

Interrelations immuno-taxonomiques de *T. brucei*, *T. rhodesiense* et *T. gambiense* ⁽¹⁾

par D. LE RAY, D. AFCHAIN, J. JADIN, A. CAPRON et L. FAMEREE

Département de Protozoologie, Institut de Médecine Tropicale Prince Léopold,
Nationaalestraat 155, B-2000 Antwerpen,

Service d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Faculté de Médecine,
F. 59 - Lille

Institut National de Recherches Vétérinaires, Groeselenberg 99, B-1180, Bruxelles

Résumé

Les structures antigéniques hydrosolubles de cinq souches représentatives de *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* et *T. gambiense* ont été analysées en immuno-électrophorèse et en double diffusion au moyen d'hyper-immunsérums objectivant un minimum de vingt-cinq composants antigéniques.

T. brucei et *T. rhodesiense* possèdent la même structure antigénique. Cette structure diffère significativement de la structure de *T. gambiense*.

Ces résultats suggèrent l'existence de deux espèces distinctes (*T. brucei* et *T. gambiense*) au sein du complexe *brucei*.

Summary

The saline soluble antigenic structures from five known strains of *Trypanosoma brucei*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense* have been determined by means of immuno-electrophoretic and double diffusion techniques. The presence of at least twenty-five antigenic components has been demonstrated.

T. brucei and *T. rhodesiense* share a similar antigenic structure. Unlike previous trypanosomes, *T. gambiense* shows a significantly different antigenic structure.

The results indicate that two distinct species (e.g. *T. brucei* and *T. gambiense*) exist in the *brucei* complex.

(1) Manuscrit déposé le 29 mars 1971.

Bien que les trypanosomes du complexe *brucei-rhodesiense-gambiense* soient décrits depuis le début de ce siècle, leurs interrelations taxonomiques et épidémiologiques restent discutées.

Du point de vue épidémiologique, *T. brucei* se présente comme un parasite des mammifères d'Afrique tropicale autres que l'homme (Hoare, 1964). *T. gambiense* est un parasite humain dépourvu de réservoir animal connu (Lapeyssonnie, 1969). *T. rhodesiense*, parasite humain limité à l'Afrique orientale, est également l'agent d'une zoonose récemment définie (Heisch et coll., 1958 ; Onyango et coll., 1966). Dans ce cas, l'inoculation à l'homme est utilisée afin de distinguer *T. brucei* de *T. rhodesiense*.

Cependant, l'étude d'un nombre étendu de souches montre que *T. brucei*, *T. rhodesiense* et *T. gambiense* ne peuvent pas être distingués aux points de vue morphologique (Lester, 1933), ultrastructurel (Rudzinska et Vickerman, 1968) et biologique (Weinman, 1968).

Du point de vue taxonomique, ces trois espèces ont été maintenues avec réserves par la classification récente de Hoare (1966), *T. rhodesiense* étant toutefois souvent considéré comme synonyme de *T. brucei* (Wenyon, 1926). Actuellement, à la suite d'une étude d'Ormerod (1967), se renforce la tendance à n'envisager qu'une seule espèce *T. brucei*, qui serait soit composée de différentes souches, soit composée de deux sous-espèces *T.b. brucei* et *T.b. gambiense*, *T. rhodesiense* étant considéré comme un nosodème virulent de *T.b. gambiense* (Hoare, 1970).

Cette situation confuse, basée sur l'étude de caractères morphologiques et épidémiologiques, recommandait de s'adresser à des critères plus proches de l'expression génétique.

Les études immunotaxonomiques (ou immunogénétiques) (Mohagheghpour et Leone, 1969) reposent sur le fait que la structure des protéines est l'expression relativement directe de l'action des gènes (Yanofski *et al.*, 1964). La valeur taxonomique de l'analyse immuno-électrophorétique est actuellement bien établie (Gell, 1968), particulièrement en Parasitologie (Biguet et coll., 1962 ; Capron et coll., 1968).

