J. A. 1970. Immunodiagnosis of Chagas' disease: hemagglutination and immunofluorescence test. *J. Parasitol.* 56: 409.
- CERISOLA, J. A., R. ROHWEDDER, E. L. SEGURA, C. E. DEL PRADO, M. ALVAREZ and G. J. W. MARTINI. 1974. El xenodiagnóstico. Normatización. Utilidad. Buenos Aires: Imprenta del Instituto Nacional de Investigaciones Cardiovasculares.
- CETRON, M. S., R. HOFF, S. KAHN, H. EISEN and W. C. VAN VOORHIS. 1992. Evaluation of recombinant trypomastigote surface antigens of *Trypanosoma cruzi* in screening sera from a population in rural Northeastern Brazil endemic for Chagas' disease. *Acta Tropica.* 50: 259.
- CHESS, Q., A. M. ACOSTA, J. K. SETHI and C. A. SANTOS-BUCH. 1983. Reversible acquisition of a host surface membrane antigen by *Trypanosoma cruzi*. *Inf. Immun.* 40: 299.
- CHIARI, E., A. BRAGA DE OLIVEIRA, D. SOARES RASLAN, A. A. L. MESQUITA and K. G. TAVARES. 1991. Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 372.
- CHOCAIR, P. R., E. SABBAGA, V. AMATO NETO, M. SHIROMA and G. M DE GOES. 1981. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 23(6): 280.
- CHORMANSKI, L. and R. E. KUHN. 1987. Use of parasite antigens and interleukin-2 to enhance suppressed immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect. Immun.* 55: 403.
- CHORMANSKY, L. and R. E. KUHN. 1985. Interleukin-2 enhances specific and nonspecific immune responses in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.* 50: 354.
- CORRAL, R. S., A. ORN and S. GRINSTEIN. 1992. Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(1): 31.
- COSSIO, P. M., R. P. LAGUENS, C. DIEZ, A. SZARFMAN, A. SEGAL and R. M. ARANA (1974). Chagasic cardiopathy: antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation.* 50: 1252.
- CRABTREE, G. R. 1989. Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science.* 243: 355.
- CUEVA, I. and S. ROMERO. 1987. Estudio epidemiológico de la Enfermedad de Chagas en la

provincia de Loja. En: Los problemas de Salud en el Ecuador. Departamento de atencion en Salud dela Direccion Nacional del Seguro Campesino. 151.

D'IMPERIO LIMA, M. R., H. EISEN, P. MINOPRIO, M. JOSCOWICZ and A. COUTINHO. 1986. Persistence of polyclonal B-cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J. Immunol.* 137: 353.

D'IMPERIO LIMA, M. R., M. JOSKOWICZ, A; COUTINHO, A. KIPNIS and H. EISEN. 1985. Very large isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Europ. J. Immunol.* 15: 201.

DAMONNEVILLE, M., C. AURIAULT, C. VEWAERDE, A. DELANOYE, R. PIERCE and A. CAPRON. 1986. Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A): role of IgE antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 65: 224.

DARCY, F., D. DESLEE, F. SANTORO, H. CHARIF, C. AURIAULT, A. DECOSTER, V. DUQUESNE and A. CAPRON. 1988. Induction of a protective immunity antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 10: 553.

DE CASTRO, S. L. 1993. The challenge of Chagas'disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica.* 53: 83.

DE ISOLA, E. L., E. M. LAMMEL, V. J. KATZIN, S. M . GONZALEZ CAPPA. 1981. Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* 67(1): 53.

DE REZENDE, J. M. 1979. Clinica: manifestações digestivas. In: Brener, Z. & Andrade, Z.A., éd. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Trypanosoma cruzi et la maladie de Chagas.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.312.

DE SOUZA, W. and T. SOUTO PADRON. 1980. The paraxial structure of the flagellum of trypanosomatidae. *J. Parasitol.* 66: 229.

DEFRANC, M. 1982. Epidemiologia. En: Enfermedad de Chagas. Editorial Casa de la Cultura Ecuatoriana.

DEFRANC, M. 1987. Prevalencia de la Enfermedad de Chagas en el Ecuador: informe 1983-1986. *Rev. Ecuat. Hyg. Med. Trop.* 37: 13.

DEUTSCHLÄNDER, N., R. VOLLETHUN and K.D. HUNGERER. 1978. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice a long term study following paw infection. *Tropenmed. Parasit.* 29: 323.

DIAZ, C., V. NUSSENZWEIG and A. GONZALEZ. 1992. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(5): 616.

DRAGON, E. A., V. M. BROTHERS, R. A. WRIGHTSMAN and J. MANNING. 1985. A Mr 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16: 213.

EISEN, H. and S. KAHN. 1991. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: fanstasy and reality. *Curr. Biol.* 3: 507.

ESPINOSA, L. 1955. Epidemiología de la Enfermedad de Chagas en la Republica del Ecuador. *Rev. Ecuat. Hyg. Med. Trop.* 12: 25.

