



Mise en évidence et caractérisation d'une spécificité anticorps "TcCRA" chez l'homme

Esber Saba

► **To cite this version:**

Esber Saba. Mise en évidence et caractérisation d'une spécificité anticorps "TcCRA" chez l'homme. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2014. Français. <NNT : 2014STET009T>. <tel-01316533>

HAL Id: tel-01316533

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01316533>

Submitted on 17 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

De l'université Jean Monnet de Saint-Etienne

Délivrée par

L'école Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé (ED SIS 488)

Pour l'obtention

Du diplôme de doctorat

Présentée et soutenue publiquement le 29/10/2014

Par M. Esber SABA

Mise en évidence et caractérisation d'une spécificité anticorps «TcCRA» chez l'homme

Après l'avis de :

Pr. Henri AGUT

Dr. Gláucia PARANHOS-BACCALA

Devant la commission d'examen formée de :

Pr. Bruno POZZETTO

(Directeur de thèse)

Dr. Gláucia PARANHOS-BACCALA

(Rapporteur)

Pr. Henri AGUT

(Rapporteur)

Dr. Maan ZREIN

(Co-directeur de thèse)

Pr. Mauricette MICHALLET

(Examineur)

Pr. Philippe VANHEMS

(Président)

Pr. Thomas BOURLET

(Co-directeur de thèse)

Remerciements

Remerciements

Je voudrais exprimer mon immense gratitude à tous ceux qui ont d'une manière ou d'une autre contribué à l'achèvement de ce travail et qui ont su m'apporter leur soutien

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres de jury de thèse qui ont eu l'amabilité de lire et de juger ce manuscrit de thèse. Je remercie spécialement Mme le Dr Gláucia Paranhos-Baccalà et le Pr Henri Agut pour avoir accepté de rapporter ce travail. Je tiens à remercier également les autres évaluateurs de ce jury, Mme le Pr. Mauricette MICHALLET, le Pr. Philippe Vanhems et le Pr. Thomas Bourlet. Par la même occasion, je remercie le Pr. Bruno Pozzetto pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je te remercie pour ton écoute attentive, tes conseils et le regard critique que tu as posé sur mon travail tout au long de ma thèse.

Merci est un bien petit mot en comparaison de tout ce que je dois à Maan. Sur le papier, Maan Zrein, tu es un co-directeur de thèse mais dans la vraie vie, tu es bien plus. Je te remercie pour toute la confiance que tu m'as accordée, pour l'entière liberté et autonomie dont j'ai pu jouir dans mes choix et dans la gestion de mon travail. Tu m'as transmis, jour après jour, ton expérience dans la recherche, le travail et la vie. Par ton soutien, ta disponibilité, tes précieux conseils, tu m'as permis d'achever ce travail. Je souhaite à chaque thésard un tel encadrant.

Merci également à l'ensemble des membres des équipes du GIMAP, EA3064, de l'Université de Saint-Etienne et du Service d'Epidémiologie et de Santé publique du CHU de Lyon.

Ces remerciements seraient incomplets si je ne mentionnais pas le soutien de l'ensemble de l'équipe d'Infynity-Biomarkers. Lucie, Marie-Laure, Elodie, Hanaa

Remerciements

et Maïssam. Merci pour votre contribution au bon déroulement de ce travail, pour votre aide et votre bonne humeur quotidienne.

Toute ma gratitude à mes amis, Dan, Nagham, Imtiaz, Olimpia, Sami, Majd et les vétérinaires, Renault et Sandra, Boutros, Charbel, George, Romuald et leurs familles. Votre amitié m'est précieuse !

Enfin, merci à toi Mona, ma moitié, mon amoureuse, merci pour ta patience, ton soutien, merci d'être là, merci d'être toi. Add l deni ..

Je voudrais terminer ces quelques mots en dédiant ce travail à toute ma famille au Liban et à mes parents Samir et Amal. Vous avez toujours été des exemples d'humilité, de simplicité et de courage pour moi. Vous vous êtes battus pour que je puisse faire les études que vous n'avez pas eu la chance de faire. J'espère aujourd'hui que vous êtes fiers de moi comme je vous suis reconnaissant pour cela et pour bien plus encore.

Contenu

Contenu

Introduction générale	16
Données bibliographiques.....	20
Chapitre 1 : Biomarqueurs	21
1-Généralités sur les biomarqueurs. Définition et classification.	21
2-Identification d'un biomarqueur.....	23
3-Définition de valeurs anormales	25
4-Anticorps en tant que biomarqueurs	27
Chapitre 2 : <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1- Trypanosomiase américaine	30
1.1-Le parasite	31
1.2-Le vecteur	32
1.3-Le cycle parasitaire	32
1.4-Répartition géographique.....	34
1.4.1-Dans les Amériques	34
1.4.2-En Europe	37
1.4.3-En France métropolitaine.....	37
1.5-Transmission.....	38
2-Physiopathologie de la maladie de Chagas	39
2.1-Phase aiguë.....	40
2.2-Phase indéterminée.....	41
2.3-Phase chronique	41
2.3.1-Persistance du parasite	42
2.3.2-Auto-immunité	43
2.4-Traitement	46
2.5-Diagnostic	47
Travaux originaux.....	52
Chapitre 1 : La découverte deTcCRA.....	52
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	56
1-Collections de sérums étudiés.....	56
1.1-Donneurs de sang en France (EFS)	56
1.2- Sujets séropositifs pour HIV-1 (HIV)	57
1.3-Patients infectés par <i>T. cruzi</i> (REDS)	57
1.4- Enfants hospitalisés (Pédiatrie)	57
1.5-Patients de services du CHU de Lyon (Virologie).....	57
1.6-Cohorte « PROOF » de l'Université de Saint-Etienne (PROOF).....	58
1.7-Patients greffés de moelle du CHU de Lyon (Grefe).....	60

Contenu

2-Tests sérologiques.....	61
2.1-Tests ELISA.....	61
2.2- Tests d'immunofluorescence indirecte	63
2.3-Test de Western-blot à partir d'extraits de protéines de T. cruzi	64
3-Obtention de la spécificité TcCRA.....	64
3.1-Purification par immuno-affinité de TcCRA.....	64
3.2-Protocoles immunisation et de production d'anticorps anti-TCSP	65
3.2.1-Anticorps monoclonaux de souris anti-TCSP.....	65
3.2.2-Anticorps polyclonaux anti-TCSP	65
4-Recherches <i>in silico</i>	66
4.1-UniProt	66
4.2-PEP-FOLD	66
5-Analyse statistique	66
Chapitre 3 : Résultats	67
<u>Première partie : caractérisation de la spécificité TcCRA</u>	
1-Observations chez les personnes infectées par HIV	67
2-Réactivité croisée de TcCRA.....	70
3- Séroprévalence de TcCRA en fonction de l'âge et de sexe	73
4-Distribution de l'intensité de la réactivité TcCRA dans une population de donneurs de sang.....	74
5- TcCRA et autres sérologies virales.....	76
6-Recherches <i>in silico</i>	78
6.1-Homologie de séquence	78
6.2-Recherche de l'épitope de TcCRA.....	82
7-Potentiel auto-immun de TcCRA.....	85
Article 1 (Plos one 2013, Vol 8, e74493)	93
<u>Deuxième partie : évaluation de TcCRA en greffe de moelle osseuse</u>	
Article 2	102
Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion.....	125
Références bibliographiques.....	134

Listes des figures et des tableaux

Figures

Figure 1. Différents statuts réglementaires d'un biomarqueur relatifs aux étapes du processus de qualification.....	24
Figure 2. Méthodes appliquées pour la définition de valeurs anormales de biomarqueurs.....	26
Figure 3. Différence entre l'approche générale de développement des biomarqueurs et l'étude de marqueur TcCRA.....	28
Figure 4. Formes trypomastigotes de <i>T.cruzi</i> sur un frottis sanguin (Dr J.-F. Pays).....	31
Figure 5. Cycle de la trypanosomiase américaine.....	34
Figure 6. Répartition géographique des estimations des cas d'infection à <i>T. cruzi</i>	37
Figure 7. Réactivité des sérums de 14 patients atteints de leishmaniose viscérale sur des westerns-blots de <i>T. cruzi</i>	50
Figure 8. Alignement de la protéine ribosomale 60S de différentes sous-espèces de <i>T. cruzi</i> avec le motif répété appelé 69/70 et l'antigène TCSP.....	52
Figure 9. Diagrammes en boîtes à moustache représentant les résultats du dosage de TcCRA sur des sérums de différents groupes de sujets. Une forte réactivité est observée chez les groupes HIV+ et Chag+ (infectés par <i>Trypanosoma cruzi</i>).	54
Figure 10. Déroulement de l'étude PROOF sur les trois périodes 0,5 et 10 ans entre les années 2001 et 2011. Maladies, facteur de risque et sero-incidence sont les paramètres qui seront évalués par le dosage de TcCRA dans cette population.	58
Figure 11. Schéma du processus d'allogreffe de CSH et le programme des prélèvements pour le test de TcCRA.....	59
Figure 12. Reproductibilité du test ELISA pour le dosage de TcCRA. Une faible variation intra- (1%) et inter-test (3%) est observée.	63
Figure 13. Distribution de la spécificité TcCRA dans trois populations différentes : donneurs de sang (BD-Eu), personnes infectées par HIV (HIV+) ou par <i>T. cruzi</i> (Tryp+).....	68
Figure 14. Immuno-réactivité de TcCRA purifié par affinité (B) par rapport à un témoin négatif (A) sur les épimastigotes de <i>T. cruzi</i> comme montré par microscopie à fluorescence avec un grossissement 60x.	71
Figure 15. Profil de reconnaissance de TcCRA (1) et d'un sérum de patient infecté par <i>T. cruzi</i> (2) sur un western blot d'extrait total de protéines de parasite.....	72

Listes des figures et des tableaux

Figure 16. Séroprévalence cumulative de TcCRA en fonction de l'âge (intervalles de 1 an).....	73
Figure 17. Distribution (A) et titrage (B) de TcCRA dans une population de donneurs de sang.	75
Figure 18. Alignement entre la région répétée Q7M3W1 et la lipoprotéine V5AYY3.....	79
Figure 19. Alignement entre la région répétée Q7M3W1 et la protéine tégumentaire O39779 des virus herpès équins 1, 4 et 9.....	79
Figure 20. Classification PIRSF0033516 des protéines apparentés à la protéine du gène 22 du virus varicelle-zona.	81
Figure 21. Similarité entre le résidu TCSP de <i>T. cruzi</i> et les peptides IBAG5 dérivé de <i>T. gondii</i> (A), IBAG10 dérivé d'EHV-1 (B) et IBAG15 dérivé de CeHV-1(C).	82
Figure 22. Alignement entre TCSP et IBAG20.....	82
Figure 23. Test de compétition réciproque vis-à-vis de trois peptides différents TCSP, IBAG10 et IBAG20. Le test effectué avec des sérums de donneurs de sang présentant deux profils différents	83
Figure 24. Prédiction de la structure de l'antigène TCSP de <i>T. cruzi</i> d'après le logiciel PEP-FOLD. Le logiciel propose une structure secondaire formée par deux hélices α	84
Figure 25. Titrage des anticorps TcCRA biotinylé et non biotinylé.....	86
Figure 26. Protocole appliqué dans le développement des anticorps monoclonaux de souris anti-TCSP.	87
Figure 27. Coupes de tissus cardiaques des souris utilisées pour la production des anticorps monoclonaux anti-TCSP.....	88
Figure 28. Comparaison entre la réactivité de TcCRA humain purifié par affinité et la réactivité des anticorps de lapin après immunisation par TCSP.	89
Figure 29. Réactivité en western-blot de différents anticorps vis-à-vis d'extraits totaux de protéines de <i>T. cruzi</i>	90
Figure 30. Validation du marquage sur des coupes congelées de <i>T. cruzi</i>	91
Figure 31. Marquage de différents tissus humains avec un sérum hyperimmun anti-TCSP de lapin en immunohistochimie.....	92

Listes des figures et des tableaux

Tableaux

Tableau 1. Comparaison des techniques de découverte des biomarqueurs usuels.....	24
Tableau 2. Collections d'échantillons testées durant l'étude TcCRA.....	56
Tableau 3. Peptides utilisés durant l'étude TcCRA.....	61
Tableau 4. Programme d'immunisation appliqué par P.A.R.I.S pour le développement d'anticorps monoclonaux anti-TCSP.....	65
Tableau 5. Comparaison des taux d'anticorps TcCRA entre les trois groupes HIV, BD-Eu et Tryp+.	68
Tableau 6. Étude comparative de la spécificité TcCRA chez des personnes séropositives HIV.	70
Tableau 7. Séroprévalence chez les donneurs de sang en fonction du sexe et de l'âge.	74
Tableau 8. Étude de la spécificité TcCRA en fonction de la présence ou non d'une réactivité IgG vis-à-vis de différents virus.....	77
Tableau 9. Homologies de séquences entre le motif TCSP de la protéine ribosomale 60S L19 de <i>T. cruzi</i> et les autres protéines de ce même parasite.....	78

Abréviations

Abréviations

A Ac: Anticorps
Ag: Antigène

C CC : Cardiopathie de Chagas
CSH : Cellules Souches
Hématopoïétiques
CMH : Complexe Majeur
Histocompatibilité

D DCM: Dilated Cardio Myopathy
(cardiomyopathie dilatée)

E ELISA: Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay

G GvHD : Graft versus Host Disease
(maladie du greffon contre l'hôte)

L LPS : Lipopolysaccharides

O O.D: Densité Optique

P PIRSF : Protein Information
Resource SuperFamily
PROOF: PROgnostic indicators OF
cardiovascular and
cerebrovascular events

T TCSP: *Trypanosoma cruzi*
Synthetic Peptide
TcCRA: *Trypanosoma cruzi*
Cross Reactive Antibodies
T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*
TCSH : Transplantation des
Cellules Souches
Hématopoïétiques

Résumé & abstract

Abstract

Cross-reactive antibodies are characterized by their recognition of antigens that are different from the trigger immunogen. This happens when the similarity between two different antigenic determinants becomes adequate enough to enable a specific binding. Here, we report for the first time the presence, at an “abnormal” high frequency in blood samples from French human subjects, of antibodies that cross-react with a protein of *Trypanosoma cruzi*. We called these antibodies “*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies” or TcCRA. Our findings show a large seroprevalence of cross-reactive antibodies and suggest that they are induced by a widely spread immunogen, acquired during childhood. Furthermore TcCRA serology does not seem to be associated with commonly known pathogens in clinical routine. Our hypothesis of the implication of a viral agent in the induction of TcCRA was further put forward when we documented a seroconversion pattern in a patient after allogenic stem cell transplantation. This initial exploratory work will serve as the basis for organizing prospective and retrospective clinical investigations, where we will pursue the analysis of TcCRA in order to elucidate its etiology and clinical importance.

Résumé

Les anticorps à réactivité croisée sont caractérisés par leur capacité à reconnaître des épitopes différents de ceux qui ont causé leur induction. Cela se produit lorsque des similitudes structurales entre les deux déterminants antigéniques deviennent suffisantes pour permettre une liaison spécifique. Nous rapportons ici pour la première fois la présence, à une haute fréquence, d'anticorps dans des échantillons de sang provenant de sujets vivant en France avec une protéine de *Trypanosoma cruzi*. Nous avons appelé ces anticorps " *Trypanosoma cruzi* Cross-reactive antibodies " ou TcCRA. Nos résultats montrent une forte séroprévalence des anticorps à réaction croisée, suggérant qu'ils sont induits par un immunogène largement répandu, acquis dès l'enfance et qui ne semble pas être associé à des agents pathogènes communs en clinique humaine. Les recherches effectuées *in silico* orientent vers un virus de la famille des *Herpesviridae*. Cette hypothèse est renforcée par la documentation d'un profil sérologique de séroconversion chez un patient qui a subi une transplantation de cellules souches allogéniques. Ce premier travail va servir de base à la mise en œuvre d'investigations cliniques rétrospectives et prospectives destinées à élucider l'étiologie et l'importance clinique du biomarqueur TcCRA.

Introduction générale

Le paradigme de la spécificité d'un anticorps est étroitement lié à la séquence primaire en acides aminés formant les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères ainsi qu'à leur organisation spatiale, lui offrant ainsi la capacité de se lier à un antigène donné. La notion de réactivité croisée des anticorps est définie par la capacité à se lier à différents motifs antigéniques assez éloignés. Une cause importante de réactivité croisée est le mimétisme moléculaire qui existe entre les structures antigéniques. Ainsi, un agent infectieux peut imiter partiellement des déterminants antigéniques spécifiques d'un tissu et induire des anticorps croisés reconnaissant ce tissu. Le mimétisme antigénique peut ainsi conduire une réponse immunitaire, initialement dirigée contre un antigène étranger, à reconnaître les antigènes de l'hôte, pouvant ensuite déclencher une pathologie auto-immune.

Dans le cas de l'infection par *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), le parasite et/ou la réponse immunitaire liée conduisent finalement à la cardiopathie de Chagas chez 30% des personnes infectées, entre 10 et 30 ans après l'infection. Plusieurs publications indiquent que l'atteinte inflammatoire du tissu cardiaque n'est pas corrélée à la présence locale du parasite *T. cruzi*. La preuve d'un rôle direct de l'auto-immunité a été suggérée par le développement de lésions dans le tissu cardiaque après immunisation de modèles animaux contre des antigènes de *T. cruzi*. De plus, plusieurs antigènes de *T. cruzi* ont été signalés comme présentant des épitopes semblables à des antigènes de mammifères.

Au cours du développement d'un nouveau test de sérodiagnostic pour la maladie de Chagas, nous avons observé une forte réactivité croisée d'un antigène appartenant à la région répétée de la protéine ribosomale 60S L19 de *T. cruzi* chez des individus n'ayant jamais été en contact avec le parasite et *a fortiori* non infectés. L'antigène responsable de cette réactivité a été nommé TCSP (*Trypanosoma cruzi* Synthetic Peptide), et les anticorps croisés induits par cet antigène ont été désignés sous le terme de TcCRA (*Trypanosoma cruzi*

Cross-Reactive Antibodies). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'intérêt de TcCRA comme biomarqueur de pathologies inflammatoires ou auto-immunes par analogie à la maladie de Chagas. La mise en évidence de l'agent infectieux à l'origine de TcCRA représente un autre objectif de nos travaux.

Ce manuscrit est structuré en deux parties. La première partie est constituée par les données bibliographiques ; nous définissons dans un premier temps les biomarqueurs, leurs différents types et les stratégies appliquées à leur découverte. Dans un deuxième temps, nous présentons le parasite *T. cruzi*, et les connaissances générales et physiopathologiques de l'infection qui aboutit à la maladie de Chagas. Cette revue bibliographique permet d'introduire la découverte de TcCRA, ainsi que les deux hypothèses de ce travail de thèse :

- les anticorps TcCRA induisent des maladies auto-immunes par réactivité croisée avec un antigène du soi après une exposition de longue durée, par un mécanisme de mimétisme moléculaire ;
- les anticorps TcCRA sont produits en réponse à une infection ubiquitaire asymptomatique qui peut se réactiver en cas d'immunosuppression.

La deuxième partie rassemble les travaux originaux développés au cours de ce travail de thèse. Après un premier chapitre dédié aux matériels et méthodes, les résultats sont présentés en deux grands volets. Le premier volet s'intéresse à la caractérisation de la spécificité TcCRA ; les principales données ont été rassemblées dans un article publié récemment dans PLOS ONE. Le second volet correspond à une étude originale sur l'acquisition du marqueur TcCRA chez des transplantés médullaires ; il est actuellement en cours de soumission. Les autres résultats présentés succinctement sont encore préliminaires, ils nécessitent des études supplémentaires qui sont en cours de réalisation. Ce chapitre se termine par une discussion générale qui résume les connaissances actuelles sur TcCRA et met en lumière l'intérêt de poursuivre les études sur ce

Introduction générale

candidat biomarqueur et sur l'agent infectieux que l'on suspecte à l'origine de cette nouvelle spécificité.

Données bibliographiques

Chapitre 1 : Biomarqueurs

1-Généralités sur les biomarqueurs. Définition et classification.