Nous avons donc choisi d'étudier à l'aide de la méthode immuno-électrophorétique la manifestation antigénique de la structure macromoléculaire des trypanosomes du complexe *brucei*. Dans ce travail préliminaire, les résultats obtenus suggèrent, au niveau des composants antigéniques objectivés, l'existence d'une isologie immunochimique complète entre *T. brucei* et *T. rhodesiense*, qui se distinguent de *T. gambiense* par un minimum de deux composants.

Matériel et méthodes.

Nous avons analysé au moyen d'hyperimmunsérums (HIS) anti-*T. brucei* les extraits antigéniques hydrosolubles des formes de culture de cinq souches.

a) SOUCHES.

1. *T. brucei* EATRO 1125 : souche isolée en Ouganda à partir de *Tragelaphus*

scriptus ; l'inoculation à un volontaire humain est restée négative (A. J. Wilson, communication personnelle). Cette souche constitue notre souche de référence.

2. *T. brucei* EATRO 999 : souche isolée d'un Zébu durant l'épidémie d'Alego, Kenya, en 1964 ; l'inoculation à un volontaire humain est restée négative (EATRO, 1967).

3. *T. rhodesiense* EATRO 906 : souche isolée d'un Zébu durant l'épidémie d'Alego et infectante pour l'homme (Onyango et coll., 1966 ; EATRO, 1967).

4. *T. rhodesiense* MRC 169 : souche isolée d'un cas humain de la région de Nyanza, Kenya, en 1968 (E. Goedbloed, communication personnelle).

5. *T. gambiense* Eliane : souche isolée par Vaucel en 1952, à partir d'une malade contaminée en Côte d'Ivoire (Fromentin, 1971).

b) ANTIGÈNES ET ANTISÉRUMS.

L'obtention d'extraits hydrosolubles à partir de formes de culture en milieu monophasique GLSH (Jadin et Le Ray, 1969), celle d'HIS produits chez le lapin ainsi que l'analyse immuno-électrophorétique ont été réalisées selon un protocole précédemment décrit (Afchain et Capron, 1969 ; Le Ray, 1969).

1. A été retenu comme HIS de référence et utilisé dans les épreuves d'épuisement un HIS (n° 7) révélant un minimum de 25 composants antigéniques parasitaires dans l'extrait homologue de *T. brucei* EATRO 1125.

2. Vu l'importance des réactions croisées entre les souches étudiées, l'épreuve d'épuisement par les extraits antigéniques hétérologues a été menée par saturation progressive contrôlée en double diffusion selon la méthode de Wright (1959), toutefois sans dilutions des solutions d'antigène et d'antisérum.

3. Après épuisement, les réactions de double diffusion ont été effectuées selon la technique d'Abelev (1960).

Résultats.

1. L'analyse de l'extrait hydrosoluble de *T. brucei* EATRO 1125 par l'HIS homologue 7 permet d'objectiver 25 composants antigéniques de nature spécifiquement parasitaire (photo 1).

Au niveau des différents lots d'extraits préparés au cours de trois ans de culture, la stabilité et la reproductibilité de cette structure antigénique a pu être vérifiée par les antisérums obtenus chez neuf lapins.

2. L'HIS 7 opposé aux extraits hydrosolubles de *T. brucei* EATRO 999, *T. rhodesiense* EATRO 906 et *T. rhodesiense* MRC 169 permet d'objectiver une structure antigénique apparemment isologue de la structure de *T. brucei* EATRO 1125.

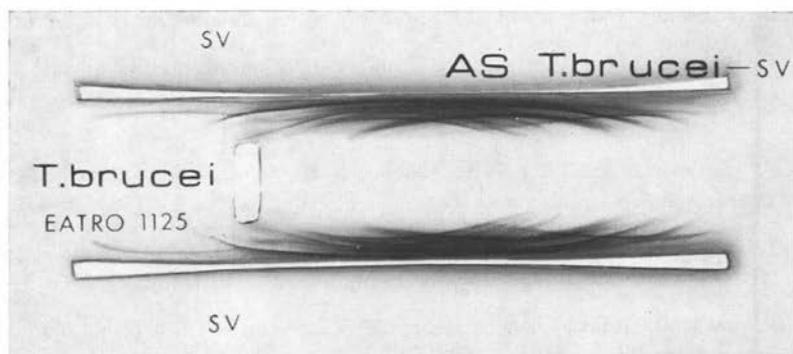


FIG. 1. — Immuno-électrophorégramme de *T. brucei* Eatro 1125 révélé par un hyper-immunsérum homogène (HIS 7). L'HIS a été préalablement épuisé à l'aide de sérum de veau (SV) afin d'éliminer les arcs de précipitation dus aux composants antigéniques présents dans le milieu de culture. Après précipitation, la moitié inférieure de la lame a été incubée dans une solution de citrate de sodium à 5 % afin de dissoudre d'éventuels complexes du type substance C-protéine C-réactive