- FAIRLAMB, A., A. CERAMI. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 695.
- FEITOSA, M. F. and H. KRIEGER. 1991. An appraisal of the epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 86(2): 159.
- FELIX, J. C., B. F. VON KREUTER and C. A. SANTOS-BUCH. 1993. Mimicry of heart cell surface epitopes in primary anti-*Trypanosoma cruzi* Lyt2+ Y lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopath.* 68: 141.
- FISCHER, E., M. A. OUASSI, P. VELGE, J. CORNETTE and M. KAZATCHKINE. 1988. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T.cruzi* from damage by the human alternative pathway. *Immunol.* 95: 99.
- FREILIJ, H. L., R. S. CORRAL, A. M. KATZIN and S. GRINSTEIN. 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas'disease. *J. Clin. Microbiol.* 25(1): 133.
- FURTADO, T. A. and J. PELLEGRINO. 1956. Intradermal test in American leishmaniasis with a polysaccharide fraction isolated from *Leishmania brasiliensis*. *J. Invest. Derm.* 27: 53.
- GALINDO, S. 1958. Frecuencia chagasica en 150 cardiomegalicos. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* 15: 205.
- GALVAO, L. M. C., R. M. B. NUNES, J. R. CANCADO, Z. BRENER and A. U. KRETTLI. 1993. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87: 220.
- GARCIA, E., L. E. RAMIREZ, V. MONTEON and J. SOTELO. 1995. Diagnosis of American Trypanosomiasis (Chagas' Disease) by the New Complement Fixation Test. *J. Clin. Microbiol.* 33(4): 1034.
- GAZZINELLI, R. T., I. P. OSWALD, S. HIENY, S. L. JAMES and A. SHER. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-B. *Eur. J. Immunol.* 22: 2501.
- GAZZINELLI, R. T., L. M. C. GALVAO, G. KRAUTZ, A. P. C. A. LIMA, J. R. CANCADO, J. SCHARFSTEIN and A. U. KRETTLI. 1993. Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49(5): 625.
- GOMEZ LINCE, L. F. 1968. El problema de la enfermedad de Chagas en Guayaquil. *Rev. Ecuat. Hig. Med. Trop.* 25: 3.
- GONZALEZ, J. M., F. ARAGUTH and N. YOSHIDA. 1991. Resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection resulting from immunization of mice with a 90 kilodalton antigen from metacyclic trypomastigotes. *Inf. Immun.* 58: 863.
- GONZALEZ, N., I. GALINDO, P. GUEVARA, E. NOVAK., J. V. SCORZA, N. ANEZ, J. F. DA SILVEIRA and J. L. RAMIREZ. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* 832(1): 153.
- GONZALVES DA COSTA, S. C., P. H. LAGRANGE, B. HURTREL, I. KERR and A. ALENCAR. 1984. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. *Ann. Immunol.* 135: 317.
- GRANT, I. H. , J. W. M. GOLD, M. WITTNER, H. B. TANOWITZ, C. NATHAN, K.

- MAYER, L. REICH, N. WOLLNER, L. STEINHERZ, F. GHAVIMI, R. O'REILLY and D. ARMSTRONG. 1989. Transfusion-associated acute Chagas'disease acquired in the United States. *Ann. Intern. Med.* 111: 849.
- GRUBER, A. et B. ZINGALES. 1993. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas'disease. *Exp. Parasitol.* 76: 1.
- GRUPPI, A., F. CERBAN, M. C. PISTORESI-PALENCIA and E. VOTTERO-CIMA. 1995. *Trypanosoma cruzi*: Transfer of protection by lymph node cells obtained from mice immunized with exoantigens of pI 4.5. *Exp. Parasitol.* 80: 382.
- GUERREIRO, C. and A. MACHADO. 1913. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnostico. *Brasil-med.* 27: 225.
- HALL, B. F. and K.A. JOINER. 1993. Developmentally regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defences. *J. Eur. Microbiol.* 40: 207.
- HAREL-BELLAN, A. M., M. JOSKOWICKZ, D. FRADELIZI and H. EISEN. 1983. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3466.
- HAROUM, E. M. and G. V. HILLYER. 1986. Resistance to fascioliasis: a review. *Vet. Parasitol.* 20: 63.
- HARTH, G., A. A. MILLS, T. LIN and F. G. ARAUJO. 1994. *Trypanosoma cruzi* glycoprotein of Mr 56000: characterization and assessment of its potential to protect against fatal parasite infections. *Mol. Microbiol.* 11: 261.
- HATCHER, F. M., R. E. KUHN, M. C. CERRONE and R. C. BURTON. 1981. Increased natural killer cell activity in experimental American Trypanosomiasis. *J. Immunol.* 127: 1126.
- HO, J. L., S. G. REED, J. SOBEL, S. ARRUDA, S. H. HE, E. A. WICK and K. H. GRABSTEIN. 1992. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infect. Immun.* 60: 1984.
- HOFF, R. 1974. A method for counting and concentrating living *Trypanosoma cruzi* in blood lysed with ammonium chloride. *J. Parasitol.* 60: 257.
- HOFFLIN, J. M., R. H. SADLER, F. G. ARAUJO, W. E. PAGE and J. S. REMINGTON. 1987. Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 437.
- HOFT, D. F., R. G. LYNCH and L. V. KIRCHHOFF. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 151: 7038.
- HONTEBEYRIE-JOSCOWICZ, M., G. SAID, G. MILON, G. MARCHAL and H. EISEN. 1987. L2T4+ 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.
- HUDSON, L. and P. J. HINDMARSH. 1985. The relationship between autoimmunity and Chagas disease: causal or coincidental. *Curr. Topics Microb. Immunol.* 117: 167.
- HUNGERER, K. D., B. ENDERS, and O. ZWISLER. 1970. Recent developments in immunodiagnosis of Chagas'disease. *J. Parasit.* 56: 429.