Le terme biomarqueur a été initialement introduit dans *Medical Subject Heading*, en 1989. Il a été défini comme tout paramètre biologique mesurable allant de la concentration d'une hormone, d'un titre d'anticorps circulant, jusqu'au phénotype spécifique d'un gène donné. Un biomarqueur peut être mesuré dans un fluide biologique (urine, sang, salive) ; il peut également être un enregistrement obtenu sur un patient (pression artérielle, ECG) ou une image (échocardiogramme, CT scan). Un biomarqueur peut servir pour témoigner d'une bonne santé, d'un état pathologique ou d'une maladie. Il peut refléter la présence d'un facteur de risque, une maladie, un trouble psychique, un processus métabolique, une exposition environnementale, etc. En 2001 le *National Institute of Health* a défini les biomarqueurs comme une caractéristique mesurée objectivement pour définir un processus biologique normal, une pathologie ou une réponse à une intervention thérapeutique. Cependant, les biomarqueurs ne sont pas un concept nouveau, même s'ils n'étaient pas utilisés sous cette dénomination et de manière aussi fréquente dans le passé. En médecine clinique, le suivi de la température corporelle ou la détermination de la glycémie pour le diabète de type II sont des exemples simples et utilisés depuis longtemps qui répondent à la définition de biomarqueurs. Les biomarqueurs couvrent différents domaines d'application aussi bien au cours du développement de nouvelles molécules pharmaceutiques que dans la pratique clinique. Les biomarqueurs sont aujourd'hui utilisés par la communauté médicale pour diagnostiquer une maladie, une capacité particulière à développer une maladie, ou l'état et

l'évolution d'une maladie.

Dans une revue sur les biomarqueurs de 2006, Vasan donne un exemple type sur l'utilisation des biomarqueurs pour optimiser la prise en charge d'un patient hospitalisé pour une douleur thoracique. Il souligne qu'un biomarqueur peut aider à différencier les patients présentant un infarctus de myocarde de ceux qui présentent des douleurs non spécifiques (ex. troponine I ou T), embolie pulmonaire (ex. D-dimer, perfusion scan). L'auteur ajoute qu'un biomarqueur peut être capable d'évaluer la probabilité d'évolution d'un infarctus chez un patient : c'est le cas notamment de la réponse thérapeutique par le biais d'une élévation du segment ST à l'électrocardiogramme qui indique la nécessité d'utiliser des médicaments anti-thrombotiques ; des lésions du myocarde grâce à la troponine, de la sévérité de la maladie coronaire par l'angiographie coronaire, du degré de dysfonctionnement ventriculaire par l'échocardiographie ou de la progression vers l'insuffisance cardiaque par le dosage du *B-type natriuretic peptide* ou BNP [1].

En conséquence, les biomarqueurs peuvent être classés suivant cinq catégories:

1-Biomarqueurs diagnostiques

Ils ont pour objectif de diagnostiquer une pathologie donnée, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques permettant d'approfondir les connaissances des mécanismes physiopathologiques [2] [3].

2-Biomarqueurs d'état

Ils ont pour objectif de déterminer le statut du patient et la sévérité de la maladie (troponine dans le cas de l'infarctus de myocarde) [4].

3-Biomarqueurs pronostiques

Ils ont pour objectif de déterminer l'évolution prévisible de la maladie et le niveau de risque qui y est associé ("BNP" dans l'insuffisance cardiaque) [5].

4-Biomarqueurs prédictifs

Ils ont pour objectif de différencier les patients capables de répondre à un traitement ou qui ont un risque de développer une maladie (BRCA dans le cancer de sein) [6] [7].

5-Biomarqueurs de substitution (*surrogate markers*)

Ils sont utilisés à la place d'un critère d'évaluation clinique (mortalité, morbidité). Ils doivent permettre de déterminer le bénéfice clinique, l'absence de bénéfice clinique ou le risque à partir de données épidémiologiques, thérapeutiques ou physiopathologiques [8] [9].

2-Identification d'un biomarqueur

Les biomarqueurs sont identifiés par l'étude de la corrélation statistique existante entre la présence ou l'intensité d'expression d'un marqueur biologique particulier (ADN, ARN, protéine, anticorps, métabolite) et le résultat clinique observé (symptômes de la maladie, effets secondaires, efficacité). Cette identification passe en général par l'analyse comparative de produits biologiques (tissus, sang, biopsies, liquides biologiques...) issus de sujets sains et de patients à différents stades d'une même maladie. Les caractéristiques biologiques identifiées uniquement dans l'échantillon du patient par mesures répétées, ou par rapport à un témoin, peuvent alors être considérées comme des biomarqueurs de l'état physiologique correspondant. En fonction de la nature du biomarqueur identifié, les termes biomarqueurs génomiques, transcriptomiques, protéomiques et métaboliques sont utilisés. Cette étape d'identification nécessite la maîtrise d'une très large palette de techniques telles que des tests de biologie moléculaire, de l'imagerie ou des dosages protéiques (**Tableau 1**) [10].

Tableau 1. Comparaison des techniques de découverte des biomarqueurs usuels, d'après [10].

	Biomarqueur génomique	Biomarqueur transcriptomique	Biomarqueur protéomique	Biomarqueur métabolomique
Technique à bas débit	Technique de séquençage	PCR Northern blot		RMN Chromatographie en phase gazeuse
Technique à moyen débit	Spectrométrie de masse	SAGE	Spectrométrie de masse ELISA	Chromatographie Liquide/Spectrométrie de Masse
Technique à haut débit	PCR	Puce à ADN	Puce à protéines Puce à anticorps	

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression; ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay; RMN: Résonance Magnétique Nucléaire; PCR: Polymerase Chain Reaction.

La qualité des échantillons utilisés et la précision du protocole clinique de collecte sont primordiales pour l'identification de biomarqueurs qui pourront passer avec succès les étapes de validation (**Figure 1**).

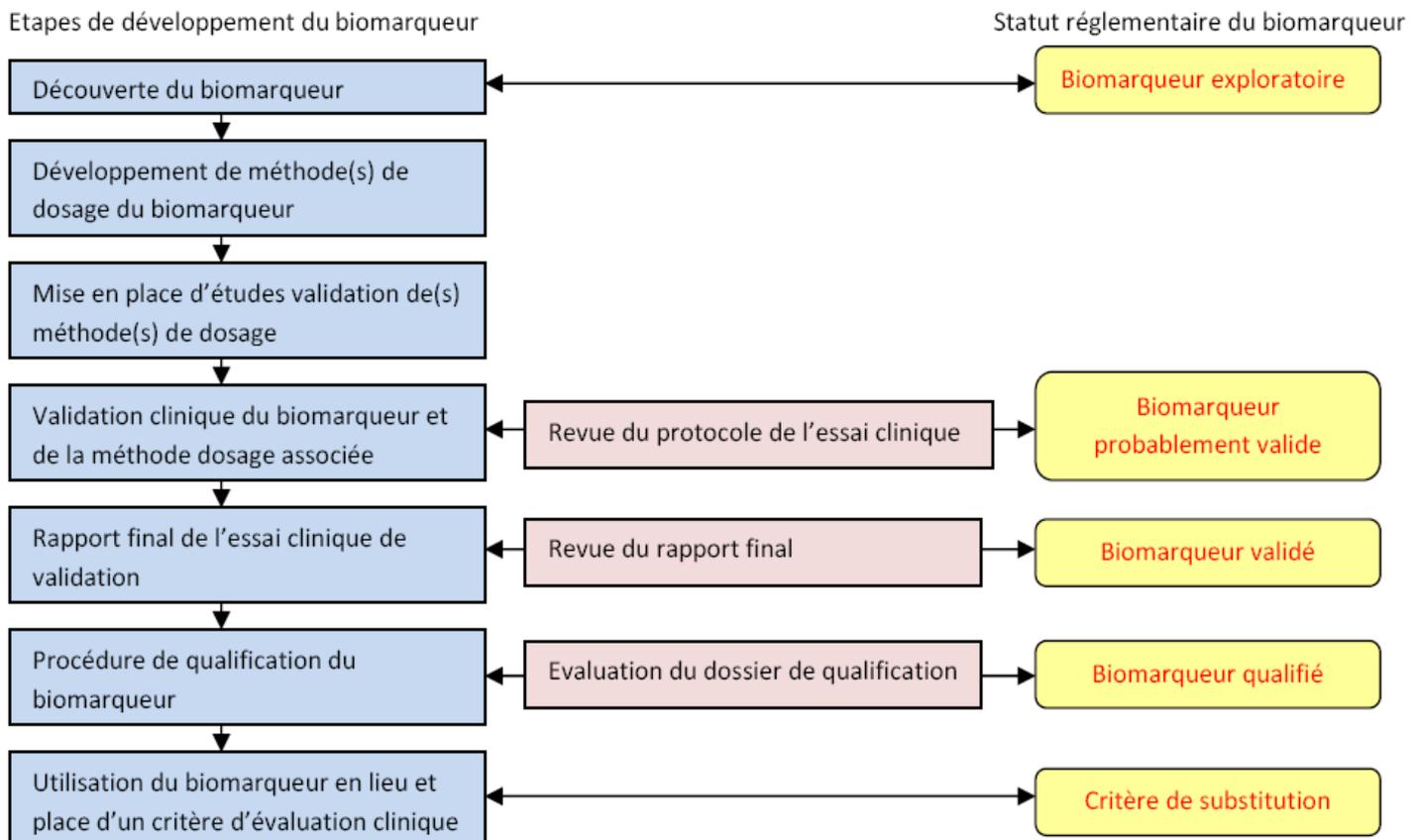


Figure 1. Différents statuts réglementaires d'un biomarqueur relatifs aux étapes du processus de qualification. Adapté de [11].

Idéalement, la validation d'une méthode de dosage devrait s'attacher ainsi à deux aspects : l'aspect recherche exploratoire et l'aspect opérationnel. L'aspect de recherche exploratoire consiste à établir le principe de la méthode et à définir les valeurs cibles, les limites de la méthode, etc. tandis que l'aspect opérationnel consiste à s'assurer des attributs de qualité de la méthode de dosage retenue. Le but est de s'assurer que les performances techniques de la méthode de dosage retenue permettent d'atteindre le but défini pour le biomarqueur [12].

3-Définition de valeurs anormales

Définir les valeurs anormales est une étape essentielle avant l'utilisation d'un biomarqueur [13]. Il est important de caractériser la distribution des marqueurs chez les personnes dans la communauté et dans les échantillons des patients chez lesquels le biomarqueur sera testé. Ainsi les variations des niveaux de biomarqueur doivent être caractérisées en fonction de l'âge, du sexe, de l'origine ethnique, des maladies connues et de la relation avec des facteurs de risque connus [14]. Il existe au moins trois approches existant pour définir un niveau anormal pour un biomarqueur : limite de référence, limite de la discrimination et seuil au-delà duquel le risque de la maladie s'aggrave pendant le suivi (**Figure 2**).

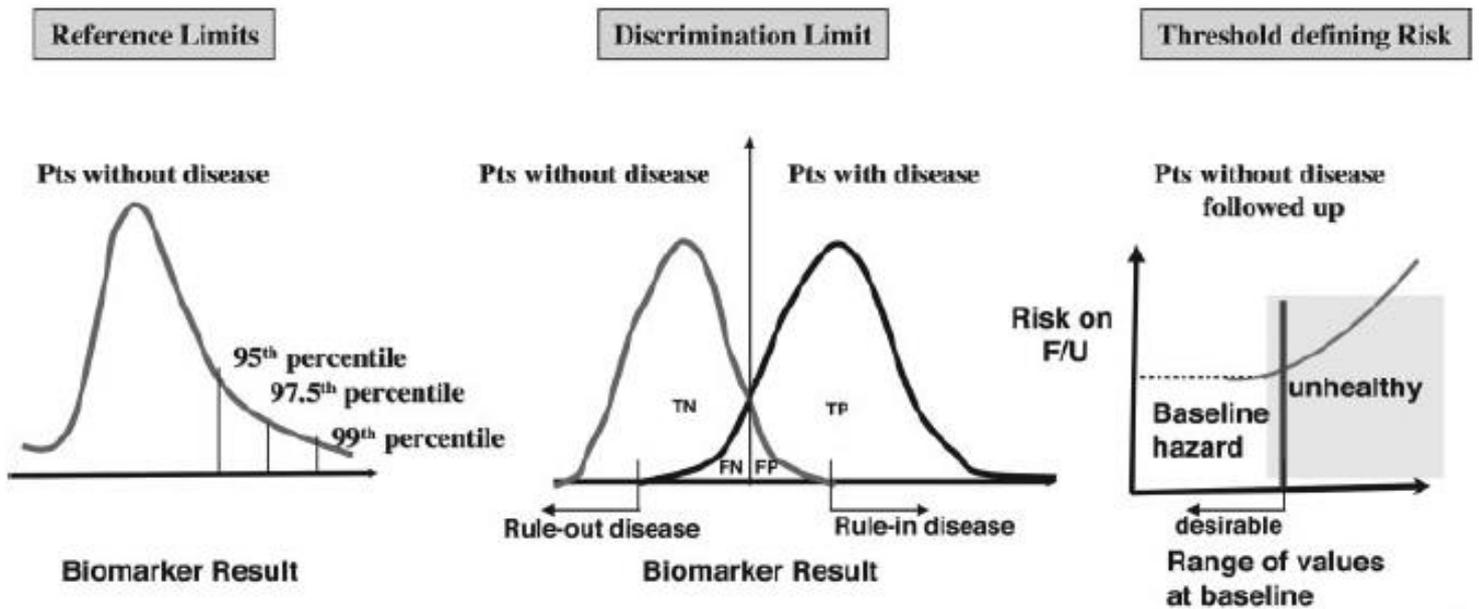


Figure 2. Méthodes appliquées pour la définition de valeurs anormales de biomarqueurs. FN false-negative; FP, false-positive; TN, true-negative; TP, true-positive; Pts, patients; F/U, follow-up.

Par exemple, la valeur du 99e percentile a été utilisée pour définir une anomalie pour la troponine, les valeurs supérieures à cette limite indiquant la présence d'une nécrose aiguë du myocarde [15]. Les limites de discrimination sont également utilisées pour indiquer une valeur anormale de biomarqueurs. Ces limites sont générées par l'évaluation du degré de chevauchement entre les patients avec et sans la maladie dans des études transversales [16]. Cette méthode est largement utilisée dans le diagnostic infectieux. La troisième méthode consiste à définir les niveaux «indésirables» de biomarqueurs en mettant en relation les valeurs de l'incidence de la maladie et la recherche d'un seuil au-delà duquel le risque s'aggrave. Par exemple, il est indésirable que la pression artérielle systolique soit supérieur à 115 mm Hg parce l'incidence de la maladie vasculaire augmente en permanence au-dessus de ce niveau [17].

4-Anticorps en tant que biomarqueurs

Plusieurs approches ont été tentées pour trouver des anticorps spécifiques associés à des maladies auto-immunes ou infectieuses. Une partie des approches utilise un panel d'antigènes cibles connus ou présumés être importants pour la condition, tandis que d'autres utilisent des approches moins biaisées avec des technologies plus larges. La majorité de ces études visent à trouver une différence de profil entre patients et individus sains afin de pouvoir cribler de nouveaux candidats biomarqueurs qui se distinguent nettement chez le malade par rapport au contrôle, par la cible qu'elles reconnaissent, leur titre, leur affinité, voire leur isotype [18] [19].

L'utilité des anticorps dans le diagnostic dérive de leur affinité, de leur spécificité intrinsèque, de leur stabilité biochimique et de leur abondance dans le sang. Néanmoins, l'identification des spécificités d'anticorps révélatrices d'une pathologie et le développement de réactifs pour leur détection précise se sont révélés exceptionnellement difficiles [20]. Ainsi, pour la validation du nouveau candidat biomarqueur « TcCRA », nous avons procédé à une méthodologie d'étude qui ne rejoint pas nécessairement les approches généralement appliquées dans la découverte des nouveaux biomarqueurs (**Figure 3**). En effet, si à ce jour nous avons déjà caractérisé la spécificité de cet anticorps, nous ne possédons pas encore d'indications précises sur l'agent à l'origine de sa production, la population cible pour son utilisation ou le processus physiopathologique sous-jacent.

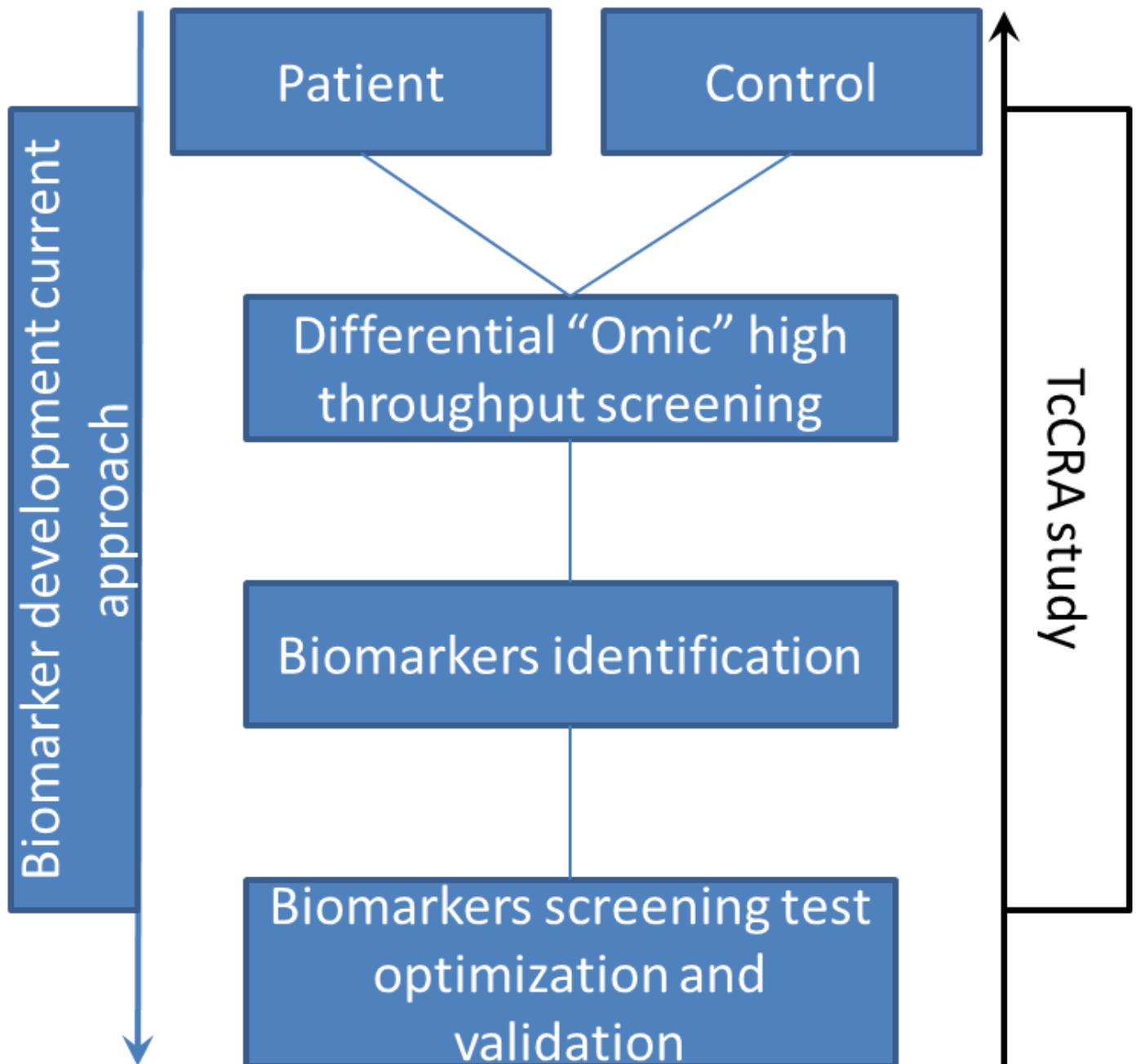


Figure 3. Différence entre l'approche générale de développement des biomarqueurs et l'étude du marqueur TcCRA. « Omic » est le préfixe employé pour : « genomic », « proteomic », « transcriptomic » et « metabolomic ».

Chapitre 2 : *Trypanosoma cruzi*

Le mimétisme moléculaire a été proposé en tant que mécanisme pathogénique des maladies auto-immunes induites suite à une infection. Les hypothèses sont souvent basées sur l'épidémiologie, la clinique ainsi que les preuves expérimentales de l'association avec des agents infectieux. Quelquefois s'y ajoute l'observation d'une réactivité croisée entre les déterminants antigéniques de l'hôte et des agents microbiens. Pour nos travaux, le mimétisme moléculaire est défini comme étant des structures similaires partagées par des molécules dérivées de gènes différents. Une réponse immunitaire contre le déterminant commun entre l'hôte et le microbe peut susciter une immunité spécifique d'un tissu. Cette immunité est capable de déclencher la destruction des cellules et du tissu. L'induction de la réactivité croisée ne nécessite pas que l'agent infectieux soit en réplication car l'atteinte auto-immune peut survenir après l'élimination de l'immunogène dans un scénario de type «hit and run». Par conséquent, l'infection qui a initié le phénomène auto-immun peut ne pas être présente au moment où la maladie auto-immune se déclare. Le parasite *Trypanosoma cruzi* est parmi les exemples les plus étudiés pour l'implication d'un phénomène de mimétisme moléculaire dans la pathogénèse de la maladie de Chagas qui survient 20 à 30 ans après l'infection chez 30% des sujets infectés.