Après épuisement de l'HIS par saturation au moyen des extraits hétérologues, aucun anticorps précipitant dirigé contre l'extrait homogène n'est objectivé (photos 2, 3 et 4).

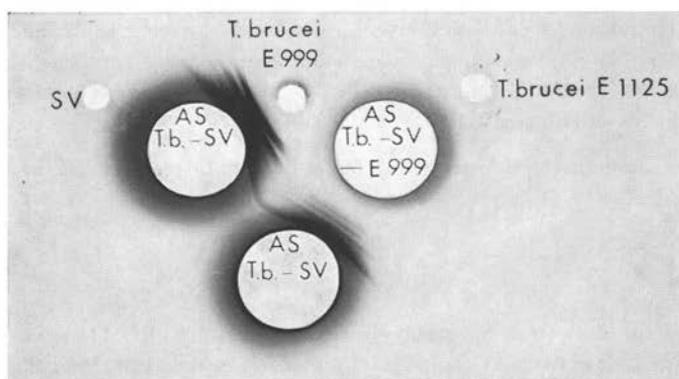


FIG. 2. — L'HIS anti-*T. brucei* Eatro 1125 épuisé par l'extrait hydrosoluble hétérologue de *T. brucei* Eatro 999 ne révèle plus aucun composant antigénique de la souche homogène. L'HIS présent dans le puits inférieur permet d'objectiver l'excès d'antigène présent dans l'HIS épuisé.

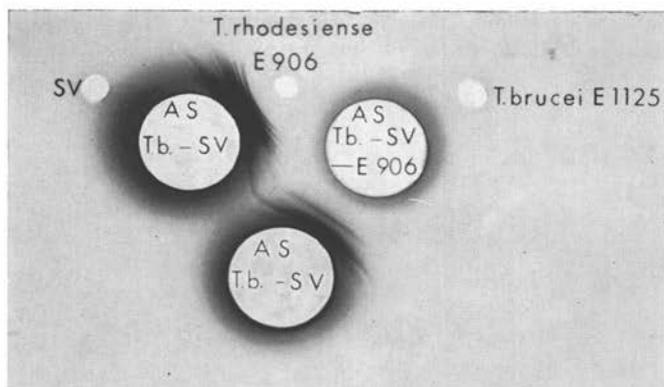


FIG. 3. — L'HIS anti-*T. brucei* Eatro 1125 épuisé par *T. rhodesiense* Eatro 906 d'origine bovine ne révèle plus aucun composant de la souche homologue.

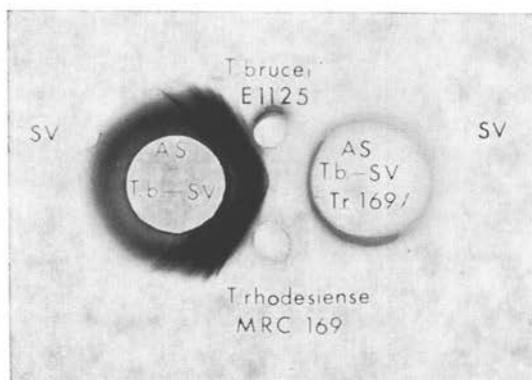


FIG. 4. — L'HIS anti-*T. brucei* Eatro 1125 épuisé par *T. rhodesiense* MRC 169 d'origine humaine ne révèle plus aucun composant de la souche homologue.

L'épreuve de saturation progressive ne permet d'observer aucun phénomène de co-précipitation important.