- IIDA, K., M. B. WHITLOW and V. NUSSENZWEIG. 1989. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J. Exp. Med.* 169: 881.
- JAMES, S. L., T. L. KIPNIS, A. SHER and R. HOFF. 1982. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infect. Immun.* 35: 188.
- JOINER, K., A. SHER, T. GAITHER and C. HAMMER. 1986. Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6593.
- KAWABATA, M., T. UCHIYAMA, T. MIMORI, Y. HASHIGUSHI and V. VERA DE CORONEL. 1987. Association of electrocardiographic abnormalities with seropositivity to *Trypanosoma cruzi* in Ecuador. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81: 7.
- KIERSZEBEAM, F., S. MAJUMDER, H. MEJIA LOPEZ and M. B. SZTEIN. 1995. Differential effects of *Trypanosoma cruzi* on the transcription of the p55IL-2R, c-fos, c-myc and CD69 genes in activated human lymphocytes. *Parasite Immunol.* 17: 197.
- KIERSZEMBAUM, F. 1980. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. *J. Parasitol.* 66: 673.
- KIERSZEMBAUM, F. and J. G. HOWARD. 1976. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116: 1208.
- KIERSZEMBAUM, F. and M. PIENKOWSKI. 1979. Thymus-dependent control of host defence mechanisms against *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* 24: 117.
- KIERSZENABUM, F., W. R. CUNA, L. A. BELTZ and M. B. SZTEIN. 1990. Trypanosoma immunosuppressive factor (TIF): a secretion product (s) of *Trypanosoma cruzi* which inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.* 144: 4000.
- KIERSZENBAUM, F. and M. M. HAYES. 1980. Evaluation of lymphocyte responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 708.
- KIERSZENBAUM, F., E. KNECHT, D.B. BUDZKO and M. C. PIZZIMENTI. 1974. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 112(5): 1839.
- KIPNIS, T. L., J. R. DAVID, C. A. ALPER, A. SHER and W. D. DA SILVA. 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 602.
- KIRCHHOFF, L. V. 1993. American trypanosomiasis (Chagas' disease) a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.* 329: 639.
- KRAUTZ, G. M., M. G. COUTINHO, L. M. C. GALVAO, J. R. CANCADO and A. U. KRETLI. 1994. Antigenos solúveis liberados por tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* utilizados no teste ELISA para detectar cura em pacientes chagásicos após tratamento específico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 27(4): 199.
- KRETLI, A. U. and Z. BRENER. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated with anti-living-trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* 128: 2009.

- KRETTLI, A. U. and Z. BRENER. 1976. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116: 775.
- KRETTLI, A. U., J. R. CANCADO and Z. BRENER. 1982. Effect of specific chemotherapy on the levels of lytic antibodies in Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76: 334.
- KRIEGER, M. A., E. ALMEIDA, W. OLEEMANN, J. J. LAFAILLE, J. BORGES PEREIRA, H. KRIEGER, M. R. CARVALHO and S. GOLDENBERG. 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(4): 427.
- KUHN, R. E. and J. E. MURNANE. 1977. *Trypanosoma cruzi*: immune destruction of parasitized mouse fibroblasts in vitro. *Exp. Parasitol.* 41: 66.
- LAGUENS, R. P., CABEZA MECKERT, P. G. CHAMBO and R. J. GELPI. 1981. Chronic Chagas' disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells. *Medicina*. 41: 40.
- LAINSON, R. J. J. SHAW and R. D. NAIFF. 1980. Chagas'disease in the amazon basin: speculations on transmission per os. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 22(6): 294.
- LANDIVAR, W. H. C., T. NAKASA, H. TACHIBANA, K. C. PAZ and S. TATENO. 1992. Seropositivity to *Trypanosoma cruzi* in blood donors in Santa Cruz, Bolivia. *J. Infect. Dis.* 166: 1464.
- LEDESMA, O. 1988. Tratamiento de la infección chagásica aguda. *Rev. Fed. Argen. Cardiol.* 17: 232.
- LEIGUARDA, R., A. RONCORONI, A. L. TARATUTO. 1990. Acute CNS infection by *T.cruzi* (Chagas' disease) in immunosuppressed patients. *Neurology*. 40: 850.
- LEMESRE, J. L., D. AFCHAIN, O. OROZCO, M. LOYENS, F. S. BRENIERE, P. DESJEUX, Y. CARLIER, U. MARTIN, J. A. NOGUEIRA-QUEIROZ, D. LE RAY and A. CAPRON. 1986. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas'disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35(1): 86.
- LENT, H., & P. WYGODZINSKY. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 163: 123.
- LEY, V., E. S. ROBBINS, V. NUSSENZWEIG and N. W. ANDREWS. 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J. Exp. Med.* 171: 401.
- LOPEZ, A. F., M. M. BUNN MORENO and C. J. ANDERSON. 1978. The lysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by eosinophils and neutrophils. *Int. J. Parasitol.* 8: 485.
- LORCA, M., A. GONZALEZ, C. VELOSO, V. REYES and U. VERGARA. 1992. Immunodetection of antibodies in sera from symptomatic and asymptomatic chilean Chagas'disease patients with *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992. 46(1): 44.
- MADEIRA, E. D., A. F. B. ANDRADE, M. M. BUNNMORENO and M. BARCINSKI. 1979. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: characterization of the effector cell from normal human blood. *Infect. Immun.* 25: 34.
- MAGALHAES, J. B. and S. G. ANDRADE. 1994. Investigation on the possibility of