En 1998, au cours du développement d'un test de sérodiagnostic de l'infection par *T. cruzi*, l'étude approfondie de nombreuses protéines antigéniques de ce parasite a permis une observation inattendue concernant des propriétés de mimétisme antigénique d'un segment peptidique composé de 19 acides aminés dérivé d'une des protéines ribosomales du parasite. La particularité de cette observation réside dans la réactivité croisée prononcée avec des sérums

d'individus n'ayant jamais été en contact avec le parasite *T. cruzi*. Dans ce deuxième chapitre nous présentons un rappel sur le parasite unicellulaire *T. cruzi* et les caractéristiques de l'infection par cet agent ainsi que les deux théories qui décrivent la pathogénèse de la maladie de Chagas : a) en lien direct avec le parasite ou b) en lien avec l'immunité induite contre ce parasite.

1- Trypanosomiase américaine

La trypanosomiase américaine, décrite en 1909 par Carlos Chagas, médecin brésilien, est une zoonose parasitaire. En raison de la déforestation massive des zones d'habitat naturel du vecteur hématophage (triatomine), ce dernier a été contraint de trouver chez l'homme une nouvelle cible pour survivre. La maladie de Chagas affecte les populations d'Amérique Latine et le parasite peut également se transmettre directement par les dons de sang sans devoir passer par l'insecte vecteur. La difficulté du diagnostic et la physiopathologie de sa phase asymptomatique chronique qui reste mal connue compliquent la réalisation d'une estimation fiable sur son impact. Il s'agit de l'une des maladies endémiques les plus répandues sur le continent sud-américain. Les évaluations de l'OMS chiffrent entre 7 et 8 millions le nombre de personnes ayant une sérologie positive, plus de 25 millions de personnes étant exposées à la maladie. En zone endémique, des améliorations considérables dans la lutte contre la maladie ont été réalisées mais des cas sont apparus dans des régions du continent américain peu ou pas atteintes auparavant, suite au déplacement de populations et à la migration récente de sujets (et du vecteur) originaires de zones endémiques vers l'Amérique du Nord ; ce même constat est fait dans des pays européens tels que l'Espagne et le Portugal en raison de leurs échanges intenses avec l'Amérique latine. Le risque de transmission de la maladie par transfusion sanguine et transplantation d'organe a obligé les pays non

endémiques à envisager un dépistage des donneurs de sang ou d'organes à risque. Cette maladie se caractérise par une évolution en trois phases : aigüe, indéterminée et chronique. Après 10 jours d'incubation, la maladie entre dans une phase aigüe généralement asymptomatique ou qui présente des symptômes atypiques : maux de tête, fièvre, malaise. Après une période d'environ 2-3 mois, le patient entre dans une phase indéterminée ; il présente une sérologie positive mais pas d'atteinte d'organes ; 70% des patients resteront dans cette phase durant toute leur vie, tandis que les 30% restant évolueront vers une maladie chronique après 10-30 ans et pourront développer des lésions sévères principalement cardiaques, mais aussi digestives et nerveuses. La physiopathologie dans cette troisième phase est mal connue ; elle constitue un des débats scientifiques les plus actifs depuis les années 90 où l'hypothèse de la persistance parasitaire et l'hypothèse de l'auto-immunité induite ont pris naissance pour expliquer la pathogenèse durant la phase chronique. Chacune de ces deux écoles a des arguments étayés, ce qui laisse envisager une réalité mixte pour l'origine de la maladie de Chagas.

1.1-Le parasite

Le genre *Trypanosome* engendre des maladies graves chez l'être humain. Ainsi, *Trypanosoma brucei gambiense* et *T. b. rhodesiense* causent la trypanosomiase humaine africaine (maladie de sommeil) et *T. cruzi* est la cause de la trypanosomiase Américaine.

T. cruzi est un protozoaire flagellé sanguicole [21]. Il se présente sous différentes formes au cours de l'évolution de son cycle infectieux. La forme trypomastigote, mobile, de grande taille (15–

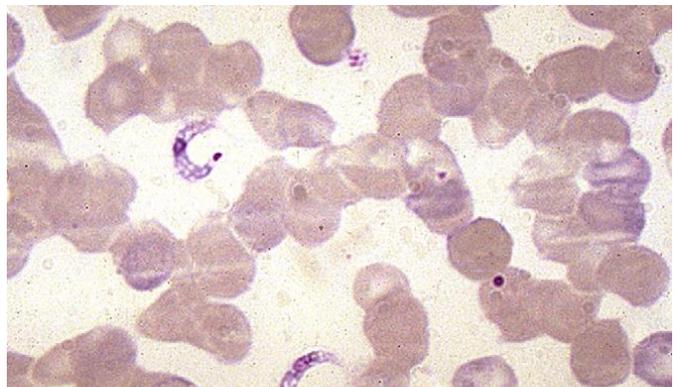


Figure 4. Formes trypomastigotes de *T.cruzi* sur un frottis sanguin (Dr J.-F. Pays).

25 μm) est celle rencontrée dans le sang circulant (**Figure 4**). Les formes amastigotes, immobiles, plus petites (2–4 μm) sont des parasites intracellulaires. Il existe de nombreuses souches de *T. cruzi* que l'on classe en deux groupes. *T. cruzi* I est engagé dans le cycle sylvestre associé principalement aux opossums. *T. cruzi* II, attaché aux rongeurs, est plus fréquemment isolé dans le cycle domestique [22].

1.2-Le vecteur

Les vecteurs sont des punaises hématophages à tous les stades de leur développement appartenant à la famille des Triatomines (triatome ou réduve). Plus d'une centaine d'espèces sont connues mais seules quelques-unes ont un rôle important dans la transmission du parasite à l'homme. *Triatoma infestans*, espèce anthropophile, joue un rôle majeur dans la transmission de la parasitose dans les pays du cône sud (Brésil, Chili, Argentine, Uruguay, Paraguay, Bolivie) [23]. Cette espèce vit dans les anfractuosités des murs en boue séchée, dans les toits en paille ou en chaume, qui caractérisent l'habitat des ruraux de ces régions. Dans les autres zones d'endémie, la transmission est moins intense, les vecteurs principaux étant moins strictement domiciliés que *T. infestans*. Cela rend la lutte anti-vectorielle difficile [24]. Les punaises ne naissent pas avec le parasite mais s'en infectent en se nourrissant du sang d'un homme ou d'un animal infecté. Les insectes contaminés portent alors le parasite et peuvent le transmettre toute leur vie.

1.3-Le cycle parasitaire

À l'occasion d'une piqûre, un triatome infecté prend un repas sanguin et dépose les parasites contenus dans ses déjections près de l'orifice de piqûre (**Figure 5**). Ces derniers pénètrent l'hôte par cet orifice ou grâce à des excoriations dues au grattage. La pénétration peut se faire également aux travers de muqueuses intactes comme la conjonctive. Les trypanosomes

pénètrent les cellules proches du site d'inoculation et s'y transforment en formes amastigotes immobiles. Ils se multiplient par division binaire et se différencient en formes trypomastigotes qui sont libérées dans la circulation où elles vont pénétrer les cellules de la plupart des organes, en particulier, le cœur, le système réticuloendothélial et les plexus du système nerveux autonome. Les parasites se multiplient dans l'intestin avant de devenir des formes trypomastigotes méta-cycliques infectantes. Le cycle chez le vecteur dure environ trois semaines.

T. cruzi a un cycle de vie complexe composé de quatre stades. Tout d'abord, les trypomastigotes circulant dans le sang d'un hôte, généralement un mammifère infecté, sont ingérées lors de l'alimentation de vecteur. Les trypomastigotes se transforment alors en épimastigotes qui se divisent par fission binaire ; ces derniers se transforment dans le tube digestif du vecteur en trypomastigotes méta-cycliques infectieuses; elles sont ensuite déposées par les excréments du vecteur au cours des repas de sang ultérieurs. Une fois chez l'hôte, les trypomastigotes pénètrent dans les cellules et se transforment en amastigotes qui ensuite se transforment en trypomastigotes. Ces formes sont libérées dans le sang après la rupture membranaire des cellules infectées [25].

Le mécanisme moléculaire de l'invasion de ce parasite et les voies utilisées dans ce but ont fait l'objet d'intenses recherches depuis de nombreuses années [26]. *T. cruzi* interagit avec plusieurs récepteurs de cellules hôtes de mammifères, tels que les récepteurs TLR, kinines (B1/B2 sous-types), le récepteur tyrosine kinase, les récepteurs EGF et TGF, l'activité de ces récepteurs est nécessaire pour la liaison optimale du parasite et de l'invasion [27] [28]. Plus récemment, il a été montré que *T. cruzi* exploite aussi le récepteur LDL des cellules hôtes pour son internalisation [29]. Les trypomastigotes libérées infectent les cellules proches non infectées et diffusent via les vaisseaux lymphatiques et la circulation sanguine pour infecter

d'autres cellules à des sites plus distants. En plus de la transmission vectorielle, la transmission de *T. cruzi* est possible par transfusion de sang ou par transplantation d'organes provenant des donneurs infectés [30]. La transmission congénitale et l'acquisition de l'infection par voie orale ont également été rapportées [31].

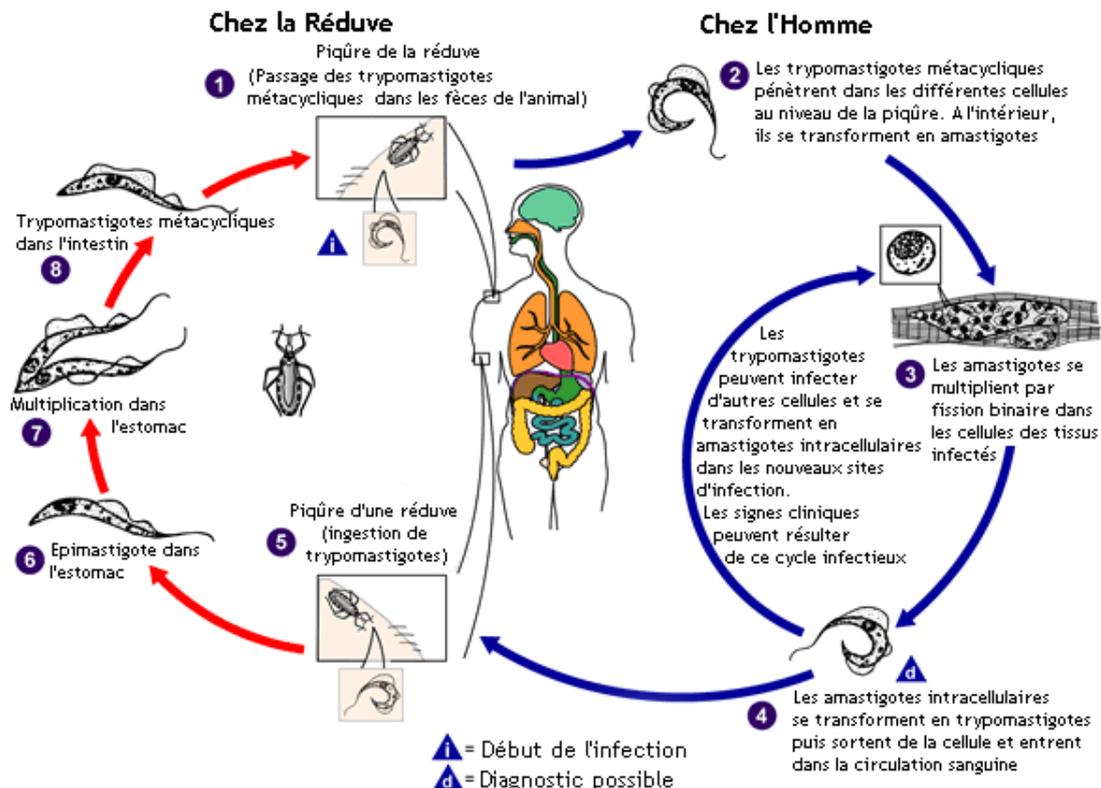


Figure 5. Cycle de la trypanosomiase américaine, d'après un document des Centers for Disease Control and Prevention [32].

1.4-Répartition géographique

1.4.1-Dans les Amériques

La maladie de Chagas sévit dans toute l'Amérique latine, du Mexique jusqu'à l'Argentine (**Figure 6**). Au début des années 1980, on estimait qu'il y avait 16 à 18 millions de sujets infectés avec une incidence annuelle de 300000 cas. En 2007, les chiffres cités étaient de huit millions d'infectés avec 50000 nouveaux cas par an et 14000 décès annuels liés aux complications de la maladie [40]. La transmission vectorielle a été déclarée interrompue en Uruguay, au Chili et au

Brésil. Dans le grand Chaco, région semi-désertique à cheval sur l'Argentine, le Paraguay et la Bolivie, la transmission classique n'a pas été interrompue et a même augmenté [41]. En ce qui concerne les pays andins et d'Amérique centrale, la lutte contre la parasitose est moins avancée, elle est compliquée par le nombre plus élevé d'espèces vectrices. En Guyane où la maladie de Chagas était considérée encore récemment comme exceptionnelle, le nombre de cas diagnostiqués, aussi bien aigus que chroniques, a augmenté notablement depuis 2000, Il est probable que ce nombre a été sous-estimé. Une enquête sérologique conduite en 2004 révélait une prévalence de 0,5% chez des donneurs de sang de différentes régions du département [42]. Aux États-Unis, on estime que 8 à 50 pour 1000 des 7,2 millions de migrants légaux sur la période 1981–2005 pouvaient être infectés ; en ce qui concerne les 5,6 millions migrants illégaux, la prévalence a été estimée entre 6 et 59 pour 1000 en 2000. Au total, le nombre de personnes infectées aux États-Unis est estimé à environ 100000 [43]. Des cas de cardiopathie chronique chagasique, de transmis par voie sanguine ou par transplantation, y ont été rapportés [36].

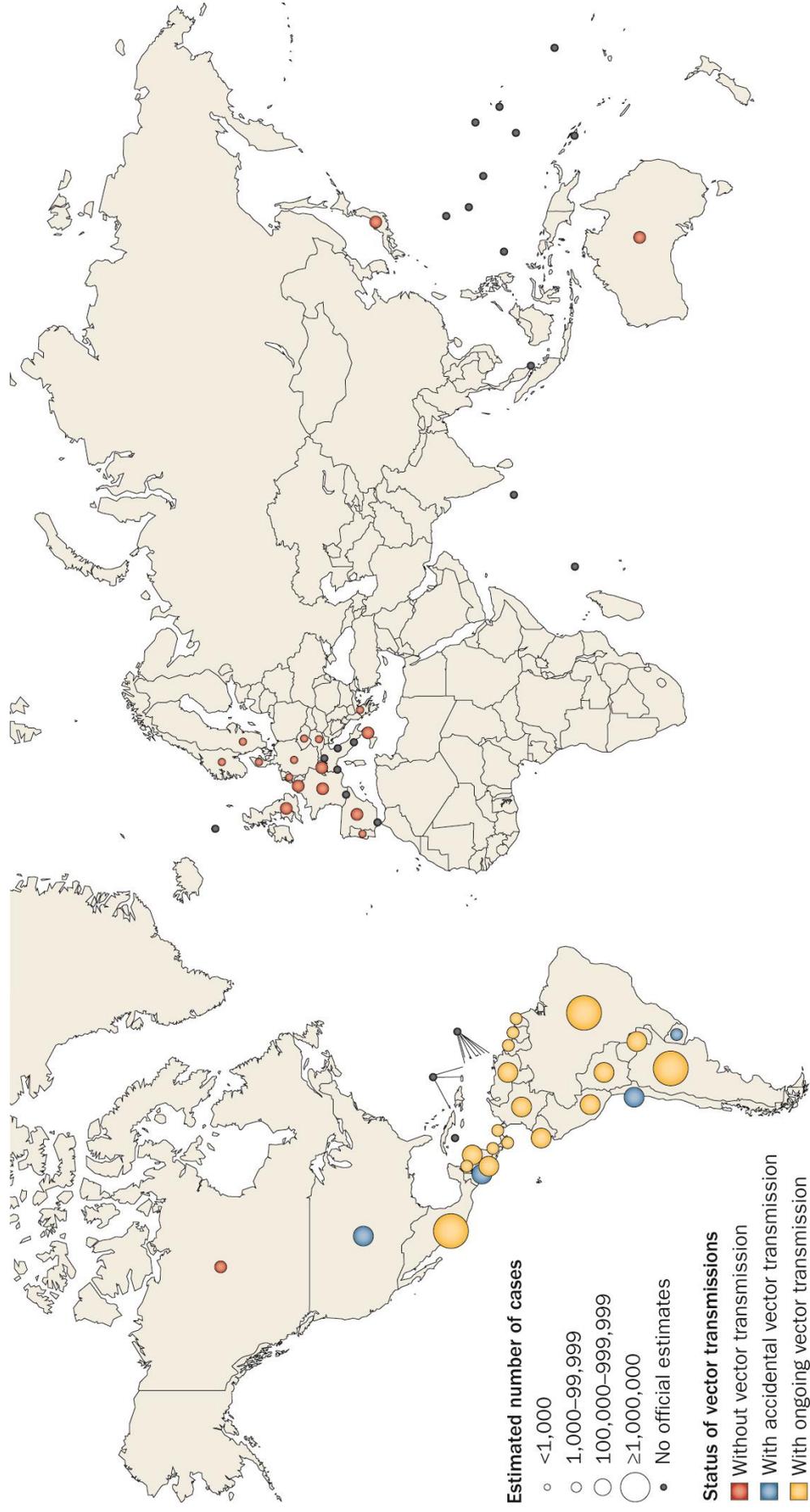


Figure 6. Répartition géographique des estimations des cas d'infection à *T. cruzi* et leurs modes de transmission. Adapté de la référence [44].

1.4.2-En Europe

La migration en provenance d'Amérique latine est plus récente en Europe. Elle concerne avant tout l'Espagne. Là encore, il a été décrit des transmissions transfusionnelles par transplantation et par voie congénitale [37]. D'autres pays d'Europe, sont confrontés dans une moindre mesure à cette nouvelle maladie d'importation. C'est le cas de la Suisse, de l'Italie et de la France où ont été diagnostiqués plusieurs cas chez des migrants boliviens ces dernières années.

1.4.3-En France métropolitaine

En métropole les personnes originaires d'Amérique latine (migrants légaux ou sans papiers, enfants adoptés) ou du département de la Guyane française, ainsi que les enfants nés de mères originaires de zones d'endémie, les voyageurs ou expatriés de retour de zone d'endémie sont à risque d'avoir été infectés. En 2009, l'Institut de veille sanitaire estimait entre 900 et 2600 le nombre de personnes susceptibles d'être infectées par *T. cruzi* en métropole parmi les 157000 personnes appartenant à un groupe à risque (les migrants latino-américains en situation irrégulière n'étant pas comptabilisés) [45].

Depuis 2006 des mesures de contrôle transfusionnel ont été mises en œuvre en France métropolitaine pour tout don provenant d'une personne appartenant à un groupe à risque. Elles ont été complétées en 2009 pour couvrir les activités liées aux greffes [46]. En France métropolitaine la pathologie est mal connue et peu d'équipes hospitalières travaillent sur ce sujet. Les cliniciens de l'hôpital Tenon à Paris ont mis en place une consultation spécialisée et proposent un dépistage à tous les latino-américains en collaboration avec le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de la Pitié Salpêtrière.

L'atelier de consensus organisé en 2009 par la Société de pathologie exotique recommande de dépister systématiquement les femmes à risque lors de la grossesse, et plus largement celles en âge de procréer, pour diagnostiquer et prendre en charge précocement les cas congénitaux et, à terme, contrôler le risque de transmission congénitale sur le territoire métropolitain [47].