3. L'HIS 7 opposé à l'extrait hydrosoluble de *T. gambiense* Eliane permet d'objectiver une structure antigénique très voisine de la structure de *T. brucei* EATRO 1125. Néanmoins, deux arcs de précipitation au minimum ne paraissent pas se retrouver chez *T. gambiense*.

Après épuisement au moyen de l'extrait de *T. gambiense*, l'HIS anti-*T. brucei* détermine encore deux à quatre arcs de précipitation vis-à-vis de l'extrait homologue de *T. brucei* EATRO 1125, de même que vis-à-vis de *T. rhodesiense* EATRO 906 (photo 5).

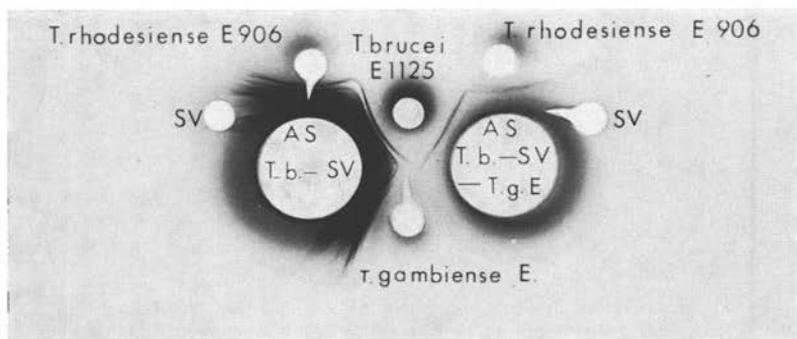


FIG. 5. — L'HIS anti-*T. brucei* Eatro 1125 épuisé par *T. gambiense* Eliane révèle encore deux à quatre composants antigéniques de la souche homologue, atténués par vraisemblablement un phénomène de co-précipitation. Ces composants sont partagés par *T. brucei* Eatro 1125 et *T. rhodesiense* Eatro 906; l'absence d'éperon paraît indiquer l'identité de leurs déterminants antigéniques

Ceci paraît confirmer le fait que, par rapport à *T. gambiense*, *T. brucei* possède en propre deux composants antigéniques au moins. De plus, ces deux composants sont communs à *T. brucei* et à *T. rhodesiense*, ce qui souligne encore la complète isologie de ces derniers au niveau des arcs de précipitation objectivés.

Discussion.

Nos résultats confirment, précisent et développent les observations de Seed (1964) qui avait constaté au niveau des antigènes agglutinants des formes de culture : a) leur stabilité ; b) l'identité de *T. brucei* et de *T. rhodesiense* ; c) une légère différence entre ces deux trypanosomes et *T. gambiense*.

1. Notre étude permet de constater une complète isologie* des structures antigéniques hydrosolubles de deux souches de *T. brucei* d'origine géographique distincte.

Ce fait confirme, au niveau des antigènes des formes de culture, l'existence d'une structure antigénique stable et commune aux différentes souches de *T. brucei*.

(*) Il faut souligner que, étudiant ici une structure antigénique complexe, l'isologie dont il est question concerne les différents composants antigéniques de cette structure (tels qu'ils sont objectivés par des arcs de précipitation distincts) et non chacun des différents déterminants antigéniques que peuvent porter ces composants.

Il serait d'ailleurs malaisé de pousser la comparaison taxonomique jusqu'au niveau de ces déterminants. En effet, au sein d'une même structure antigénique, chaque composant est constitué par une famille de protéines, famille antigéniquement homogène dont les membres peuvent néanmoins posséder, en propre, certains déterminants (Tailliez et Korach, 1970).

Ce fait est à mettre en regard de l'absence fréquente de réactions croisées observée au niveau des agglutinogènes des formes sanguicoles chez des souches même géographiquement coexistantes (Gray, 1966 ; D. M. Minter, communication personnelle). Cela suggère que ces antigènes de surface représentent en fait une famille d'antigènes spécialisée dans la variabilité antigénique (et donc dans la relation hôte-parasite), famille non représentative de la personnalité spécifique du trypanosome.

2. De même, nous observons une isologie immunochimique complète entre d'une part *T. brucei* et d'autre part *T. rhodesiense* d'origine humaine et d'origine animale. Cette isologie suggère avec grande probabilité l'existence d'une seule espèce génétiquement homogène (Florkin, 1966), sous réserve de la comparaison des structures des trypanomastigotes sanguicoles.