spontaneous cure of mice infected with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Re. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 36(6): 481.

MALECKAR, J. R. and F. KIERSZENBAUM. 1983. Inhibition of mitogen induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by blood stream forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 130: 908.

MARSDEN, P. D., A. VOLLMER, S. K. K. SEAH, C. HAWKEY and D. GREEN. 1970. Behaviour of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 4: 177.

MATSUMOTO, T. K., S. HOSHINO-SHIMIZU, P. M. NAKAMURA, H. F. ANDRADE Jr. and E. S. UMEZAWA. 1993. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 31(6): 1486.

McCABE, R. E. and B. T. MULLINS. 1990. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. *J. Immunol.* 144: 2348.

MINOPRIO, P., A. COUTINHO, M. JOSCOWICKZ, M. R. D'IMPERIO LIMA and H. EISEN. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 24: 669.

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

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

MINOPRIO, P., M. CURY EL CHEIKH, E. MURPHY, M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICZ, R. COFFMAN, A. COUTINHO and A. O'GARRA. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-g dependent. *J. Immunol.* 151: 4200.

MINOPRIO, P., O. BURLEN, P. PEREIRA, B. GUILBERT, L. ANDRADE, M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICZ and A. COUTINHO. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* 28: 553.

MINOPRIO, P., S. ITOHARA, C. HEUSSER, S. TONEGAWA and A. COUTINHO. 1989. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite nonspecific responses and the activation of TcR1 T cells. *Immunol. Rev.* 112: 183.

MONCAYO A. 1993. Chagas disease. *Tropical Disease Research Eleventh Programme Report, WHO-TDR.* 67.

MOSSMAN, T. R., H. CHERWINSKI, M. W. BOND, M. A. GIEDLIN and R. L. COFFMAN. 1986. Two types of murine helper T cell clones.- I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348.

NATHAN, C., N. NOGUEIRA, C. JUANBHANICH, J. ELLIS and D. COHN. 1979. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *J. Exp. Med.* 149: 1056.

NICKELL, S. P., A. GEBREMICHAEL, R. HOFF and M. H. BOYER. 1987. Isolation and functional characterization of murine T-cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 138: 914.

NICKELL, S. P., G. A. STRYKER and C. AREVALO. 1993. Isolation from *Trypanosoma*

cruzi-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. *J. Immunol.* 150: 1446.

NICKERSON, P., P. ORR, M. L. SCHROEDER, L. SEKLE and J. B. JOHNSON. 1989. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in non-endemic area. *Ann. Inter. Med.* 111: 851.

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

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. 1992. Reporte: reunion sobre bancos de sangre como monitores de la prevalencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi*, Hepatitis y VIH. *TDR. CHA. BANSA.* 92.3: 1.

ORTIZ-ORTIZ, L., D. ELLIOT PARKS, M. RODRIGUEZ, and W. O. WEINGLE. 1980. Polyclonal B lymphocyte activation during *T.cruzi* infection. *J. Immunol.* 124: 121.

OUAISSI, A., J. CORNETTE, P. VELGE and A. CAPRON. 1989. Identification of anti-cholinesterase and anti-idiotype antibodies in human and experimental Chagas' disease. Pathological implications. *Eur. J. Immunol.* 18: 1889.

OUAISSI, A., T. AGUIRRE, B. PLUMAS-MARTY, M. PIRAS, R. SCHONECK, H. GRAS-MASSE, A. TAIBI, M. LOYENS, A. TARTAR, A. CAPRON and R. PIRAS. 1992. Cloning and sequencing of 24-kDa *Trypanosoma cruzi*-specific antigen released in association with membrane vesicles and defined by a monoclonal antibody. *Biol. Cell.* 75: 11.