1.5-Transmission

Les modes de transmission de *T. cruzi* sont variés ; le principal reste la transmission vectorielle avec pénétration active du parasite par les muqueuses ou des excoriations cutanées. Avec les migrations massives de ruraux vers les villes d'Amérique latine, les transmissions transfusionnelle et congénitale sont de plus en plus observées en milieu urbain ou dans des zones où la transmission vectorielle a été éliminée [33] [34]. Le risque de transmission de *T. cruzi* par une unité de 500 ml de sang contaminé est élevé, estimée à 20% [35]. De gros progrès ont été accomplis ces dernières années dans le contrôle de la transmission par transfusion sanguine en Amérique latine. En 2001–2002, le pourcentage de dépistage sérologique chez les donneurs de sang était de 100% dans sept pays, supérieur ou égal à 90% dans six, de 75 à 90% dans quatre et seulement de 25 à 34% dans trois dont le Mexique. Le risque de transmission transfusionnelle en dehors de la zone d'endémie est apparu avec la migration de ressortissants d'Amérique latine vers l'Amérique du Nord ou l'Europe [36] [37]. La transmission verticale est la troisième en ordre de fréquence. Elle peut se produire aussi bien à la phase aiguë qu'à la phase chronique. Les prévalences varient de 3 à 10% selon les pays [38]. La maladie est responsable de mort néonatale, de prématurité, de faible poids de naissance. Deux études menées à dix ans d'intervalle en Bolivie ont montré une baisse de la morbidité et de la mortalité des formes congénitales, baisse attribuée à une amélioration des conditions de vie. Les autres modes de

transmission sont plus exceptionnels comme celles survenant lors de greffes d'organes ou de tissus [39]. Toutes ces voies de transmission de *T. cruzi* prennent une importance particulière dans le processus croissant d'urbanisation et dans la dissémination du trypanosome, au-delà de ses traditionnelles limites géographiques de distribution.

2-Physiopathologie de la maladie de Chagas

L'existence de la maladie de Chagas est bien antérieure à la découverte de Carlos Chagas et remonte même à des milliers d'années auparavant. Des études réalisées sur des momies de 2500 ans trouvées dans le nord du Chili et le sud du Pérou ont révélé la présence de l'infection par *T. cruzi* [48]. En fait, Darwin aurait pu mourir de cardiopathie chagasique. Si l'on prend en compte ses écrits racontant qu'il avait été piqué par des punaises lors de son voyage en Amérique du sud et sa fin de vie causée par une insuffisance cardiaque congestive. Darwin écrivait : « La nuit, j'ai fait l'expérience d'une attaque, le mot est juste, d'une espèce de réduve, une grande punaise noire. Il est vraiment dégoûtant de sentir ces insectes mous. Elles sont très fines avant de sucer, mais après, elles deviennent arrondies et pleines de sang et, dans cet état, on peut aisément les écraser » [49].

Les conséquences de l'infection par le parasite sont très variables. Environ 70% des individus infectés vont avoir une vie normale sans aucune manifestation clinique et une qualité de vie comparable à celle d'une personne non infectée. L'infection aiguë reste asymptomatique dans la plupart des cas ; elle peut être plus bruyante chez des enfants de moins de 10 ans. Approximativement 99,5% de la population infectée passent en stade intermédiaire ; ensuite l'infection devient chronique en demeurant asymptomatique. Néanmoins, du génome

parasitaire et des anticorps anti- *T. cruzi* peuvent être détectés dans le sang de ces patients.

2.1-Phase aiguë

Elle se caractérise par le mal-être général qu'elle produit, accompagnée de diverses manifestations cliniques. Les symptômes peuvent être très légers et atypiques, raison pour laquelle la maladie n'est pas détectable durant cette phase. Elle débute une semaine après la contamination. Sur 510 patients brésiliens au stade chronique de la maladie, seulement 1% avaient un antécédent évoquant une phase aiguë [50]. Durant cette phase précoce de l'infection des anticorps IgM anti- *T. cruzi* peuvent être détectés dans la circulation. La phase aiguë de la maladie de Chagas peut se présenter à n'importe quel âge. Cependant dans les zones hautement endémiques, les cas symptomatique sont généralement détectés chez des personnes de moins de 15 ans et majoritairement chez les enfants de moins de 10 ans. Habituellement, le « chagome » d'inoculation guérit spontanément au bout de quelques jours. Les symptômes généraux de la maladie de Chagas durant la phase aiguë sont : fièvre, hépatomégalie et splénomégalie, anorexie, diarrhée et vomissement. La mortalité par myocardite aiguë a lieu dans les 2 à 3 % des cas, principalement chez les enfants de moins de 2 ans. Une étude au Venezuela a montré que des signes histologiques de myocardite étaient toujours retrouvés chez des sujets présentant une forme aiguë symptomatique, qu'il y ait ou non une symptomatologie cardiaque [51]. Une complication grave de la phase aiguë de la maladie est la méningo-encéphalite qui apparaît également chez les enfants de moins de 2 ans. Chez ces derniers cas, la mortalité peut atteindre 50%.

2.2-Phase indéterminée

Cette phase commence 8 à 10 semaines après la phase aiguë, qu'il y ait eu ou non des manifestations cliniques, et peut durer plusieurs années ou indéfiniment. Elle se caractérise par l'absence de symptômes. L'individu est en pleine possession de ses moyens pour réaliser des activités physiques. La majorité des personnes infectées par *T. cruzi* resteront dans cette phase durant toute leur vie.

2.3-Phase chronique

La troisième phase est celle des complications tardives, cardiaques ou digestives, survenant des années ou des décennies après la deuxième. Dans les formes aiguës, les formes amastigotes de *T. cruzi* sont rencontrées dans tous les organes avec des lésions inflammatoires constituées principalement de cellules mononucléées. Dans les formes chroniques la cardiopathie de Chagas (CC) est la principale complication et cause de décès liée à l'infection. Environ 2% à 5% des sujets ayant une forme chronique indéterminée passent au stade de CC [21]. Les lésions caractéristiques sont des infiltrats inflammatoires mononucléées avec une lyse des cellules cibles. Cette destruction de cellules cibles non parasitées (cellules myocardiques et neurones) constitue la lésion typique de la maladie de Chagas chronique. Une étude comparant le devenir de patients ayant une CC par rapport à d'autres ayant une cardiomyopathie dilatée retrouvait sur une période de trois ans et demi une mortalité de 23% dans le premier groupe versus 6% dans le second [52]. Sur 130 patients ayant une CC à issue défavorable, suivis 7,9 ans en moyenne, les principales causes de décès étaient une mort subite (62,3 %) et une insuffisance cardiaque progressive (15,4%). Douze décès (9,2%) étaient dus à d'autres causes cardiovasculaires, principalement des accidents vasculaires cérébraux, 16 (12,3 %) n'étaient pas d'origine cardiovasculaire et dans un dernier cas l'origine du

décès était inconnue [53]. À la phase chronique, il y a aussi souvent une réduction des neurones dans les plexus mésentériques, en particulier de l'œsophage et du côlon [54].

La physiopathologie de la phase chronique et les complications viscérales tardives sont mal connues et font l'objet de nombreuses controverses. Deux théories principales ont été proposées pour rendre compte de la pathogénie de la maladie:

- la théorie parasitaire, persistance du parasite dans les tissus dans les formes viscérales tardives,
- l'auto-immunité, plusieurs protéines parasitaires ayant été décrites, comme portant des similarités avec des protéines exprimées chez les mammifères et notamment chez l'être humain.

À ce jour, il existe peu de preuves en faveur d'un rôle direct de l'auto-immunité induite par *T. cruzi* sur la pathologie humaine ou même dans des modèles murins. Après presque un siècle d'enquête, les mécanismes de la pathogénèse de la maladie de Chagas ne sont toujours pas clairs et font l'objet d'un débat. Pourquoi seules certaines personnes développent la maladie ? Pourquoi y-a-t-il une telle variabilité dans ses manifestations ? Pourquoi la maladie est-elle si lente à se manifester ? Quels sont les facteurs déclenchant ? Voilà quelques-unes des nombreuses questions auxquelles les cliniciens et les chercheurs ont tenté d'apporter une réponse au cours des dernières décennies.

2.3.1-Persistance du parasite

T. cruzi est souvent présent dans des cellules des muscles cardiaques et lisses chez les animaux et les humains chroniquement infectés [55] [56]. Les immunosuppresseurs, qui soulagent généralement les symptômes au cours des maladies auto-immunes, augmentent la mortalité chez les patients infectés,

comme cela est observé chez les receveurs d'une greffe de cœur et chez les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) [57] [58]. Le fait que la chimiothérapie anti- *T. cruzi* réduit les symptômes clinique de la maladie est en faveur d'un rôle direct du parasite sur le développement de la maladie [60] [61]. Dans des modèles expérimentaux d'infection à *T. cruzi*, la chimiothérapie administrée immédiatement après l'infection réduit et élimine parfois la maladie cardiaque [62].

2.3.2-Auto-immunité

L'hypothèse alternative est que la maladie de Chagas résulte d'une pathologie auto-immune : une réponse immunitaire contre des auto-antigènes provoquerait alors une inflammation des tissus et des lyses cellulaires. Par définition, l'auto-immunité est le résultat d'échec des mécanismes responsables du maintien de la tolérance immunologique du soi. Les réactions auto-immunes peuvent être présentes et mesurables en l'absence d'une inflammation des tissus ou d'une maladie déclarée [63]. Par ailleurs, la présence d'anticorps réactifs et de cellules T réactives à des antigènes de l'hôte peut être une conséquence et non une cause de l'atteinte tissulaire. Si la maladie de Chagas résulte d'une réaction auto-immune, les thérapies abordées doivent être dirigées contre les mécanismes d'auto-immunité, les chimiothérapies dirigées uniquement contre le parasite ne pouvant pas empêcher la destruction des tissus. Il a été démontré que l'infection par *T. cruzi* induit des auto-anticorps dirigés contre des antigènes du cœur, des muscles squelettiques et du tissu nerveux [64]. Il s'agit notamment de la protéine ribosomale P [65], de la myosine [66], du récepteur β 1 adrénergique [67], des microtubules du cytosquelette et protéines associées [68], des protéines neuronales [69] et de la protéine de humaine Cha [70]. Beaucoup de ces protéines cibles ont une expression ubiquitaire, ce qui n'explique pas

l'inflammation spécifique d'organe rapportée au cours la maladie de Chagas. Par ailleurs, ces auto-anticorps ne semblent pas plus fréquents chez les patients atteints de la maladie de Chagas en comparaison avec d'autres patients asymptomatiques. Ainsi, la signification clinique de ces anticorps n'est pas claire [71]. Des lymphocytes T qui reconnaissent des antigènes cardiaques ont également été identifiés chez des personnes chroniquement infectées et chez la souris. Chez l'homme, des clones de lymphocytes T de patients prolifèrent lorsqu'ils sont cultivés avec un peptide provenant de la myosine cardiaque humaine (résidus 1442-1447 : AAALDK) ou avec l'antigène parasitaire B13 (AAAGDK) [72].

A ce jour, il n'existe aucune preuve que les auto-anticorps induits par *T. cruzi* déclenchent une pathologie cardiaque après leur transfert chez un hôte naïf. Cependant, ces anticorps affectent la contraction et la signalisation cellulaire des myocytes cardiaques in vitro [73]. En outre, les sérums de souris infectées induisent la lyse des myocytes in vitro par le biais d'une cytotoxicité dépendante de l'anticorps ADCC [74]. L'immunisation de souris avec la cruzipaine, un antigène de *T. cruzi*, induit des auto-anticorps qui reconnaissent la myosine ; de plus, des dépôts d'IgG au niveau du tissu cardiaque et des anomalies de conduction ont été observés chez la souris [75]. Bon nombre de cibles de ces autoanticorps sont intracellulaires et il est donc difficile de comprendre comment ils peuvent causer la maladie si leur antigène est inaccessible. De plus, l'utilisation combinée de différentes souches parasitaires ou de souris aboutit à des observations différentes [76]. Les résultats contradictoires de ces expériences peuvent s'expliquer par des différences dans la capacité des souches de *T. cruzi* à induire l'auto-immunité ou des souches de souris à développer une réaction auto-immune. Il a été documenté que le blocage de l'immunité contre les antigènes du cœur (tolérisation aux antigènes du tissu cardiaque), réduit l'inflammation et la fibrose après l'infection chez la

souris [77]. Enfin, l'immunisation de souris avec des protéines parasitaires spécifiques peuvent induire l'auto-immunité et des maladies cardiaques. Plus précisément, l'immunisation de souris avec la région c-terminale nommée R13 (EEEDDDMGFGLFD) des protéines ribosomales P0, P1 et P2 du *T. cruzi* induit la production d'auto-anticorps suivie de modifications électro-cardiographiques chez la souris [78]. Comme aucun parasite vivant n'a été utilisé lors de ces expériences d'immunisation, l'auto-immunité est censée être induite par un mécanisme de mimétisme moléculaire.

Il existe de nombreux mécanismes potentiels qui sous-tendent la pathogénie de la maladie de Chagas. Les mécanismes pouvant expliquer l'induction de l'auto-immunité par *T. cruzi* comprennent (i) l'activation polyclonale des lymphocytes, induite par le parasite ; (ii) l'activation par proximité (*bystander activation*) induite par une lésion tissulaire qui conduit à la stimulation des lymphocytes auto-réactifs, normalement tolérants; (iii) la présentation d'épitopes cryptiques par les cellules tissulaires et immunitaires dans un contexte inflammatoire ; et (iv) le mimétisme moléculaire, ou l'immunité dirigée contre un épitope parasite portant des similarités structurales et immunologiques avec des épitopes exprimés chez l'hôte, induit une réaction croisée avec ces derniers. Le dernier mécanisme est sans doute le plus documenté par des données expérimentales [79]. Quand un antigène donné ressemble suffisamment à un antigène de l'hôte, le système immunitaire d'abord activé contre l'antigène natif réagit secondairement contre l'auto-antigène correspondant. La preuve de cette hypothèse inclut les rapports sur l'auto-immunité suite à l'immunisation avec des antigènes de *T. cruzi* [80]. Comme signalé précédemment, il existe de nombreux auto-anticorps présentant une réaction croisée « *T. cruzi* –hôte » : B13 avec la myosine, la cruzipaine avec la myosine, et l'antigène Cha ou les protéines ribosomales de *T. cruzi* avec les récepteurs cardiaques, notamment le récepteur bêta-

adrénergique [81]. Ces derniers auto-anticorps réagissent avec la deuxième boucle des récepteurs adrénérergiques couplés aux protéines G et de récepteurs muscariniques (M2) cholinergiques [82]. Les sérums de patients CC interfèrent avec les activités électrique et mécanique des cellules myocardiques embryonnaires *in vivo*, et induisent une arythmie chez le lapin [83]. La présence de tels anticorps anti-récepteurs n'est pas corrélée avec la symptomatologie cardiaque mais plutôt avec un dysfonctionnement du système nerveux autonome [84]. Par ailleurs, des complexes d'attaque membranaire (fractions C5-C9 du complément) ont été trouvés sur les membranes des cardiomyocytes de tissu cardiaque des patients CC [85], ce qui suggère que l'activation du complément peut être induite par des auto-anticorps et pourrait jouer un rôle dans la lyse cellulaire associée aux anticorps.

En conclusion, il y a un grand nombre de preuves que l'infection par *T. cruzi* induit à la fois une auto-immunité humorale et cellulaire. Toutefois, le potentiel pathogène de cette auto-immunité n'a pas été prouvé et, aucune conclusion ne peut être tirée quant au rôle de l'auto-immunité induite par *T. cruzi* dans les atteintes tissulaires observées lors de la maladie de Chagas humaine.

2.4-Traitement

L'importance de savoir si la CC est une maladie auto-immune est grande et importante à la fois en clinique et pour la santé publique. Si la CC résulte d'une pathologie auto-immune, les thérapies doivent être dirigées contre les mécanismes d'auto-immunité, les chimiothérapies dirigées uniquement contre le parasite ne pouvant pas empêcher la destruction des tissus. Une stratégie à deux volets peut être envisagée, à la fois pour tuer le parasite et pour réduire les lésions tissulaires. Aujourd'hui, le benznidazole a été montré efficace pour le traitement de la phase aiguë de l'infection [86].

Le traitement des CC avec insuffisance cardiaque est en partie similaire à celui des autres insuffisances cardiaques, faisant appel aux diurétiques, à la dioxine et aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Les β -bloquants sont utilisés avec précaution en raison de la fréquence des troubles du rythme. La mise en place d'un pacemaker est indiquée en cas de bradyarythmie. Les tachyarythmies peuvent bénéficier d'anti-arythmiques de classe III tels que l'amodiarone ou de l'implantation d'un défibrillateur. Enfin, malgré ses complications (néoplasies, rejets, réactivations), la transplantation cardiaque a permis d'obtenir des résultats similaires, voire supérieurs à ceux obtenus dans les autres insuffisances cardiaques terminales [59]. Finalement, les propositions thérapeutiques sont restées les mêmes depuis plus de 40 ans et il n'y a pas encore de traitement parfaitement efficace pour la phase chronique de la maladie.

2.5-Diagnostic

Le diagnostic clinique de l'infection à la phase aiguë ne peut être établi que s'il y a des signes d'entrée des parasites tels que le signe de Romana (associant une conjonctivite unilatérale et un œdème périorbitaire) ou la présence d'un chagome. Cette phase est caractérisée par une forte parasitémie, ce qui permet un diagnostic parasitologique [87] ; mise en évidence du parasite par un étalement de sang contaminé, culture de parasite et surtout mise en évidence du génome parasitaire par PCR. Cependant, ces approches ne sont pas recommandées durant la phase chronique de l'infection qui est caractérisée par une faible parasitémie.

Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale représentée par la production d'anticorps. Cette immunité repose en majorité sur la spécificité et la durabilité de ces molécules en circulation. Les lymphocytes B doivent assurer la reconnaissance spécifique d'innombrables antigènes, afin de remplir

leur rôle important dans l'immunité adaptative. La majorité des tests de sérodiagnostic reposent sur le dosage d'anticorps spécifiques. Une fois que la réponse immunitaire vis-à-vis de *T. cruzi* est établie, le diagnostic de l'infection est basé en grande partie sur la détection d'anticorps anti-*T. cruzi* par des techniques sérologiques [88]. L'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination indirecte, et les méthodes immunoenzymatiques (ELISA) sont les tests les plus pratiqués aujourd'hui. L'utilisation d'au moins deux tests basés soit sur des méthodologies différentes soit sur des préparations antigéniques différentes est actuellement recommandée par l'OMS en l'absence de test de référence. Bien que la plupart des fabricants de tests sérologiques revendiquent une sensibilité et une spécificité proches de 100%, la survenue de résultats non concluants ou faussement positifs est un problème récurrent, en particulier lorsque les titres sérologiques sont proches de la valeur seuil [89]. Ce diagnostic définitif est souvent obtenu après de multiples tests sérologiques, avec l'appui des données épidémiologiques et des symptômes cliniques. En pratique, un sujet est considéré comme exposé lorsque les résultats de deux tests sérologiques indépendants sont positifs.

Des études effectuées dans espaces géographiques différents avec un large éventail de formats de tests ont conclu que le diagnostic actuel est loin d'être parfait [90] [91] [92] [93]. La plupart des tests disponibles dans le commerce utilisent des extraits bruts de parasites ou des fractions subcellulaires comme préparations antigéniques [94]. Pour pallier à cet écueil, les chercheurs ont caractérisé des antigènes immunoréactifs spécifiques et ont produit des protéines recombinantes et des protéines de fusion contenant des épitopes de diverses protéines parasitaires [95] [91]. En effet, il a été démontré que l'utilisation de protéines recombinantes et de peptides de synthèse est supérieure à l'utilisation d'extraits totaux de protéines de *T. cruzi* [96] [95]. Ces dernières présentent de fortes réactions croisées avec les sérums de patients

infectés par *Leishmania sp* [97]. La **Figure 7** montre la réactivité croisée de sérums de patients qui ont une leishmaniose viscérale sur un western blot de *T. cruzi* [97]. Cela illustre que la réactivité croisée est l'un des problèmes majeurs du sérodiagnostic de *T. cruzi*, même si l'utilisation d'antigènes recombinants résout partiellement le problème de ces réactions [37]. Les sensibilités présentées pour les différents antigènes recombinants varient en fonction du stade clinique du patient et des manifestations de la maladie ; de ce fait, l'utilisation combinée de différents antigènes recombinants dans le même test améliore la sensibilité diagnostique [98] [99]. Cependant, certains antigènes recombinants ou des peptides de synthèse peuvent présenter des séquences d'acides aminés qui ressemblent à d'autres organismes, ce qui conduit à une réactivité croisée par le biais d'un mimétisme moléculaire.