Ces résultats constituent la première confirmation expérimentale, *pro parte*, de l'hypothèse épidémiologique selon laquelle existe une seule espèce *T. brucei* dont les populations peuvent différer par certains caractères nosologiques (Wenyon, 1926 ; Hoare, 1966 ; Ormerod, 1967).

La confirmation de cette homologie génétique conduirait à considérer les différentes populations de *T. brucei* comme possédant en réalité les mêmes potentialités biologiques. Les différences observées ne concernent finalement que la qualité des relations hôte vertébré-parasite. Or, ces relations, de nature encore mal connue mais essentiellement immunologique, pourraient au moins en partie trouver leur explication dans les phénomènes d'immuno-adaptation récemment observés par Capron (Capron et coll., 1969 ; Capron, 1970).

3. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous observons entre d'une part *T. brucei-T. rhodesiense* et d'autre part *T. gambiense* une différence de structure concernant un minimum de deux composants antigéniques.

Par sa qualité, cette différence immunochimique paraît pouvoir être considérée comme caractéristique d'une différence d'espèce :

a) quatre souches du complexe *T. brucei-T. rhodesiense*, d'origines géographique et nosologique différentes, présentent une isologie absolue ;

b) chez les Métazoaires parasites, dans l'ordre des Nématodes *Ascaris suum*, *A. lumbricoïdes* et *Parascaris equorum* ne diffèrent que par un à deux composants antigéniques ; dans l'ordre des Cestodes *Taenia saginata* et *T. solium* diffèrent par un composant ; dans l'ordre des Trématodes, dont la structure immunochimique générale est davantage diversifiée, *Schistosoma mansoni* et *S. hematobium* de même que *Fasciola hepatica* et *F. gigantica* diffèrent par deux composants (Capron, Biguet, Vernes et Afchain, 1968).

Conclusions.

Au niveau de leur forme de culture, *T. brucei* et *T. rhodesiense* présentent une même structure antigénique. Cette structure est significativement différente de la structure de *T. gambiense*. Ces résultats suggèrent l'existence de deux espèces distinctes : *T. brucei* et *T. gambiense*.

Ce premier apport expérimental à la solution d'un problème taxonomique particulièrement complexe demande à être confirmé. Il le sera, dans le cadre de nos recherches, par l'analyse d'un plus grand nombre de souches au moyen d'hyperimmunsérums homologues.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Dr R. J. Onyango et M. A. J. Wilson (Eatro, Tororo, Uganda) ainsi que le Dr E. Goedbloed (MRC, Nairobi, Kenya) de l'obligeance avec laquelle ils nous ont envoyé à diverses reprises des souches bien caractérisées. Nous exprimons également notre reconnaissance au Dr J. Bafort (IMT, Anvers) pour ses critiques constructives lors de la rédaction du présent travail.