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

OUAISSI, M. A., A. TAIBI, M. LOYENS, U. MARTIN, D. AFCHAIN, C. MAIDANA, C. CAUDIOTI, J. CORNETTE, A. MARTELLEUR, P. VELGE, B. MARTY and A. CAPRON. 1991. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45(2): 214.

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

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.* 264: 603.

PAHO. 1984. Status of Chagas'disease in the region of the Americas. *Epidemiological Bulletin, Pan American Health Organization.* 5(2): 5.

PAN, A. A., G. B. ROSENBERG, M. K. HURLEY, G. J. H. SCHOCK, V. P. CHU and A. AIYAPPA. 1992. Clinical evaluation of an EIA for the sensitive and specific detection of serum antibody to *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). *J. Clin. Infect. Dis.* 165: 585.

PERALTA, J. M., M. G. M. TEXEIRA, W. G. SHREFFLER, J. B. PEREIRA, J. M. BURNS Jr., P. R. SLEATH and S. G. REED. J. 1994. Serodiagnosis of Chagas'disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *Clin. Microbiol.* 32(4): 971.

- PEREIRA, M.E. A. 1983. A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Science*. 219: 1444.
- PETRY, K. and W. C. VAN VOORHIS. 1991. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 151.
- PLATA, F., J. WIETZERBIN, F. GARCIA-PONS, E. FALCOFF and H. EISEN. 1984. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Europ. J. Immunol.* 14: 930.
- PLESS, M., D. JURANEK, P. KOZARSKY, F. STEURER, G. TAPIA and H. BERMUDEZ. 1992. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis and domiciliary triatomine distribution. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 539.
- PLUMAS-MARTY, B., A. TAIBI, H. PESSOA, C. VERWAERDE, M. LOYENS, V. POMMIER, P. VELGE, A. CAPRON and A. OUAISSI. 1993. *Trypanosoma cruzi* glutathione-binding proteins (TcGBP): protection induced by native proteins in an experimental model and analysis of the antibody response. *Res. Immunol.* 144: 553.
- RAMOS, C., I. SCHÄDTLER-SIWON and L. ORTIZ-ORTIZ. 1979. Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Immunol.* 122: 1243.
- RASSI, A. 1982. Tratamento etiologico da doença de Chagas. *Arquiv. Brasil. Cardiol.* 38: 277.
- RASSI, A. and H. O. FERREIRA. 1971. Tentativas de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquemas de duração prolongada. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 5: 235.
- REED, S. 1980. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. *Infec. Imm.* 28: 404.
- REED, S. G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 140: 4342.
- REED, S. G., B. ROTERS and E. A. GOIDL. 1983. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 131: 1978.
- REED, S. G., C. E. BROWNELL, D. M. RUSSO, J. S. SILVA, K. H. GRABSTEIN and P. J. MORRISSEY. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* 153: 3135.
- REED, S. G., C. F. NATHAN, D. L. PIHL, P. RODRICKS, K. SHANEBECK, P. J. CONLON and K. H. GRABSTEIN. 1987. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon- γ . *J. Exp. Med.* 166: 1734.
- REED, S. G., J. A. INVERSO and S. ROTERS. 1984. Heterologous antibody responses in mice with chronic *T. cruzi* infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin-2. *J. Immunol.* 133: 1558.
- REED, S. G., K. H. GRABSTEIN, D. L. PIHL and P. J. MORRISSEY. 1990. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor restores deficient immune responses in mice

- with chronic *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 145: 1564.
- REED, S. G., P. SCOTT. 1993. T cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Op. Immunol.* 5: 524.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. and L. HUDSON. 1980. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. *Clin. Exp. Immunol.* 40: 36.
- ROTTENBEREG, M. E., L. SPORRONG, I. PERSSON, H. WIGZELL and A. ÖRN. 1995a. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol.* 41: 164.
- ROTTENBERG, M. E., A. RIARTE, L. SPORRONG, J. ALTCHEH, P. PETRAY, A. M. RUIZ, H. WIGZELL and A. ÖRN. 1995b. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol. Letters.* 45: 53.
- ROTTENBERG, M. E., M. BAKHIET, T. OLSSON, K. KRISTENSSON, T. MAK, H. WIGZELL and A. ÖRN. 1993. Differential susceptibilities of mice genetically deleted of CD4 and CD8 to infection with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect. Immun.* 61: 5129.
- ROTTENBERG, M. E., R. L. CARDONI, E. H. TITTO, M. MORENO and E. L. SEGURA. 1988. *Trypanosoma cruzi*: immune response in mice immunized with parasite antigens. *Exp. Parasitol.* 65: 101.
- RUIZ, A. M., M. ESTEVA, A. RIARTE, E. SUBIAS and E. L. SEGURA. 1986. Immunoprotection of mice against *Trypanosoma cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Lett.* 12: 1.
- RUIZ, A. M., M. ESTEVA, E. SUBIAS, M. MORENO, A. ROSENSTEIN DE CAMPANINI, E. VELAZQUEZ and E. L. SEGURA. 1990. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 39: 117.
- 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.
- RUSSO, M., N. STAROBINAS, P. MINOPRIO, A. COUTINHO and M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICZ. 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann. Immunol.* 139: 225.
- RUSSO, M., N. STAROBINAS, R. RIBEIRO DOS SANTOS, P. MINOPRIO, H. EISEN and M. HONTEYBERIE-JOSCOWICZ. 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 11: 285.
- RUSSOMANDO, G., A. FIGUEREDO, M. ALMIRON, M. SAKAMOTO and K. MORITA. 1992. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J. Clin. Microbiol.* 30(11): 2864.
- SANDERSON, C. J., M. M. BUNN MORENO and A. F. LOPEZ. 1978. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: the release of ^3H -labelled RNA, DNA and protein. *Parasitol.* 76: 299.
- SATO, N. N., E. H. YAMASHIRO-KANASHIRO, M. M. TANJI, R. KANENO, M. L. HIGUCHI and A. J. S. DUARTE. 1992. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among

spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Infect. Immun.* 60: 1024.

SCHECHTER, M., A. VOLLE, C. J. MARINKELLE, J. E. FLINT, F. GUHL, M. A. MILES. 1983. Purified *Trypanosoma cruzi* specific glycoprotein for discriminative serological diagnosis of south american trypanosomiasis (Chagas' disease). *Lancet*. October 22:939.

SCHENKMAN, S., and D. EICHINGER. 1993. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and cell invasion. *Parasitol. Today*. 9: 218.

SCHENKMAN, S., M. L. GUTHER and N. YOSHIDA. 1986. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigote: Effect of a specific monoclonal antibody. *J. Immunol.* 137: 1623.

SCHMUNIS, G. A. 1985. Chagas'disease and blood transfusion. In: Dodd, R. Y. & Barker, L. E. éd. Infection, immunity and blood transfusion. New York, Alan R. Liss Inc. 127.

SCHMUNIS, G. A., S. M. GONZALES-CAPPA, O. C. TRAVERSA and J. F. YANOVSKY. 1971. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infection with *Trypanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 89.

SCOTT, M. T. 1981. The nature of immunity against *Trypanosoma cruzi* in mice recovered from acute infection. *Parasite Immunol.* 3: 209.

SCOTT, M. T. and D. SNARY. 1979. Protective immunisation of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. *Nature*. 282: 73.

SEGURA, E. L., C. VALQUEZ, A. BRONZINA, J. M. CAMPOS, J. A. CERISOLA and S. M. GONZALEZ CAPPA. 1977. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II. Flagellar and membrane fraction. *J. Protozool.* 24: 540.

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.

SHERLOCK, I.A. 1979. Veteors. Vecteurs.In: Brener, Z. & Andrade, Z. A. éd. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. *Trypanosoma cruzi et la maladie de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 42.

SILVA, J. S., P. J. MORRISSEY, K. H. GRABSTEIN, K. M. MOHLER, D. ANDERSON and S. G. REED. 1992. Interleukin 10 and Interferon g regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175: 169.

SKEIKY, Y. A. W., D. R. BENSON, J. A. GUDERIAN, P. R. SLEATH, M. PARSONS and S.G. REED. 1993. *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. Novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J. Immunol.* 151: 5504.

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

SNARY, D. and L. HUDSON. 1979. *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of one major glycoprotein. *FEBS Lett.* 100: 166.

SOONG, L. and R. L. TARLETON. 1992. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, c-myc and c-fos gene expression. *J. Immunol.* 149: 2095.

SPINELLA, S. , P. LIEGEARD, and M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICKZ. 1992.

Trypanosoma cruzi: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas'disease. *Exp. Parasitol.* 74: 46.

SPINELLA, S., G. MILON and M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICKZ. 1990. A CD4 Th2 cell line from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. *Euro. J. Immunol.* 20: 1045.

SPINELLA, S., P. LIEGEARD, B. GUILBERT and M. HONTEBEYRIE-JOSCOWICKZ. 1989. Anti-Ia treatment modulates specific and polyclonal antibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Autoimmun.* 2: 791.

STORNI, P. D., F. L. BOLSI, and S. F. YANOVSKY. 1975. Reaccion de aglutinacion directa para el diagnostico de la enfermedad de Chagas. *Medicina*. (Buenos Aires). 35: 67.

STURM, N. R., W. DEGRAVE, C. MOREL, and L. SIMPSOM. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33: 205.

SZARFMAN, A., V. P. TERRANOVA, S. I. RENNARD, J. M. FOICLART, M. FATIMA LIMA, J. I. SCHEINMAN and G. R. MARTIN. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.* 155: 1161.

SZSTEIN, M. B. and F. KIERSZENBAUM. 1992. Suppression by *Trypanosoma cruzi* of T-cell receptor expression by activated human lymphocytes. *Immunol.* 77: 277.

SZSTEIN, M. B., W. R. CUNA and F. KIERSZENBAUM. 1990. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.* 144: 3558.

TAIBI, A., B. PLUMAS-MARTY, A. GUEVARA ESPINOZA, R. SCHONECK, H. PESSOA, M. LOYENS, R. PIRAS, T. AGUIRRE, H. GRAS-MASSE, M. BOSSUS, A. TARTAR, A. CAPRON and A. OUAISSE. 1993. *Trypanosoma cuzi*: immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretoryantigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. *J. Immunol.* 151: 2676.