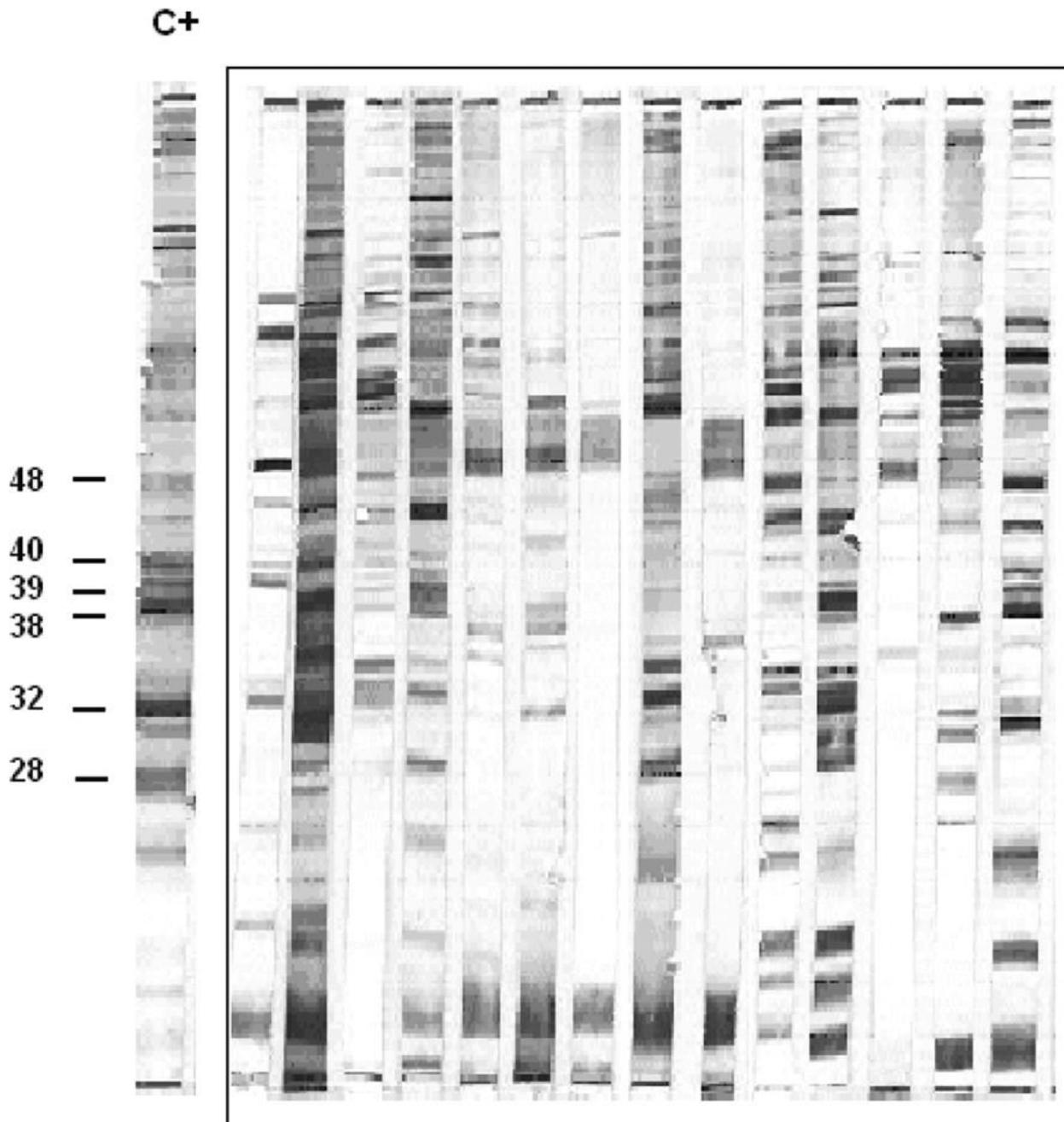


Figure 7. Réactivité des sérums de 14 patients atteints de leishmaniose viscérale sur des westerns-blots de *T. cruzi*. C+ représente la réactivité du sérum d'un patient infecté par *T. cruzi*. Adapté de la référence [97].

Travaux originaux

Chapitre 1 : La découverte de TcCRA

Durant les années 1990, au cours du développement d'un nouveau test de confirmation diagnostique de la maladie de Chagas «INNO-LIA Chagas», l'équipe du Dr. Maan Zrein a observé une forte réactivité croisée d'un antigène appartenant à la région répétée de la protéine ribosomale 60S L19 de *T. cruzi*. Cette région répétitive avait été initialement décrite comme déterminant antigénique de *T. cruzi* [100]. Nous avons appelé cet antigène TCSP (*Trypanosoma cruzi* Synthetic Peptide) (**Figure 8**), alors que TcCRA (*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies) désigne les anticorps qui le reconnaissent spécifiquement sans avoir été induits suite à l'infection par *T. cruzi*.

TCSP	-----AAAPAKAAAAPAKTAAAPV-----	19
Repetitive protein antigen 69/70	-----AAAAPAKAAAAAPAKAAAAPAKTAAAPVGGKAGGKK	97
60S ribosomal protein L19, <i>Trypanosoma cruzi</i> marinkellei	-----AAAPAKTAAAPAKTAAAPAKTAAAPAGKAGGKK	287
60S ribosomal protein L19, <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener	KAAAAPAKAATAPAKAATAPAKAAAAPAKAATAPVGGKAGGKK	343
	*:****:*****:***.	

Figure 8. Alignement de la protéine ribosomale 60S de différentes sous-espèces de *T. cruzi* avec le motif répété appelé 69/70 et l'antigène TCSP (en rouge). (*) indique les positions qui ont un résidu entièrement conservé, (:) indique la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires et (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires.

Les premiers résultats de l'étude de TCSP sont représentés par la **Figure 9**. Il faut noter que ces résultats ont été générés avec des collections d'échantillons datant d'avant l'année 2000. Il s'agit d'un test ELISA indirect qui utilise TCSP pour la sensibilisation des plaques. Plusieurs populations ont été testées. Il n'était pas surprenant que les patients infectés par *T. cruzi* (Chag+) présentent des signaux positifs puisque le peptide employé dans le test est dérivé d'une protéine de *T. cruzi* comme indiqué dans la **Figure 8**. En revanche, la réactivité des sérums de sujets *a priori* non exposés à *T. cruzi*, comme c'est le cas des donneurs de sang européen (BD-Eu), était très étonnante. La **Figure 9** montre

également la réactivité des sérums de deux groupes de personnes infectées par HIV provenant d'Afrique (HIV+Af) ou d'Amérique du nord (HIV+Am). Les personnes infectées par HIV présentent les plus fortes réactivités, souvent supérieures à celle de patients séropositifs pour *T. cruzi*. Il est intéressant de noter que les cardiomyopathies étaient les manifestations cardiovasculaires les plus communément associées à l'infection par HIV [101] du moins, avant l'introduction des trithérapies anti-HIV. Cependant, la cause de ces cardiomyopathies est mal connue [102]. Un certain nombre d'hypothèses ont été proposées, y compris la myocardite due à l'infection directe par HIV ou par d'autres virus cardiotropes [103]. Cependant, les recherches virales n'ayant pas réussi à expliquer cette association, il a été suggéré qu'une proportion significative de ces cardiopathies dilatées était due à des infections idiopathiques par des pathogènes opportunistes inconnus [104] [105]. Par définition, la cardiomyopathie dilatée (DCM) est une maladie chronique du myocarde caractérisée par la dégénérescence progressive de contraction du myocarde associée à la dilatation du cœur ; elle aboutit à l'insuffisance cardiaque et constitue une des principales causes de transplantation cardiaque. Malgré l'impact clinique de cette maladie en raison de sa forte mortalité, son étiopathogénie reste mal connue [106]. Jusqu'à plus de 50 % des cas sont idiopathiques et la thérapie se concentre généralement sur la correction de la défaillance cardiaque plutôt que de cibler le facteur causal [107]. Les DCM sont souvent liées à des niveaux élevés d'auto-anticorps contre des protéines cardiaques structurales et fonctionnelles, en particulier les protéines mitochondriales, les récepteurs muscariniques M2, les récepteurs β 1-adrénergique, et les chaînes lourdes de la myosine [108] [109].

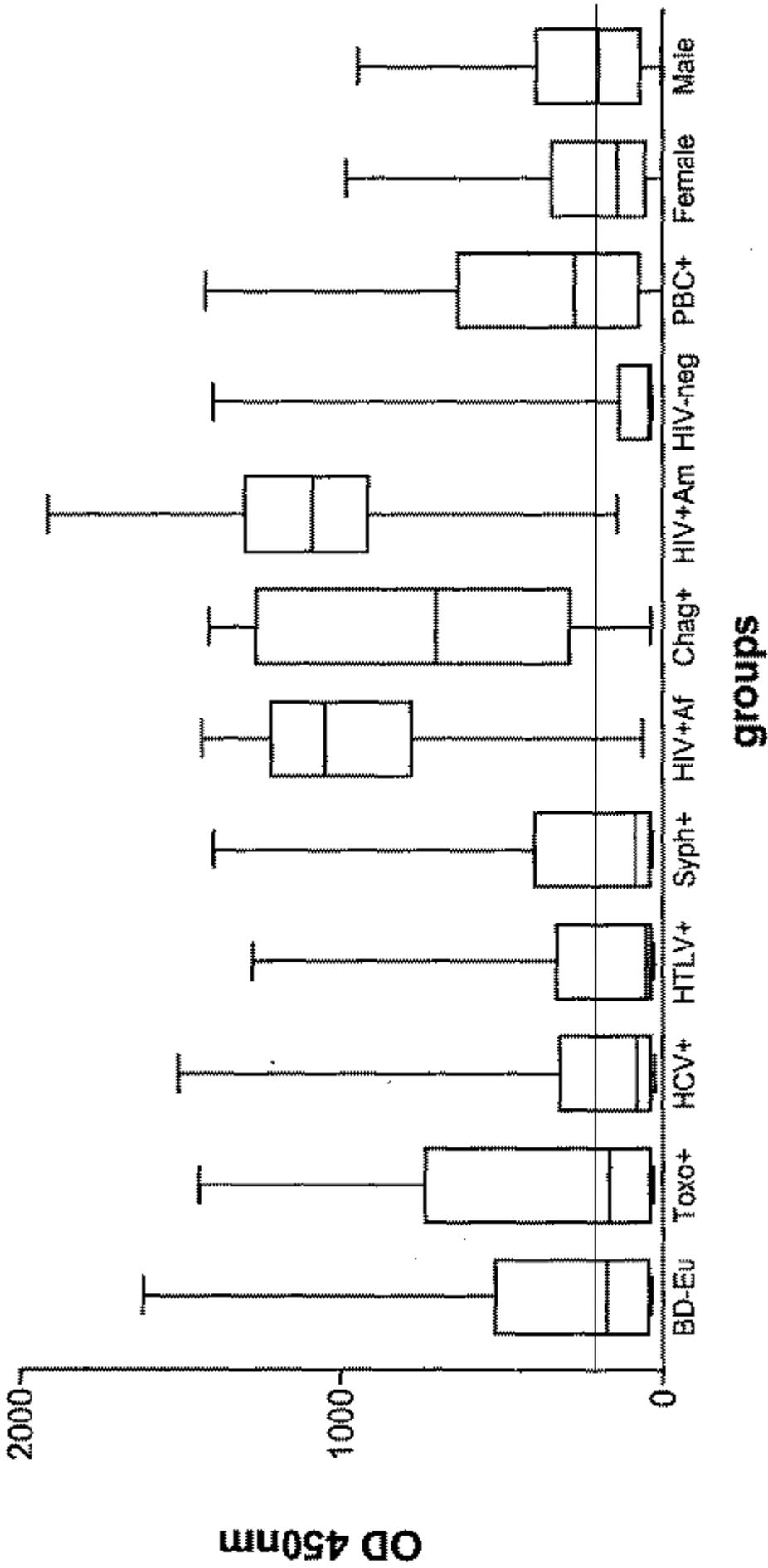


Figure 9. Diagrammes en boîtes à moustache représentant les résultats du dosage de TcCRA sur des sérums de différents groupes de sujets. Une forte réactivité est observée chez les groupes HIV+ et Chag+ (infectés par *Trypanosoma cruzi*). La figure montre aussi la réactivité de certains sérums provenant de donneurs de sang européens (BD-Eu), de personnes infectées par l'agent de la toxoplasmose (Toxo+), le virus de l'hépatite C (HCV+), le virus HTLV ou *Treponema pallidum* (Syph+). Elle indique également la réactivité des sérums d'un groupe de patients présentant une cirrhose biliaire primitive (PBC+). L'axe des ordonnées indique les valeurs d'absorbance à 450 nm en densité optique (OD).

Parmi les nombreux auto-anticorps qui réagissent contre des protéines cellulaires cardiaques qui ont été détectés dans les sérums de patients, ceux dirigés contre le récepteur β 1-adrénergiques paraissent particulièrement pertinents d'un point de vue physiopathologique [110] [111]. De ce fait, deux hypothèses majeures sont possibles pour expliquer la pathogénèse (infection virale ou auto-immunité). Ces hypothèses ne semblent pas être mutuellement exclusives parce qu'un grand nombre de réactions auto-immunes contre des protéines myocardiques semblent être déclenchées par un virus [112]. Ainsi, la ressemblance entre les DCM et la maladie de Chagas est forte. L'infection et les auto-anticorps anti-protéines cardiaques ont été décrits dans les deux maladies.

Les premiers résultats concernant TcCRA suggéraient que ces anticorps pourraient être produits contre un agent d'infection opportuniste, d'autant que ces anticorps sont fortement prévalents chez les personnes infectées par HIV. De plus, le fait que les sujets séropositifs pour HIV soient susceptibles de développer des cardiopathies similaires à la maladie de Chagas suggérait un mécanisme commun, comme proposé par Levin & Hoebeke en 2008 [113].

En conséquence, deux hypothèses pourraient expliquer l'origine des anticorps TcCRA :

- les anticorps TcCRA induisent des maladies auto-immunes par réactivité croisée avec un antigène du soi après une exposition de longue durée, par un mécanisme de mimétisme moléculaire ;
- les anticorps TcCRA sont produits en réponse à une infection ubiquitaire asymptomatique qui peut se réactiver en cas d'immunosuppression.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

1-Collections de sérums étudiés

Durant ces travaux de thèse nous avons collecté et testé plus de 2000 sérums prélevés chez 1431 individus et répartis sur 7 collections d'échantillons listées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Collections d'échantillons testées durant l'étude TcCRA.

Collection	Effectif	Nbre de prélèvements	Type	Statut	Sexe (H/F)	Age [M(ET)]	Provenance
EFS	210	210	Transversale	Terminé	134/76	39.5 (14.7)	Lyon-Lille
Pédiatrie	69	69	Transversale	Terminé	36/33	9.7 (6.0)	CHU Amiens
REDS	79	79	Transversale	Terminé	45/34	47.5 (8.5)	São Paulo (Brésil)
VIROLOGIE	395	395	Transversale	Terminé	229/166	37.5 (21.6)	CHU Lyon
HIV	174	174	Transversale	Terminé	111/63	40.1 (10.5)	CHU Lyon ; CHU St Etienne
PROOF	457	457	Longitudinale	En cours	197/260	75.5 (2.1)	CHU St-Etienne
Greffe	47	783	Longitudinale	Terminé	22/25	48(12.3)	CHU Lyon

Abréviations : H=homme / F=Femme / M=moyenne / ET=Ecart-type.

1.1-Donneurs de sang en France (EFS)

Les échantillons ont été fournis par les Etablissements français du sang (EFS) de Lyon et Lille. Les produits ont été soumis aux différents tests de dépistage obligatoires selon les bonnes pratiques de qualification du don. Les sérologies effectuées sont négatives pour les marqueurs suivants

- anticorps anti-HIV 1 et 2
- anticorps anti-HCV
- antigène HBs de HBV
- anticorps anti-HBc de HBV
- anticorps anti-HTLV 1 et 2
- sérologie syphilitique

Les 210 sérums provenaient d'individus non exposés et donc *a priori* non infectés par *T. cruzi* [45].

1.2- Sujets séropositifs pour HIV-1 (HIV)

Deux collections de sérums de personnes infectées par HIV-1 ont été testées pour la présence de TcCRA. La première a été mise à disposition par le Centre de ressources biologiques (CRB) des Hospices Civils de Lyon, et la deuxième par le Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU de Saint-Étienne. Des variables telles que l'âge, le sexe, la charge virale, le nombre de cellules CD4+ et le stade de l'infection ont également été fournies.

1.3-Patients infectés par T. cruzi (REDS)

Des échantillons de patients infectés par *T. cruzi* ont été mis à notre disposition par le « *Fundação Pro-Sangue Blood center* ». En raison des difficultés logistiques de transport international d'échantillons à risque biologique, les manipulations et les tests TcCRA ont été réalisés sur place à São Paulo, Brésil. Un descriptif détaillé de cette population qui fait partie d'une étude plus large appelée « REDS-II » a été publié récemment [114].

1.4- Enfants hospitalisés (Pédiatrie)

Cette collection a été mise à disposition par la bio-banque de Picardie, une banque d'échantillons biologiques dédiés à la recherche scientifique. Ces échantillons biologiques sont associés à des données démographiques, biologiques et cliniques. Cette collection inclut des patients hospitalisés pour diverses raisons et âgés de quelques mois jusqu'à 17 ans.

1.5-Patients de services du CHU de Lyon (Virologie)

Des échantillons de sérums caractérisés sérologiquement pour diverses infections virales ubiquitaires ont été collectés au laboratoire de virologie des

HCL Lyon-Est. Les sérums étaient positifs en IgG et/ou IgM pour les spécificités suivantes : adénovirus, virus Epstein-Barr (EBV), entérovirus, human herpes virus 6 (HHV6), virus des oreillons, parvovirus B19, virus de la rougeole, virus respiratoire syncytial (RSV), virus de la rubéole, virus varicelle-zona (VZV), virus herpès simplex 1 et 2 (HSV) et cytomégalovirus (CMV). Les tests ELISA pour le dosage de TcCRA ont été réalisés rétrospectivement au laboratoire de virologie Lyon-Est où les échantillons avaient été collectés puis stockés durant les années 2009-2010.

1.6-Cohorte « PROOF » de l'Université de Saint-Etienne (PROOF)

PROOF (*PROgnostic indicators OF cardiovascular and cerebrovascular events*) est une étude mise en place par le Service de Physiologie Clinique et de l'Exercice de l'Université de Saint-Etienne elle concerne 1000 sujets tous âgés de 65 ans lors de l'inclusion dans l'étude en 2001. L'étude PROOF vise à étudier l'impact de l'activité du Système Nerveux Autonome (SNA) sur la morbi/mortalité cardiovasculaire et cérébrovasculaire. Elle s'intéresse de ce fait aux liens entre l'activité du SNA et la cognition dans le vieillissement. Le protocole a été publié et le diagnostic du critère de jugement composite (accidents cardio- et cérébro-vasculaires) a été évalué par un comité d'experts [115]. Un premier bilan a été réalisé de janvier 2001 à décembre 2002, un deuxième de janvier 2003 à décembre 2005, le troisième s'est déroulé de janvier 2010 à Juin 2012 (**Figure 10**). Les tests TcCRA et la collecte des données cliniques sont en cours de finalisation.

D'une façon ancillaire nous allons évaluer TcCRA sur les trois périodes de l'étude. Le suivi longitudinal de la cohorte permettra d'estimer l'importance clinique et la séro-incidence de TcCRA, d'autant que cette population est suivie pendant plus de dix ans.