Bibliographie

- ABELEV (G. I.), 1960. — Modification of the agar precipitation method for comparing two antigen-antiserum systems. *Folia biol.* (Praha), 6, 56-58.
- AFCHAIN (D.) et CAPRON (A.), 1969. — Etude préliminaire des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*. Applications à la trypanosomiase expérimentale de la souris. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 269, série D, 272-274.
- CAPRON (A.), 1970. — L'antigène parasitaire. Structure et fonction. *J. Parasit.*, 56, Second International Congress of Parasitology, Section II, Part. 3, pp. 515-521.
- CAPRON (A.), BIGUET (J.), VERNES (A.) et AFCHAIN (D.), 1968. — Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. *Path. Biol.*, 16, 121-138.
- CAPRON (A.), BONNANGE (M.) et MAUROIS (P.), 1969. — Immunological aspects of host-parasite relationships in human and experimental filariasis. *Conference on Parasitic Diseases*, Mitt Washington D.C., August 4-6, 1969.
- EATRO, 1967. — *East African Trypanosomiasis Research Organisation Report 1966*, pp. 14-19.
- FLORKIN (M.), 1966. — *Aspects moléculaires de l'adaptation et de la phylogénie*, Paris, Masson, pp. 9-21.
- FROMENTIN (H.), 1971. — Contribution à l'étude comparée des besoins nutritifs chez diverses espèces du genre *Trypanosoma*. Possibilités et limites de la culture à 27 °C en milieu semi-synthétique liquide. *Thèse Sciences (Etat)*, Paris, p. 19.
- GELL (P. G. H.), 1968. — Serotaxonomy of vertebrate soluble proteins. in J. G. Hawkes ed., *Chemotaxonomy and Serotaxonomy*, London, Academic Press, 67-76.
- GRAY (A. R.), 1966. — The antigenic relationship of strains of *Trypanosoma brucei* isolated in Nigeria. *J. gen. Microbiol.*, 44, 263-271.
- HEISCH (R. B.), Mc MAHON (J. P.) et MANSON-BAHR (P. E. C.), 1958. — The isolation of *Trypanosoma rhodesiense* from a bushbuck. *Brit. med. J.*, 2, 1203-1204.
- HOARE (C. A.), 1964. — Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes X. Revision of the systematics. *J. Protozool.*, 11, 200-207.
- HOARE (C. A.), 1966. — The classification of mammalian trypanosomes. *Ergebn. Mikrobiol.*, 39, 43-57.
- HOARE (C. A.), 1970. — Systematic description of the mammalian trypanosomes of Africa. in H. W. Mulligan, *The African Trypanosomiasis*, London, Allen and Unwin, pp. 50-51.

- JADIN et LE RAY (D.), 1969. — Acquisitions récentes dans les techniques de culture des Trypanosomes africains. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 49, 331-340.
- LAPEYSSONNIE (L.), 1969. — Existence possible d'un réservoir de virus animal dans la trypanosomiase humaine africaine à *T. gambiense*. Réflexions épidémiologiques et conséquences pratiques. *Bull. Soc. Path. exot.*, 62, 335-343.
- LE RAY (D.), 1969. — Analyse immuno-électrophorétique des formes de culture de *Trypanosoma brucei*. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 163, 2783-2787.
- LESTER (H. M. O.), 1933. — The characteristics of some Nigerian strains of the polymorphic trypanosomes. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 29, 361-395.
- MOHAGHEHPUR (N.) et LÉONE (C. A.), 1969. — An immunologic study of the relationships of non-human primates to man. *Comp. Biochem. Physiol.*, 31, 437-452.
- ONYANGO (R. J.), VAN HOEVE (K.) et DE RAADT (P.), 1966. — The epidemiology of *Trypanosoma rhodesiense* sleeping sickness in Alego location, Central Nyanza, Kenya. I. Evidence that cattle may act as reservoir hosts of trypanosomes infective to man. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 60, 175-182.
- ORMEROD (W. E.), 1967. — Taxonomy of the sleeping sickness trypanosomes. *J. Parasit.*, 53, 824-830.
- RUDZINSKA (M. A.) et VICKERMAN (K.), 1968. — The fine structure. in D. Weinman et M. Ristic. *Infectious blood diseases of man and animals*, New York, Academic Press, vol. I, p. 287.
- SEED (J. R.), 1964. — Antigenic similarity among culture forms of the *brucei* group of trypanosomes. *Parasitology*, 54, 593-596.
- TAILLIEZ (R.) et KORACH (S.), 1970. — Les antigènes de *Fasciola hepatica*. I. Isolement et caractérisation d'un antigène spécifique du genre. *Ann. Inst. Pasteur*, 118, 61-78.
- WEINMAN (D.), 1968. — The human trypanosomiasis. in D. Weinman et M. Ristic, *Infectious blood diseases of man and animals*, New York, Academic Press, vol. II, pp. 104-110.
- WENYON (C. M.), 1925. — *Protozoology*, London, Ballière, Tindall et Cox, vol. I, p. 539-552.
- WRIGHT (S. T. C.), 1959. — A quantitative serum-agar technique. *Nature (Lond.)*, 183, 1282-1283.
- YANOFSKY (C.), CARLTON (B. C.), GUEST (J. R.), HELINSKI (D. R.) et HENNING (U.), 1964. — On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 51, 266-272.
-