TAMBOURGI, D. V., T. L. KIPNIS and W. D. DA SILVA. 1989. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp. Parasitol.* 68: 192.

TANDON, A., H. ZAHNER and G. LAMMLER. 1979. CELISA (Complement-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) a new method for the estimation of complement fixing antibodies; its use for Chagas' disease. *Tropenmed. Parasitol.* 30: 189.

TARDIEUX, I., P. WEBSTER, J. RAVESLOOT, J. A. LUNN, J. E. HEUSER and N. ANDREWS. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 71: 1117.

TARLETON, R. L. 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 144: 717.

TARLETON, R. L. 1991. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.* 142: 130.

TARLETON, R. L. 1995. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. *Parasit. Today.* 11: 7.

TARLETON, R. L. and R. E. KUHN. 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, R. L., B. H. KOLLER, A. LATOUR and M. POSTAN. 1992. Susceptibility of B2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection *Nature*. 356: 338.

TARLETON, R. L. and R. E. KUHN. 1984. Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from infected mice with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. *J. Immunol.* 133: 1570.

TEIXEIRA, M. M. G. and N. YOSHIDA. 1986. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* 18: 271.

TEXEIRA, A. R. L. 1979. Chagas' disease: trends in immunological research and prospects for immunoprophylaxis. *Bulletin Organis. Mond. Santé*. 57: 697.

TEXEIRA, A. R. L. and C. A. SANTOS BUCH. 1974. The immunology of experimental Chagas' disease: I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* 113: 859.

THOMAS, N. and M. P. DEANE. 1988. *Trypanosoma cruzi*: the complement mediated lysis (CoML) in experimentally infected opossum. In: Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. 11: 116.

TORRES, C. M. and B. M. TAVARES. 1958. Miocardite no macao cebus apos inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 56: 85.

TORRICO, F., H. HEREMANS, M. T. RIVERA, E. VAN MARCK, A. BILLIAU and Y. CARLIER. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146: 326.

TRISCHMANN, T., H. TANOWITZ, M. WITTNER and B. BLOOM. 1978. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45: 160.

TYBAYRENC, M., M. SOLIGNAC, M. L. CARIOU, D. LE RAY, P. DESJEUX. 1984. Isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi*: recent or ancient, homogeneous or heterogeneous origin. *C R Acad. Sci. (III)* 299: 195.

TYBAYRENC, M., P. WARD, A. MORA, F. J. AYALA. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multyclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 115.

UMEKITA, L. F. and I. MOTA. 1989. In-vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasite. Immunol.* 11: 561.

UNTERKIRCHER, A., S. AVRAMEAS and T. TERNYNCK. 1993. Autoantibodies in the sera of *Trypanosoma cruzi*-infected individuals with or without clinical Chagas' disease. *J. Clin. Lab. Anal.* 7: 60.

VAN VOORHIS, W. C. and H. EISEN. 1989. F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J. Exp. Med.* 169: 641.

VAN VOORHIS, W. C., L. SCHLEKEWY and H. LE TRONG. 1991. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F1-160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino-acid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 5993.

- VERGARA, U., C. VELOSO, A. S. GONZALEZ and M. LORCA. 1992. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas'disease using synthetic peptides. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(1): 39.
- VESPA, G. N. R., F. Q. CUNHA and J. S. SILVA. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.* 62: 5177.
- VILLALBA, R., G. FORNES, M. A. ALVAREZ, J. ROMAN, V. RUBIO, M. FERNANDEZ, J. M. GARCIA, M. VINALS and A. TORRES. 1992. Acute Chagas' disease in a recipient of bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin. Infect. Dis.* 14: 594.
- VRAY, B., P. DE BATSELIER, A. OUASSI and Y. CARLIER. 1991. *Trypanosoma cruzi* but not *Trypanosoma brucei* fails to induce a chemiluminescent signal in a macrophage hybridoma cell line. *Infect. Immun.* 59: 3303.
- WEITZ, B. 1960. The properties of some antigens of *Trypanosoma brucei*. *J. Gen. Microbiol.* 23: 589.
- WIDMER, G., C. J. MARINKELLE, F. GUHL and M. A. MILES. 1985. Isozyme profiles of *Trypanosoma cruzi* stocks from Colombia and Ecuador. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79: 253.
- WINCKER, P., C. BRITO, J. BORGES PEREIRA, M. A. CARDOSO, W. OELEMANN and C. MOREL. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51(6): 771.
- WIRTH, J. J., F. KIERSZENBAUM and A. ZLOTNIK. 1989. Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunol.* 66: 296.
- WRIGHTSMAN, R. A., M. J. MILLER, J. L. SABORIO and J. E. MANNING. 1995. Pure paraflagellar rod protein protects mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect. Immun.* 63: 122.
- ZELEDON, R. and C. PONCE. 1974. A skin test for the diagnosis of Chagas' disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 68: 414.
- ZELEDON, R., J. C. P. DIAS, A. BRITTA-SALAZAR. 1988. Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist?. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21: 15.
- ZWEERINK, H. J., H. D. WESTON, O. F. ANDERSEN, S. S. GARBER and E. C. HAYES. 1984. Immunity against infection with *Trypanosoma cruzi* in mice correlates with presence of antibodies against three tryptomastigote polypeptides. *Inf. Immun.* 46: 826.