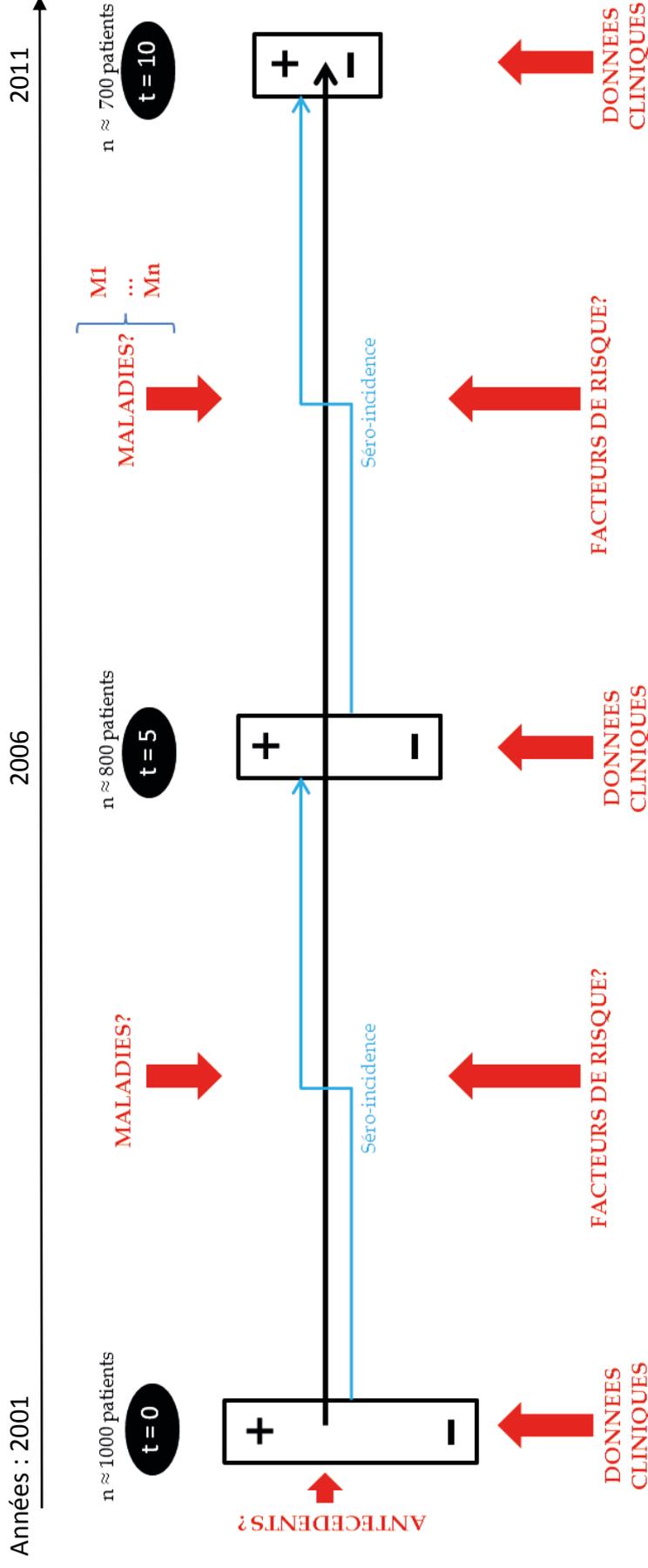


Figure 10. Déroulement de l'étude PROOF sur les trois périodes 0, 5 et 10 ans entre les années 2001 et 2011. Maladies, facteur de risque et séro-incidence sont les paramètres qui seront évalués par le dosage de TcCRA dans cette population.

1.7-Patients greffés de moelle du CHU de Lyon (Greffe)

Ces patients ont tous été inclus entre le 1^{er} janvier 2011 et le 31 juin 2011 pour un suivi d'un an. Ils ont tous été diagnostiqués pour une maladie hématologique. Au départ, nous disposions des échantillons sanguins de 61 patients. Les patients n'ayant pas subi de greffe, ayant subi une autogreffe, ayant un suivi TcCRA trop court ou n'ayant pas d'échantillon du donneur n'ont pas été inclus dans l'étude. Ainsi, pour l'analyse nous avons sélectionné 47 patients parmi les 61 effectivement greffés. La **Figure 11** montre les phases initiales d'une allogreffe des cellules hématopoïétiques. J0 est considéré comme le jour de la greffe ; les points A, B et C sont les jours de prélèvement pour le dosage de TcCRA. Le point A représente le patient à l'inclusion, le point B désigne le patient après la phase d'immuno-ablation (conditionnement) et les points C constituent le suivi de TcCRA qui peut aller au-delà d'un an pour certains patients.

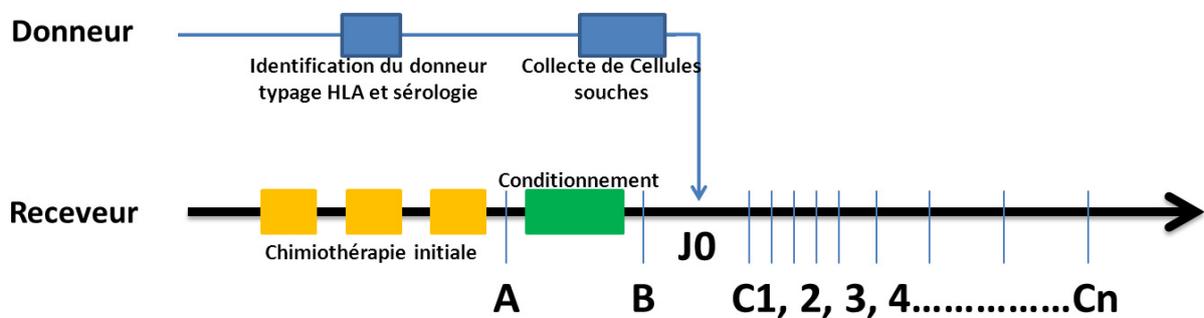


Figure 11. Schéma du processus d'allogreffe de CSH et programme des prélèvements pour le test de TcCRA

Chaque patient possède un dossier informatisé dans la base des HCL Avec l'aide de la Direction des Systèmes d'information et de l'informatique (DSII) et après avoir recueilli toutes les autorisations réglementaires préalables, nous avons extrait des données biologiques et cliniques durant une période définie entre le 31 octobre 2011 et le 31 Janvier 2013 (860 jours de suivi maximum).

Les nombres et types de transfusions réalisées entre le 31 octobre 2011 et le 31 janvier 2013 et les types et dosages de traitements administrés durant la même période ont été fournis par la DSII des HCL. Les autres informations ont été extraites d'une base de données spécialement conçue pour les patients CSHT, la base de données « Hemily »; cette base de données européenne regroupait 44 609 patients en juin 2013. Tous les patients de l'étude y sont enregistrés. L'accès à cette base nous a permis d'obtenir certaines variables importantes comme le diagnostic initial, des informations sur le conditionnement, le chimérisme post-greffe et le nombre de cellules greffées (polynucléaires, cellules CD34+, cellules CD3+, plaquettes).

2-Tests sérologiques

2.1-Tests ELISA

Durant cette étude, plusieurs immunoessais ont été optimisés en utilisant des peptides de synthèse comme antigènes. Nous avons défini les séquences de ces peptides en fonction de la question posée pour l'étude de leurs homologies. La synthèse chimique a été réalisée par un prestataire en utilisant la technique de Merrifield (**Tableau 3**).

Tableau 3. Peptides utilisés durant l'étude TcCRA.

Organisme	Protéine	Référence Infynity	Référence Uniprot	Séquences d'acides aminés
<i>T. cruzi</i>	Répétitive 69/70	TCSP	Q7M3W1	CKKAAAAPAKAAAAPAKTAAAPV
<i>T. gondii</i>	Putative	IBAG5	B9PZ84	CGAGAPAKGAGAPAKPGLTPV
Equine herpesvirus 1, 4 et 9	Tégument	IBAG10	O39779	CKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAP
Simian herpes B virus	Tégument	IBAG15	Q7T591	KAAPAAPAPAAPVPAAPAAPAAP
<i>T. cruzi</i>	Ribosomale	IBAG16	Q7M3W1	CAAAPAKAAAAP
Equine herpesvirus 1	Tégument	IBAG17	O39779	CAAAPAKSAAAP
<i>T. cruzi</i>	Ribosomale	IBAG18	Q7M3W1	CAAAPAKTAAAPV
<i>T. cruzi</i> /Equine herpes	Ribosomal	IBAG20	Q7M3W1	KKAAAAPAKSAAAPAKSAAAPV

D'une façon générale, une concentration de 1 µg/ml de peptide est diluée dans du tampon de sensibilisation (tampon carbonate, pH 9.6) puis déposée à raison de 100 µl par puits dans une plaque MaxiSorp. Les plaques sont couvertes et incubées à 4°C pendant environ 16 heures (une nuit). Après l'incubation, cette solution est éliminée par 3 rinçages successifs avec 250 µl de tampon PBS Tween. Ensuite un dépôt de 200 µl par puits de tampon de saturation PBS BSA 1% est effectué pour la saturation des sites d'adsorption libres. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, la plaque est rincée 3 fois avec 250 µl de tampon PBS Tween. Un dépôt de 100 µl par puits des échantillons dilués au 1/50^{ème} avec du tampon diluant est ensuite effectué. À cette étape la plaque est incubée 1 heure à température ambiante. Avant le dépôt du conjugué la plaque est rincée 3 fois avec 250 µl de tampon PBS Tween. Un conjugué anti-IgG humaines couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/1000 est déposé dans chaque puits. Cette étape est suivie par une incubation d'une heure à température ambiante. Après 3 lavages, une solution de substrat PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate ; 1 mg/mL de tampon pH 9,8) est déposée à raison de 100 µL/puits ; la plaque est ensuite incubée 15 minutes à l'abri de la lumière. Les densités optiques sont lues à 405 nm. Une valeur seuil de 0,5 OD a été utilisée pour la détermination de la séropositivité. Ce seuil est calculé à partir de la moyenne des DO des échantillons témoins négatifs plus 3 écarts-types de ces mêmes échantillons. La **Figure 12**, montre la reproductibilité et robustesse du test ELISA employé lors de nos dosages de TcCRA.

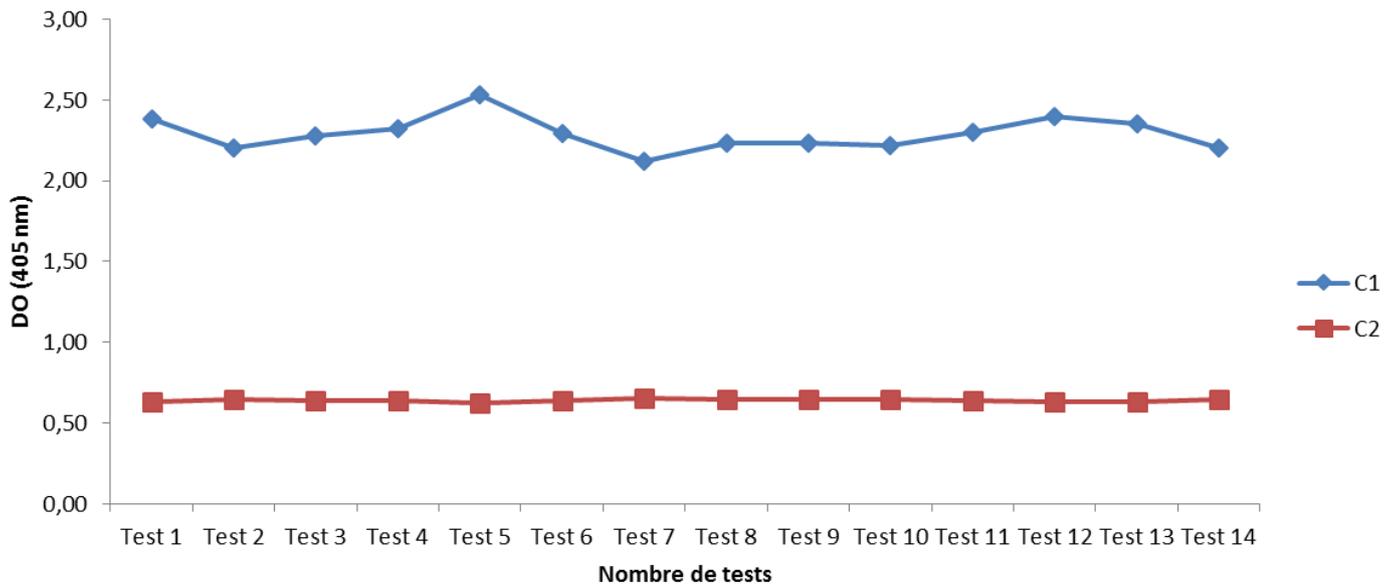


Figure 12. Reproductibilité du test ELISA pour le dosage de TcCRA. Une faible variation intra- (1%) et inter-test (3%) est observée. C1 design un control positif fort, tandis que C2 représente un control positif faible (borderline).

2.2- Tests d'immunofluorescence indirecte

Les anticorps TcCRA ont été évalués par immunofluorescence indirecte sur plusieurs types de substrats :

- HSV1 et 2, VZV, EBV, CMV, Parainfluenza 1, 2 et 3, Influenza A et B (light diagnostic™)
- Des cellules épithéliales humaines (Hep-2) (NOVA Lite™)
- le parasite *Trypanosoma cruzi* (Biomérieux/IMUNOCRUIZ).

Un protocole commun a été appliqué : 6 µg/ml de TcCRA purifié par affinité ont été incubé dans une chambre humide sur les lames pendant 1 heure à 37°C. Par la suite, les lames ont été lavées trois fois avec du PBS Tween et incubées à l'obscurité pendant 1 heure à 37°C avec un conjugué prêt à l'emploi anti-IgG humaines couplé FITC (P.A.R.I.S BI 2115 lot 12199). Après trois lavages dans du tampon PBS Tween, les lames ont été montées avec du liquide de montage (CALBIOCHEM-JA1750) pour l'observation sous un microscope à fluorescence (excitation à 488 nm) avec un grossissement 60x.

2.3-Test de Western-blot à partir d'extraits de protéines de *T. cruzi*

Un lysat de protéines obtenu à partir d'extraits totaux de protéines d'épimastigotes de *T. cruzi* a été mis à notre disposition par le Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Barcelona en Espagne. Le protocole employé pour la fabrication et le mode d'utilisation de cet extrait est détaillé dans la référence [97].

3-Obtention de la spécificité TcCRA

3.1-Purification par immuno-affinité de TcCRA

Dans le but de valider la réactivité croisée des anticorps TcCRA, 50 ml d'un échantillon de plasma TcCRA fortement positif d'un donneur de sang (sujet de sexe masculin de 51 ans) a été utilisé pour la purification par affinité. La fraction de gammaglobulines a été précipitée avec 40 % de sulfate d'ammonium. Le culot a été centrifugé à 4000 g puis dissous dans 30 ml de PBS. Après dispersion complète, la solution a été dialysée contre du PBS à 4°C pendant la nuit avec deux changements de tampons. Cette fraction a été utilisée pour la purification par immuno-affinité selon le protocole suivant : 20 mg de Dynabeads MyOne™ streptavidine T1 (Invitrogen) ont été incubés pendant 1 heure avec 20 mg/ml d'antigène TCSP de *T. cruzi* (**Tableau 3**) biotinylé. Les billes ont ensuite été lavées trois fois avec du PBS Tween 20 et incubées avec du PBS 1 % BSA pendant une heure supplémentaire pour saturer tous les sites de liaison non spécifiques. Lavées une fois après saturation, les billes ont été incubées avec 10 ml de la solution d'IgG totales pendant une heure. Après incubation, les billes ont été lavées 3 fois avec du PBS Tween 20 puis incubées pendant 10 min dans un tampon glycine-HCl (pH 2,5) pour éluer les spécificités TcCRA. Après élution, le pH a été immédiatement neutralisé à

pH 7,5 par addition de NaOH 1N. Toutes les incubations ont été effectuées à température ambiante et avant chaque étape un aimant a été utilisé durant 2 min pour isoler les billes du surnageant.

3.2-Protocoles immunisation et de production d'anticorps anti-TCSP

3.2.1-Anticorps monoclonaux de souris anti-TCSP

Dans le but d'obtenir une source constante d'anticorps anti-TCSP pour mener des études de caractérisation et de contrôle, nous avons confié à P.A.R.I.S (aujourd'hui Abliance) le développement d'un anticorps monoclonal spécifique de TCSP (peptide utilisé comme antigène pour la détection de TcCRA). Le **Tableau 4** résume le programme d'immunisation de quatre souris. Même si ce projet n'a pas abouti à l'obtention d'un anticorps monoclonal anti-TCSP, des observations intéressantes que nous détaillerons plus loin ont été mises en évidence à cette occasion.

Tableau 4. Programme d'immunisation appliqué par la société P.A.R.I.S pour le développement d'anticorps monoclonaux anti-TCSP.

Programme d'Immunisations				
Jour	Injection	Prélèvement	Date	Test Elisa
	Réception souris		18/11/2010	
J0	Injection 1 sous-cutanée, 50 µg de peptide en adjuvant complet de Freund	Prélèvement pré-immun (J0)	23/11/2010	
J21	Injection 2 intra-péritonéale 50 µg de peptide en adjuvant incomplet de Freund		14/12/2010	
J28		Prélèvement 2	21/12/2010	Direct sur peptide (J0, P2)
J42	Injection 3 sous-cutanée 50 µg de peptide en adjuvant incomplet de Freund		04/01/2011	
J49		Prélèvement 3	11/01/2011	Direct sur peptide (J0, P2, P3)
J56	Injection 4 intra-péritonéale 50 µg de peptide en adjuvant incomplet de Freund		18/01/2011	
J70		Prélèvement 4	01/02/2011	Direct sur peptide (J0, P3, P4)
J77	Injection 5 sous-cutanée 50 µg de peptide en adjuvant incomplet de Freund		08/02/2011	
J84		Prélèvement 5	15/02/2011	Direct sur peptide (J0, P4, P5)

3.2.2-Anticorps polyclonaux anti-TCSP

Nous avons également considéré une source d'anticorps polyclonaux anti-TCSP et avons décidé d'immuniser des lapins pour obtenir des anticorps polyclonaux d'une diversité plus large et probablement plus proche de celle des TcCRA de sérums humains.

La production des anticorps polyclonaux anti-TCSP a été réalisée par un prestataire externe (Protéogenix). Deux lapins New Zealand White ont été immunisés par le peptide couplé à la protéine Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). Après avoir développé des titres supérieurs à 1:64000, les sérums des lapins ont été purifiés par affinité sur TCSP. Les sérums préimmuns ont été prélevés à des fins de référence négative.

4-Recherches *in silico*

4.1-UniProt

Pour la recherche de similitudes de séquence nous avons utilisé UniProt (Universal Protein Resource). C'est un Consortium, formé par l'Institut Suisse de Bioinformatique (SIB), l'*European Bioinformatics Institute* (EBI) et la *Protein Information Resource* (PIR). UniProt donne accès à des ressources librement accessibles de séquences de protéines et des information de haute qualité concernant ces protéines [116].

4.2-PEP-FOLD

PEP-FOLD est une approche informatique qui vise à prédire les structures peptidiques à partir de séquences d'acides aminés [117].

5-Analyse statistique

L'ensemble des données a été saisi sur un tableur Excel, puis analysé à l'aide du logiciel SPSS 17.0. Les tests de Student's ou de Mann-Whitney ont été réalisées pour étudier les variables quantitatives. Les variables qualitatives ont été analysées à l'aide du test du Khi-deux ou du test exact de Fisher. Les différences sont considérées comme significatives pour $P < 0,05$.

Chapitre 3 : Résultats

Ce projet de recherche est fondé sur la caractérisation d'une nouvelle spécificité anticorps TcCRA, sa cible et son agent inducteur. Ainsi, une stratégie à deux volets a été mise en place 1) exploration épidémiologique par la recherche d'une population à forte prévalence de TcCRA; 2) travail de biologie moléculaire et de recherche *in silico*. Nous présenterons ci-dessous les résultats par ordre chronologique de leur obtention. Ils ont été organisés en 2 parties :

La première partie des résultats concerne un ensemble de données destinées à mieux caractériser la spécificité TcCRA. Une partie de ces données a été regroupée dans un article publié en 2013 dans Plos One. La deuxième partie concerne les patients greffés de moelle et fait l'objet d'un deuxième article en cours de soumission pour publication.

Première partie : caractérisation de la spécificité TcCRA

1-Observations chez les personnes infectées par HIV

Suite aux résultats préliminaires présentés sur la **Figure 9** et discutés plus haut, nous avons recherché la spécificité TcCRA chez des personnes infectés par HIV. L'objectif était d'associer le taux d'anticorps TcCRA à l'état clinique, au stade de l'infection HIV et au statut immunitaire de ces patients.

De façon inattendue, le groupe de personnes infectées par HIV testé récemment a présenté une prévalence totalement différente de celle observée en 1999 (**Figure 9**). Ainsi, afin de comparer les résultats générés en 2011 avec ceux générés en 1999, nous avons testé comme référence un groupe de donneur de sang (BD-Eu) et un autre groupe de personnes infectées par *T. cruzi* (Tryp+) (**Figure 13**). Nous avons observé que la prévalence de TcCRA chez les

personnes infectées par HIV s'est normalisée par rapport aux donneurs de sang. La différence reste significative entre le groupe Tryp+ et les deux autres groupes (**Tableau 5**).

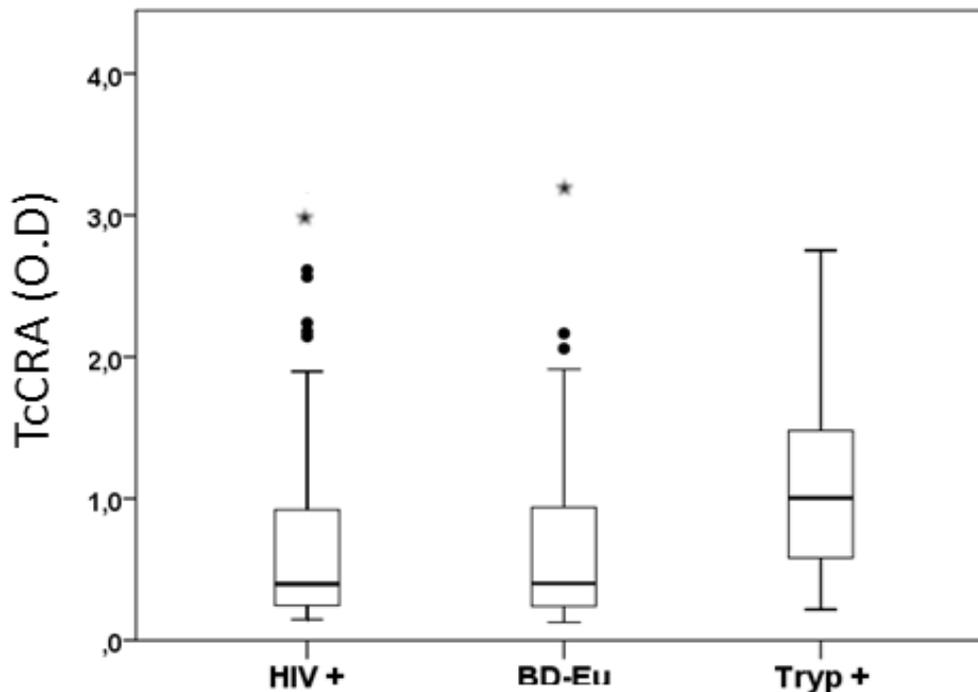


Figure 13. Distribution de la spécificité TcCRA dans trois populations différentes : donneurs de sang (BD-Eu), personnes infectées par HIV (HIV+) ou par *T. cruzi* (Tryp+). Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes BD-Eu et HIV+ ; en revanche, les individus infectés par *T. cruzi* ont montré des taux élevés d'anticorps TcCRA, statistiquement différents des deux autres groupes.

Tableau 5. Comparaison des taux d'anticorps TcCRA entre les trois groupes HIV, BD-Eu et Tryp+. Le test T de Student's montre une différence significative entre le groupe Tryp+ et les groupes HIV+ et BD-Eu.

Comparaison des groupes	Différences entre les moyennes	Intervalle de confiance de 95% de la différence		Valeur P
		Inférieure	Supérieure	
HIV+*BD-Eu	0.005	-0.13	-0.14	0,939
HIV+*Tryp+	-0.44	-0.60	-0.29	0,000
BD-Eu*Tryp+	-0,45	-0.63	-0.27	0,000

Ainsi, par opposition aux deux groupes BD-Eu et Tryp+ qui ont conservé la même séroprévalence entre les années 1999 et 2011, les deux groupes des sujets séropositifs pour HIV testé en 1999 et 2011 ont présenté une séroprévalence de TcCRA très différente. Les échantillons testés en 1999 n'étant plus disponibles (volume épuisé), les deux collections de sérums n'ont pas pu être testées en parallèle sur le nouveau lot d'antigène TCSP.

Afin d'explorer plus en détails la spécificité TcCRA dans la population HIV+ de 2011 nous avons comparé les deux sous-groupes TcCRA négatif (TcCRA-) et TcCRA positif (TcCRA+). Plusieurs variables ont été testées mais aucune différence n'a été trouvée significative (**Tableau 6**). Le sous-groupe TcCRA+ ne semble être lié ni au statut immunologique des patients ni au stade de l'infection. Les analyses n'ont pas été possibles dans le groupe HIV+ de 1999 en raison de l'indisponibilité de l'information.

Tableau 6. Étude comparative de la spécificité TcCRA chez des personnes séropositives HIV. Les patients ont été classés en deux sous-groupes en fonction de l'absence ou non d'une immunité TcCRA. Les deux sous-groupes ont été comparés vis-à-vis de différents variables listées dans la première colonne. Le test t de Student's appliqué pour la variable continue et le test exact de Fisher utilisé pour les variables catégorielles n'ont montré aucune différence significative entre les deux groupes testés.

Variables	Modalités	TcCRA-	TcCRA+
Age [moyenne (ET)]	Ans	40,41 (10,6)	37,81 (10,8)
Sexe (%)	Homme	27 (55)	24 (75)
	Femme	22 (45)	8 (25)
Risque de transmission (%)	Homosexuel	19 (38,8)	13 (40,6)
	Hétérosexuel	28 (71,4)	15 (46,9)
	Toxicomane	2 (4,1)	4 (12,5)
Clasificación CDC (%)	A	35 (71,4)	21 (65,6)
	B	8 (16,3)	6 (18,8)
	C	6 (12,2)	5 (15,6)
SIDA (%)	Oui	7(14,3)	5 (15,6)
	Non	42 (85,7)	27 (84,4)
CD4+ [moyenne (ET)]	Nbre de CD4/mm ³	339,8 (210,7)	366,6 (258,7)
Charge virale [moyenne (ET)]	copies/ml	19770 (84281)	14825 (33167)
ALAT [moyenne (ET)]	UI/l	25 (20,2)	37,03 (34,1)
ASAT [moyenne (ET)]	UI/l	22,8 (9,4)	34,7 (35)

Abréviations : ET= Ecart-Type / SIDA= Syndrome d'Immuno-Déficienciae Acquisae / CDC= Centers for Disease Control and Prevention / UI = unité internationale / ALAT = Alanine Amino Transférase / ASAT = Aspartate Amino Transférase.

2-Réactivité croisée de TcCRA

Les données préliminaires ayant montré que les sérums de personnes non infectées par *T. cruzi* réagissent sur un peptide dérivé d'une protéine du parasite, les anticorps TcCRA purifiés par affinité ont été incubés avec des formes épimastigotes de parasite. La **Figure 14** montre la réactivité de TcCRA (B) par immunofluorescence sur le parasite en comparaison avec un contrôle négatif (A).

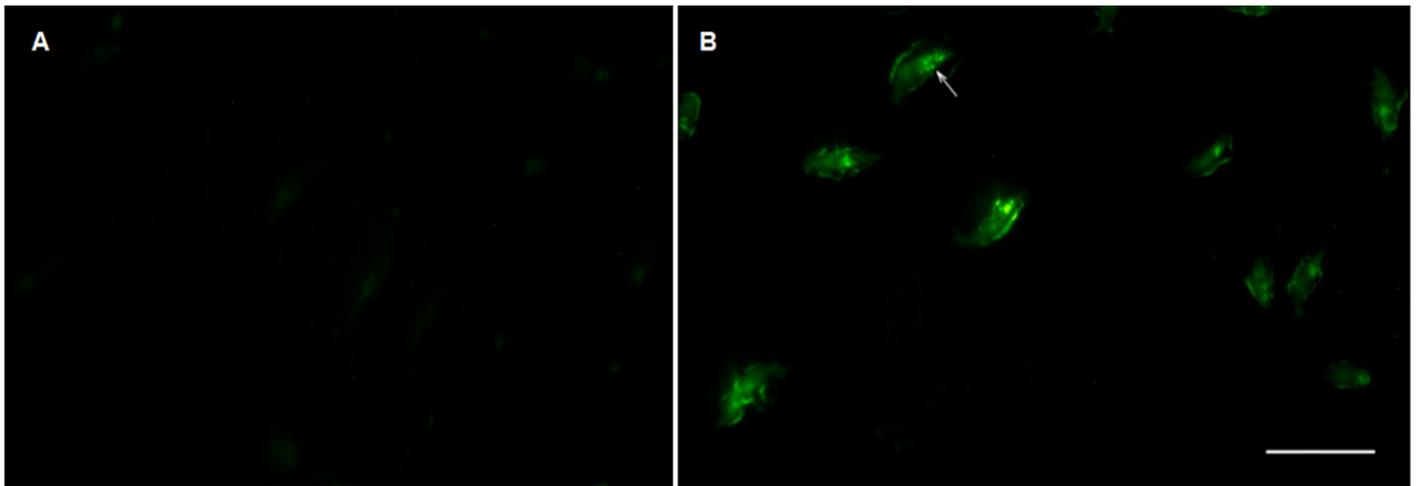


Figure 14. Immuno-réactivité de TcCRA purifié par affinité (B) par rapport à un témoin négatif (A) sur les formes épimastigotes de *T. cruzi* par microscopie à fluorescence avec un grossissement 60x. La barre horizontale intégrée dans l'image B représente une échelle de 20 μm .

Cette figure montre que les anticorps TcCRA reconnaissent des protéines natives exprimées par le parasite. Ainsi, la réactivité croisée décrite initialement sur un peptide est validée par la reconnaissance spécifique d'une protéine parasitaire. Par la suite, les anticorps TcCRA ont été testés sur un western blot d'extraits totaux des protéines de *T. cruzi*. La **Figure 15** indique la réactivité de TcCRA (1) en comparaison avec celle d'un patient infecté par le parasite (2).



Figure 15. Profil de reconnaissance de TcCRA (1) et d'un sérum de patient infecté par *T. cruzi* (2) sur un western blot d'extrait total de protéines de parasite.

Les anticorps purifiés par affinité montrent une reconnaissance spécifique de deux bandes sur le western blot, entre 35 et 40 KDa. La bande de plus forte masse moléculaire est commune avec le profil de réactivité du patient infecté par *T. cruzi*. En conclusion, les anticorps TcCRA réagissent avec un antigène de *T. cruzi*, ce qui suggère l'existence d'une réactivité croisée entre *T. cruzi* et un agent inconnu responsable de l'induction de TcCRA. L'objectif est de tenter l'identification de cet agent, notamment en déterminant la séroprévalence de TcCRA dans différentes populations.

3- Séroprévalence de TcCRA en fonction de l'âge et de sexe

Nous avons testé la spécificité TcCRA dans les sérums de donneurs de sang qualifiés après dépistage négatif pour tous les marqueurs infectieux obligatoires (n = 210 ; Âges compris entre 18 et 60 ans). Étant donné la difficulté pour organiser une étude de séroprévalence chez de jeunes individus en bonne santé en dessous de l'âge de 18 ans, nous avons estimé cette séroprévalence à partir d'une population d'enfants en milieu hospitalier (n=69) hospitalisés pour une autre cause qu'une maladie infectieuse. La **Figure 16** montre une augmentation constante de la séroprévalence de TcCRA de l'enfance à l'âge adulte pour se stabiliser autour de 45% à partir de l'âge de 35 ans.



Figure 16. Séroprévalence cumulative de TcCRA en fonction de l'âge (intervalles de 1 an)

Aucune différence significative pour la séroprévalence TcCRA n'a été trouvée entre les hommes et les femmes (**Tableau 7**).

Tableau 7. Séroprévalence chez les donneurs de sang en fonction du sexe et de l'âge.

Donneurs de sang (n=210)	Hommes (n=134)	Femmes (n=76)	Valeurs de <i>P</i>
TcCRA positive (%)	57 (42.5)	38 (50)	0.315
Age, moyenne ans (ET)	41.1 (14.6)	36.7 (14.4)	0.37

Généralement, la prévalence d'une infection est calculée à partir de l'ensemble des spécificités anticorps générés en réponse à l'infection. Les 45% calculés comme prévalence de TcCRA à l'âge de 35 ans ne reflètent pas nécessairement la valeur réelle qui peut être plus élevée étant donné que TcCRA est une seule spécificité dont on ignore si elle représente un épitope immunodominant au cours de la réponse immune vis-à-vis de l'agent infectieux susceptible d'en être à l'origine. Néanmoins, l'augmentation de la prévalence de cette spécificité au cours de la vie jusqu'à 35 ans suggère un contact avec cet agent inconnu tout au long de la première moitié de la vie.

4-Distribution de l'intensité de la réactivité TcCRA dans une population de donneurs de sang

La prévalence des anticorps TcCRA dans la population générale est voisine de 45 %. Cette séroprévalence a été calculée à partir d'un seuil analytique de 0,5 DO pour la discrimination des individus TcCRA- et TcCRA +. La **Figure 17 A**, montre la répartition des densités optiques pour TcCRA chez 210 donneurs de sang : chez les sujets immunoréactifs (DO > 0,5) la majorité des signaux 25 % sont inférieurs à 1,00, 15 % sont compris entre 1,00 et 2,00 et 5 % ont un signal supérieur à 2. La **Figure 17 B**, étudie la décroissance du signal en fonction de la dilution de l'échantillon chez cinq donneurs de sang présentant une réactivité

positive pour TcCRA et chez trois donneurs ne présentant aucune réactivité. Les sérums positifs montrent des pentes de décroissance relativement proche avec des translations sur l'axe des abscisses en fonction du titre du sérum.

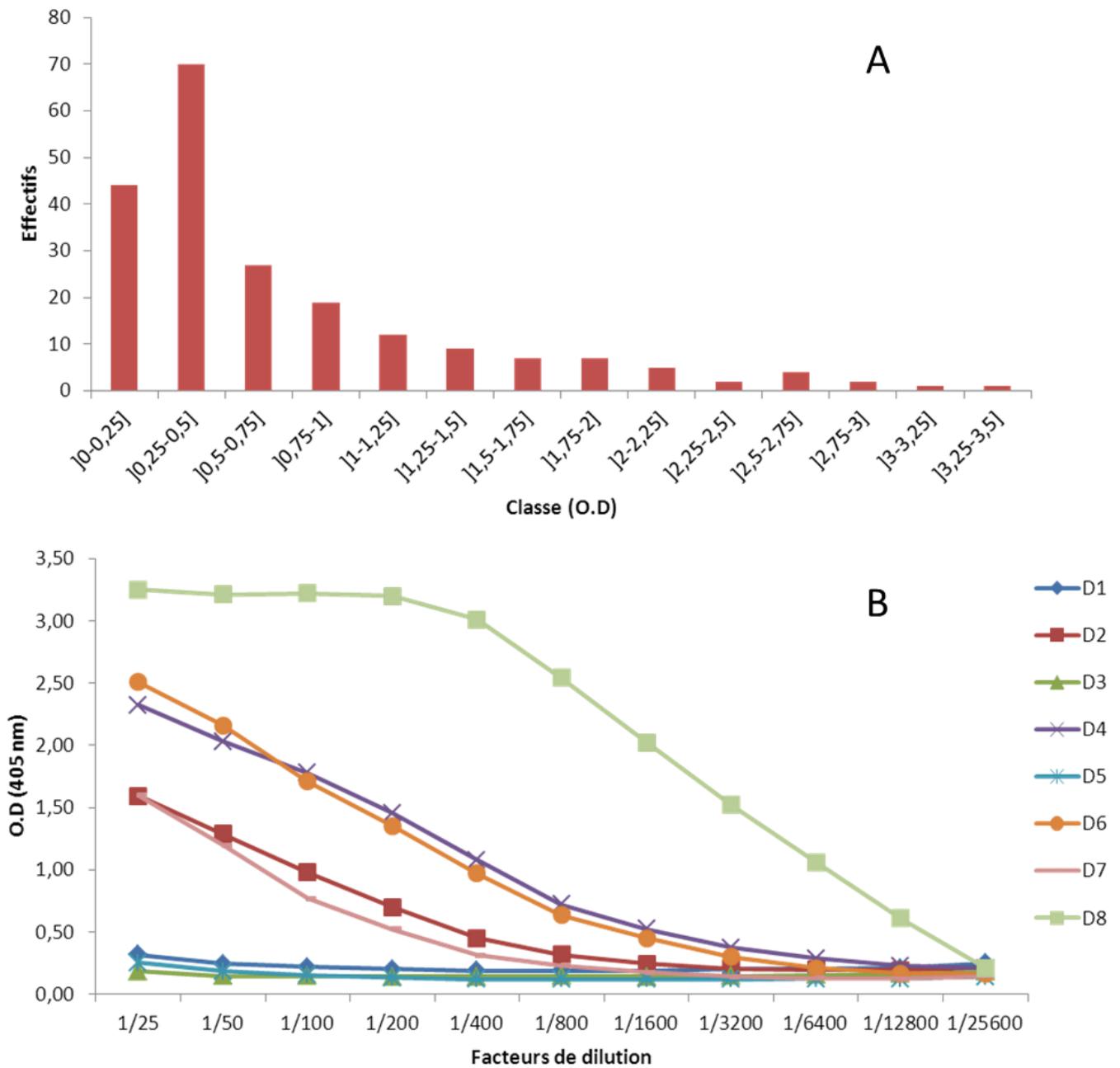


Figure 17. Distribution (A) et titrage (B) de TcCRA dans une population de donneurs de sang.

5- TcCRA et autres sérologies virales

Nous venons de montrer que les anticorps TcCRA sont induits par un agent fortement prévalent acquis au cours de la première moitié de la vie. Afin de voir si une corrélation avec un agent infectieux connu pourrait être établie, 395 échantillons de sérums provenant de patients testés positifs en sérologie pour différents virus ont été évalués pour la spécificité TcCRA. Chaque échantillon était testé pour au moins une des sérologies virales suivantes en IgG : HSV 1/2, EBV, HHV-6, CMV, VZV, adénovirus, parvovirus B19, virus des oreillons, virus de la rubéole, virus respiratoire syncytial, virus de la rougeole et entérovirus. Le **Tableau 8** montre la séoprévalence de TcCRA par rapport à chacune des sérologies virales évaluées. L'hypothèse nulle (association des sérologies virales avec TcCRA) a été rejetée, ($p < 0,0001$), appuyant l'idée qu'il n'y a pas d'association entre la spécificité TcCRA et les autres virus testés.

Tableau 8. Étude de la spécificité TcCRA en fonction de la présence ou non d'une réactivité IgG vis-à-vis de différents virus. Les valeurs de p calculées en utilisant des tests de proportion simples sont « 0,0001 » pour chaque sérologie virale.

Présence ou absence d'IgG vis-à-vis des spécificités suivantes	TcCRA		discordance (%)
	-	+	
Adénovirus	-	3	20/52
	+	19	(38.4)
Virus Epstein Barr (EBV)	-	15	129/257
	+	113	(50.1)
Entérovirus	-	15	48/100
	+	30	(48)
Human Herpes Virus 6 (HHV6)	-	11	53/110
	+	47	(48.1)
Virus des oreillons	-	7	39/82
	+	36	(47.5)
Parvovirus B19	-	16	56/110
	+	40	(50.9)
Virus de la rougeole	-	16	53/104
	+	38	(50.9)
Virus Respiratoire Syncytial (RSV)	-	2	26/44
	+	25	(59)
Virus de la rubéole	-	4	45/87
	+	44	(51.7)
Virus Varicelle Zona (VZV)	-	3	95/185
	+	93	(50.2)
Virus Herpès Simplex 1&2 (HSV)	-	30	89/191
	+	70	(46.5)
Cytomégalovirus (CMV)	-	53	132/263
	+	83	(50.1)

6-Recherches *in silico*

6.1-Homologie de séquence

Un travail de recherche *in silico* a été réalisé à partir de la séquence peptidique TCSP (AAAPAKAAAAPAKTAAAPV) du fragment répété **Q7M3W1** de la protéine ribosomale 60S L19 de *T. cruzi*. Cette séquence peptidique porte des similarités avec plusieurs protéines de *T. cruzi* autres que celles qui sont présentées dans la **Figure 8**. La particularité que partagent toutes ces protéines se retrouve dans la présence de motifs répétés riches en alanine et en proline (**Tableau 9**).

Tableau 9. Homologies de séquences entre le motif TCSP de la protéine ribosomale 60S L19 de *T. cruzi* et d'autres protéines de ce même parasite.