XII. TABLE DE MATIERES

	Page
RESUME.....	11
I. INTRODUCTION.....	12
II.GENERALITES.....	15
II. 1. Definition.....	1 6
II. 2. Le parasite.....	1 6
II. 2. 1. Cycle biologique.....	1 6
II. 2. 2. Hétérogénéité des souches de Trypanosoma cruzi.....	17
II. 3. Les vecteurs.....	1 9
II. 3. 1. Répartition géographique.....	1 9
II. 4. Epidémiologie.....	2 1
II. 4. 1. Distribution géographique et prevalence de l'infestation humaine.....	21
II. 4. 2. Modes de transmission.....	2 2
II. 4. 3. Transmission par l'insecte vecteur.....	24
II. 4. 4. Transmission transfusionnelle.....	24
II. 4. 5. Transmission congénitale.....	25
II. 4. 6. Transmission au cours de l'allaitement maternel.....	25
II. 4. 7. Transmission a l'occasion d'un greffe d'organe.....	26
II. 4. 8. Transmission par voie orale.....	26
II. 4. 9. Infestation accidentelle au laboratoire.....	26

III. ASPECTS CLINIQUES.....	28
III. 1. Phase aiguë.....	29
III. 2. Phase indéterminée.....	31
III. 3. Phase chronique.....	31
III. 4. Diagnostic.....	34
III. 4. 1. Méthodes parasitologiques.....	34
III. 4. 2. Méthodes sérologiques.....	35
III. 4. 3. Méthodes moléculaires.....	37
III. 5. Traitement.....	37
III. 5. 1. Evaluation de la guérison.....	38
IV. IMMUNOLOGIE DE L'INFECTION CHAGASIQUE.....	40
IV. 1. Résistance naturelle.....	41
IV. 2. Réponse immunitaire au cours de l'infection par T.cruzi.....	41
IV. 3. Immunité à médiation humorale.....	42
IV. 4. Mécanisme d'action des anticorps.....	42
IV. 5. Immunité à médiation cellulaire.....	43
IV. 5. 1.Rôle des lymphocytes T.....	44
IV. 5. 2.Rôle du macrophage.....	47
V. MECANISMES D'ECHAPPEMENT ET IMMUNOPATHOLOGIE.....	48
V. 1. Mécanismes d'échappement.....	49
V. 2. Immunopathologie.....	51
V. 3. Activation polyclonale des lymphocytes T.....	51

V. 2. 2. Activation polyclonale des lymphocytes B.....	52
V. 2. 3. Pathologie chronique et lymphocytes T autoreactifs.....	52
V. 3. Réactivité croisée entre des antigènes parasitaires et des composants de l'hôte.....	53
 VI. LES ANTIGENES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> POUVANT JOUER UN ROLE DANS L'INDUCTION D'UNE IMMUNITE PROTECTRICE.....	
VI. 1. Les antigènes à potentialités vaccinantes	56
 VII. LA MALADIE DE CHAGAS DANS L'EQUATEUR.....60	
VII. 1. Historique et distribution géographique.....	61
VII. 2. Le parasite.....	61
VII. 3. Les vecteurs.....	61
VII. 4. Réservoir animaux.....	63
VII. 5. Infestation humaine.....	63
 VIII. RESULTATS.....65	
 VIII. I. TRAVAUX PERSONNELS.....66	

Article 1. Amelioration de la spécificité de l'identification de
Trypanosoma cruzi par la reaction de Polymerase en Chaine (PCR)
en utilisant un oligonucleotide dérivé de la sequence amino-terminale
de la protéine Tc24.....

67

Article 2. Un antigène recombinant de <i>Trypanosoma cruzi</i> utile pour la surveillance du traitement de la maladie de Chagas: rapport concernant deux cas en Equateur.....	68
Article 3. Utilisation d'une protéine recombinante de 24 kDa de <i>Trypanosoma cruzi</i> pour suivre la guérison de la maladie de Chagas humaine.....	69
Article 4. Une protéine recombinante immunoprotectrice vis-à-vis de <i>Trypanosoma cruzi</i> induit une profil d'interleukines de type Th1.....	70
VIII. 2. RESULTATS NON PUBLIES.....	71
VIII. 2. 1. Enquête séro-épidémiologique de la maladie de Chagas dans une région endémique en Equateur.....	72
VIII. 2. 2. Reconnaissance de la protéine recombinante de <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i> de 24 kDa par les sérums chagasiques de patients colombiens, bresiliens et boliviens.....	77
IX. DISCUSSION.....	82
X. PERSPECTIVES.....	89
XI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	91
XII. TABLE DE MATIERES.....	108