Similarité	Protéine	Numéro d'accèsion GENBANK
<pre> AAAPAKAAAAPAKTAAAPV AAADTGAAAAPAAA-AEPE *** : ***** : * * </pre>	Protéine ribosomale P0	Q4E3A4
<pre> AAAPAKAAA--APAKTAAAPV TAAPAAAAAAAAAPAAAAKKE :**** ** * : ** </pre>	Protéine ribosomale P1	P26643
<pre> AAAPAKAAAAPAKTAAAPV ASAPTAAAAA-SSGAAAPA *:** : **** :. ****. </pre>	Protéine ribosomale P2-α	Q26944
<pre> AAAPAK-AAAAPA--KTAAAPV SAAPAAGDAAAPAAAAGGAAAPA :**** ***** ****. </pre>	Protéine ribosomal P2-β	P26795
<pre> AAAPAKAAAAPAKTAAAPV PKPAAKPAAKPAAKAPAK ** ** * * * </pre>	RNA binding Protein 1	Q66XC8
<pre> AAAPAKAAAAPAKTAAA-PV VSAPAKAAAPPAAARSAPPH .:***** ** : : * * </pre>	Antigène Tc40	Q26872

(*) Indique les positions qui ont un résidu entièrement conservé, (:) indique la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires et (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires

Les alignements de séquence à l'aide de BLAST avec la séquence TCSP n'ont révélé aucune similitude avec des agents infectieux connus qui pourrait expliquer les niveaux de séroprévalence observés chez les individus non exposés à *T.cruzi*. Cependant, la recherche d'homologie en utilisant la totalité

de la région répétée référencé **Q7M3W1** (97 acides aminés) a montré deux similarités intéressantes. La première concerne la lipoprotéine **V5AYY3** de *Toxoplasma gondii*, l'agent de la toxoplasmose (**Figure 18**).

```

601  GGGDSASGKPGGAPAGLVKKPDLPKPGAVVAKTDTGAKPGPPAAKSDAKPGATPAKPGAT  660  V5AYY3
1    -----AAPA-----KAAAAPAK-AAAAPAKAAAAPAKAAAA  30   Q7M3W1
      .***                .:. * *.  ** : ** .*:*** .*:

661  PAKPGVTPAKPDATPAKPGATPAKPGATPAKPAALSAPVKPGSTPVKPGVGAPAKPGLTPV  720  V5AYY3
31   PAKAAAAPAKAAAAPAKAAAAPAKAAAAPAKTAAAAPAKAAAAPAKAA-AAPA-----  82   Q7M3W1
      *** ..:***  *:*** .*:*** .*:*** * :**.* .:.*. * . .***

721  KPGLSTPVKPGGLSTPAKPGGLTPVKPGVGAPAKPGLTPVKPGVGAPAKPGLTPVKPGAGAP  780  V5AYY3
83   -----KTAAAPVGGKAGGKK-----  97   Q7M3W1
      * . :** .*.

```

Figure 18. Alignement entre la région répétée Q7M3W1 et la lipoprotéine V5AYY3. (*) indique les positions qui ont un résidu entièrement conservé, (:) indique la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires et (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires.

La deuxième plus forte homologie concerne la protéine tégumentaire **O39779** des virus herpès équins (EHV 1, 4 et 9) (**Figure 19**).

```

121  VHGLPPSDSNVTQSTKEPPKPAVETPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPA  180  O39779
1    -----AAPAKAAAAP----AKAAAA----PAKAAAA--  23   Q7M3W1
      *****:*****  **:***  ***:***

181  AAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAK  240  O39779
24   --PAKAAAA----PAKAAAA----PAKAAA----APAKAAAAP----AKAAAAPA----K  61   Q7M3W1
      ***:***  ***:***  ***:***  *****:*****  **:*****  *

241  SAAAPAAAPAKSAAAPA---AAPAKSAAAPAAAPAKDQTKSAAEVKPAKDQAKDQAKDQ  297  O39779
62   T---AAAAPAKAAAAPAKAAAAPAKTAAAPVGGKAGGKK-----  97   Q7M3W1
      : *****:*****  *****:*****.. * :.

```

Figure 19. Alignement entre la région répétée Q7M3W1 et la protéine tégumentaire O39779 des virus herpès équins 1, 4 et 9. (*) indique les positions qui ont un résidu entièrement conservé, (:) indique la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires et (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires.

Ces régions homologues ont été synthétisées sous forme de deux peptides (AGAPAKGAGAPAKPGLTPV ou IBAG5) et (SAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAP ou IBAG10) qui correspondent à la similarité de TCSP respectivement avec

V5AYY3 et **O39779**. Les résultats de l'activité sérologique de ces peptides seront rapportés plus loin.

Il est intéressant de noter que le fragment **Q7M3W1** a été classé dans la superfamille du gène 22 du virus varicelle-zona dans la base de données PIRSF (*Protein Information Resource SuperFamily*). Cette classification «robotisée» est basée sur les relations évolutives entre les protéines et permet l'annotation des fonctions biochimiques et biologiques des protéines. **Q7M3W1**, seule protéine dérivée d'un organisme eucaryote, a été listé avec plusieurs protéines virales dont la majorité sont des protéines de téguments appartenant à des agents de la sous-famille des *alpha-herpesviridae* (**Figure 20**).

PIRSF Family Hierarchy	
i	Protein Classification
	PIRSF003516 varicella-zoster virus gene 22 protein (33)
	Q7M3W1 <i>Euk/Euglenozoa :: Trypanosoma cruzi :: Repetitive protein antigen 69/70 (Fragment)</i>
	A4GE96 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	A6XEB1 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	A8I3I4 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	B0CMS9 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	O39266 <i>Virus :: Equid herpesvirus 4 (Equine herpesvirus 4) :: 24</i>
	P09278 <i>Virus :: Varicella-zoster virus (strain Dumas) (HHV-3)... :: Deneddylase ORF22; (EC=3.4.19.12; EC=3.4.22.-;...</i>
	P10220 <i>Virus :: Human herpesvirus 1 (strain 17) (HHV-1) (Huma... :: Deneddylase UL36; (Short=pUL36; EC=3.4.19.12;</i>
	P28955 <i>Virus :: Equine herpesvirus 1 (strain Ab4p) (EHV-1) (E... :: Deneddylase ORF24; (EC=3.4.19.12; EC=3.4.22.-)</i>
	P89459 <i>Virus :: Human herpesvirus 2 (strain HG52) (HHV-2) (Hu... :: Deneddylase UL36; (Short=pUL36; EC=3.4.19.12;</i>
	Q0Q858 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q8D1 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q8K4 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q8S7 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q973 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q9E6 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q9L9 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0Q9U2 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0QA15 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q0QA88 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Putative uncharacterized protein</i>
	Q2PJ42 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	Q2QBE0 <i>Virus :: Cercopithecine herpesvirus 16 (CeHV-16) (Herp... :: UL36</i>
	Q4JQX9 <i>Virus :: Varicella-zoster virus (strain Oka vaccine) (... :: Deneddylase ORF22; (EC=3.4.19.12; EC=3.4.22.-;...</i>
	Q5Y0R6 <i>Virus :: Cercopithecine herpesvirus 2 :: Very large tegument protein</i>
	Q65553 <i>Virus :: Bovine herpesvirus 1 :: UL36</i>
	Q6QCN3 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	Q6QCV5 <i>Virus :: Human herpesvirus 3 (HHV-3) (Varicella-zoster... :: Tegument protein</i>
	Q6S6P7 <i>Virus :: Equid herpesvirus 1 (Equine herpesvirus 1) :: Very large tegument protein</i>
	Q6X248 <i>Virus :: Bovine herpesvirus 5 :: UL36 very large tegument protein</i>
	Q77CD4 <i>Virus :: Bovine herpesvirus type 1.1 :: Very large virion protein (Tegument)</i>
	Q7T591 <i>Virus :: Cercopithecine herpesvirus 1 (CeHV-1) (Simian... :: Large tegument protein</i>
	Q7T5D9 <i>Virus :: Cercopithecine herpesvirus 1 (CeHV-1) (Simian... :: Very large tegument protein</i>
	Q9E1Z4 <i>Virus :: Cercopithecine herpesvirus 9 (Simian varicell... :: Tegument protein</i>

Figure 20. Classification PIRSF0033516 des protéines apparentées à la protéine du gène 22 du virus de la varicelle.

L'analyse de séquence effectuée sur ce cluster de protéines montre des homologies intéressantes de **Q7M3W1** non seulement avec les EHV-1, -4 et -9 mais aussi avec une autre protéine d'un herpesvirus simien, *Cercopithecine herpesvirus 1* (encore appelé virus B simien). Un motif répété poly-alanine et poly-proline a été identifié sur la protéine **Q7T591** de cet agent ; ainsi le peptide correspondant (AAPAAPAAVPAAPAAPAAP ou IBAG15) a été synthétisé. La **Figure 21**, représente la similarité de séquence de TCSP et les peptides IBAG5 (A), IBAG10 (B) et IBAG15 (C).

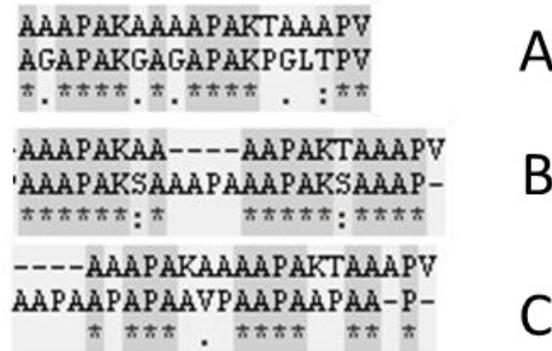


Figure 21. Similarité entre le résidu TCSP de *T. cruzi* et les peptides IBAG5 dérivé de *T. gondii* (A), IBAG10 dérivé d'EHV-1 (B) et IBAG15 dérivé de CeHV-1(C). (*) indique les positions qui ont un résidu entièrement conservé, (:) indique la conservation entre les groupes de propriétés fortement similaires et (.) indique la conservation entre les groupes de propriétés faiblement similaires.

6.2-Recherche de l'épitope de TcCRA

Un test ELISA a été développé dans le but de rechercher une corrélation entre la réactivité vis à vis des peptides présentés sur la **Figure 21** et la réactivité vis-à-vis de TCSP. Aucune réactivité n'a été observée ni avec IBAG5 (*Toxoplasma gondii*) ni avec le peptide IBAG15 (*Cercopithecine herpesvirus1*).

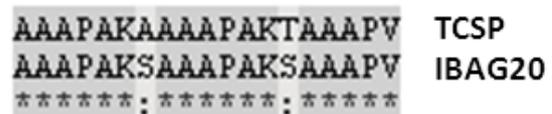


Figure 22. Alignement entre TCSP et IBAG20.

En revanche, le peptide IBAG10 a été trouvé réactif chez une minorité de donneurs de sang, avec une fréquence qui ne dépasse pas 1%. Dans le but d'optimiser la réponse observée avec IBAG10, nous avons synthétisé un peptide appelé IBAG20 en changeant deux acides aminés dans la séquence TCSP. IBAG20 est donc l'équivalent d'IBAG10 en éliminant le « gap » (AAPA) observé sur la **Figure 21**, B. La **Figure 22** montre l'alignement entre TCSP et IBAG20.

En test ELISA, le peptide IBAG20 produit exactement la même réactivité avec la même fréquence qu'IBAG10. Autrement dit, la même minorité de donneur de

sang qui réagit avec IBAG10 réagit aussi avec IBAG20. En conclusion, nous avons montré que parmi les individus TcCRA+ seulement une faible minorité reconnaît les peptides IBAG10 et IBAG20.

Afin de comparer les réactivités anti-peptides, les sérums de deux individus ont été sélectionnés pour un test de compétition réciproque qui emploie TCSP, IBAG10 et IBAG20. Le premier sérum présente un profil (TcCRA « + », anti IBAG10 «+» et anti-IBAG20 «+») et le deuxième sérum un profil, (TcCRA « + », anti-IBAG10 «-» et/ou anti-IBAG20 «-») (**Figure 23**).

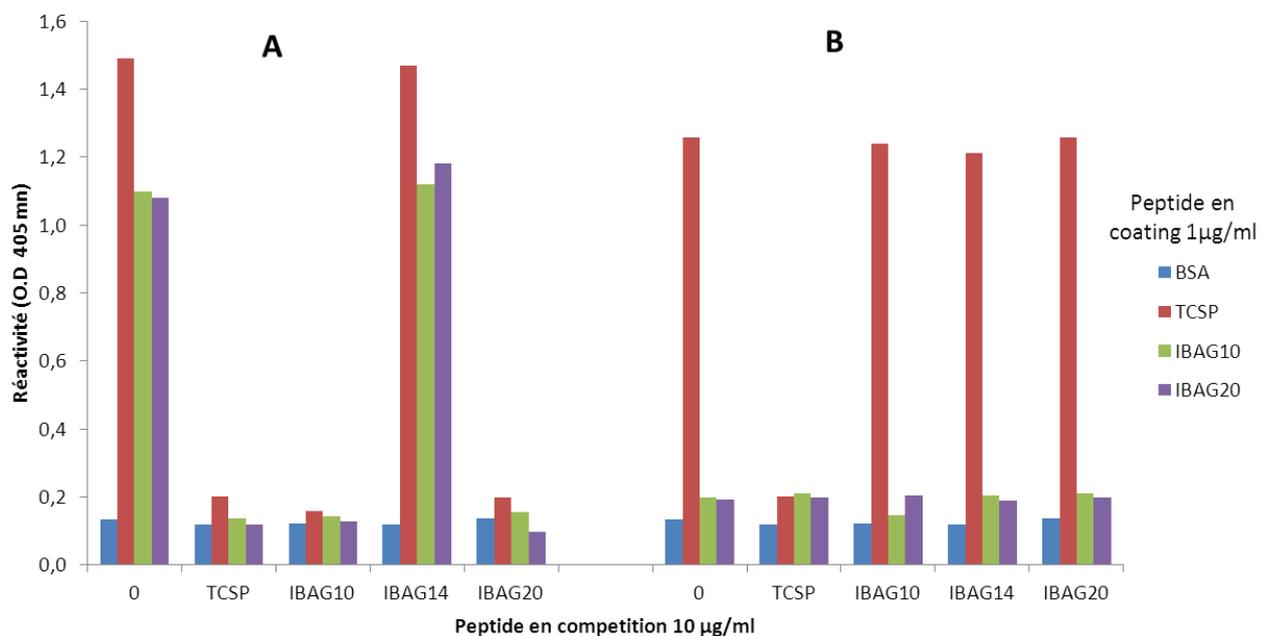


Figure 23. Test de compétition réciproque vis-à-vis de trois peptides différents TCSP, IBAG10 et IBAG20. Le test ont été effectué avec des sérums de donneurs de sang présentant deux profils différents : profil A (TcCRA « + », anti IBAG10 «+» et/ou anti-IBAG20 «+») et profil B (TcCRA «+», anti-IBAG10 «-» et/ou anti-IBAG20 «-»). La BSA (*Bovine serum albumin*) et IBAG14 ont servi de contrôles négatifs de la compétition.

Sur la **Figure 23**, les colonnes « 0 » correspond à une absence de compétition : le sérum A réagit vis-à-vis des trois spécificités (TCSP, IBAG10 et IBAG20) et le sérum B ne reconnaît que TCSP. Le peptide IBAG14 est également utilisé comme contrôle négatif (peptide non compétiteur). Quand TCSP (10 µg/ml) est

mis en compétition (colonne TCSP de la **Figure 23**), le sérum A perd toute sa réactivité vis-à-vis de TCSP, IBAG10 et IBAG20. Les mêmes observations sont faites pour ce sérum quand IBAG10 ou IBAG20 est utilisé comme compétiteur. Pour le sérum B, mono-réactif vis-à-vis de TCSP, aucune compétition n'est observée en dehors de TCSP **Figure 23**. Il est postulé que l'infection par le candidat agent inducteur de TcCRA stimule la production de différents types d'anticorps présentant des réactivités croisées plus ou moins importantes avec d'autres peptides de structure voisine. Nous avons analysé *in-silico* la structure de l'antigène TCSP, nous avons utilisé le logiciel PEP-FOLD pour prédire les structures secondaires des peptides concernés. Nous constatons que TCSP adopte une structure secondaire formée par deux hélices α , la première étant constituée à partir du peptide (PAKAAAA ou IBAG16) et la deuxième à partir du peptide (PAKTAAA ou IBAG18) (**Figure 24**).

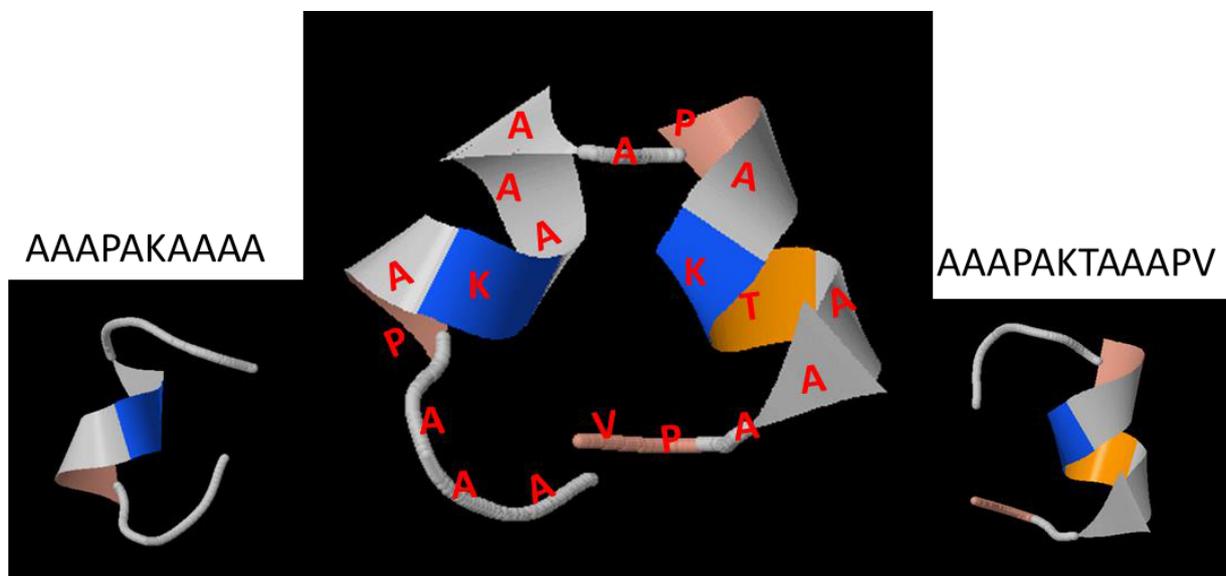


Figure 24. Prédiction de la structure de l'antigène TCSP de *T. cruzi* d'après le logiciel PEP-FOLD. Le logiciel propose une structure secondaire formée par deux hélices α .

Ces deux peptides ont été synthétisés dans l'objectif d'affiner la connaissance de l'épitope sur TCSP qui est probablement localisé dans l'une ou l'autre de ces hélices. Un troisième peptide appelé IBAG17 a aussi été synthétisé ; il

correspond à la partie commune entre TCSP, IBAG10 et IBAG20 (AAAPAKSAAA). Ensuite, nous avons testé ces peptides avec des échantillons présentant différents profils de réactivités vis-à-vis de ces peptides. En ELISA, ces sérums ne montrent aucune réactivité vis-à-vis de ces nouveaux peptides (IBAG 16, 17 et 18). Cela suggère que l'épitope inducteur de la réactivité TcCRA n'est limité à aucune des deux sous-régions illustrées sur la **Figure 24**. Il s'agirait plutôt d'un épitope conformationnel partagé par les peptides IBAG16 et IBAG18.

7-Potentiel auto-immun de TcCRA

Dans le but d'étudier si TcCRA pouvait être un biomarqueur des pathologies auto-immunes, nous avons mis en place deux stratégies différentes. La première, est fondée sur le suivi longitudinal d'une population à risque constituée d'un grand nombre de sujets tous âgés de 65 ans en 2001 : il s'agit de la cohorte PROOF décrite précédemment au paragraphe « matériels et méthodes » (page 58) ; compte tenu du fait que les sérums anciens ne peuvent pas être congelés en dehors d'autres études, nous devons attendre la réalisation de ces tests pour pouvoir effectuer en parallèle l'étude de la réactivité TcCRA sur cette cohorte. La deuxième stratégie vise à étudier les réactivités croisées de TcCRA, sur différents tissus humains par immunohistochimie.

Avec l'objectif de tester l'hypothèse d'une réactivité croisée des anticorps TcCRA avec des tissus humains, nous avons mené une étude exploratoire d'immunohistochimie (IHC). Cette étude a été confiée à une société de service (Histalim, Montpellier) ; elle comportait deux étapes :

1. l'optimisation et la validation du protocole d'immunomarquage,

- le screening de l'activité TcCRA sur 35 tissus humains issus de 3 donneurs différents en bonne santé.

7.1-Biotinylation des anticorps TcCRA

Les anticorps TcCRA ont été purifiés à partir d'une poche de plasma d'un donneur de sang. Du fait de la contrainte de devoir tester la réactivité de sérums humains sur des tissus homospécifiques, nous avons décidé de coupler TcCRA à la biotine avec révélation par la streptavidine marquée à la peroxydase. Cependant, ce couplage à la biotine entraîne une perte de réactivité des anticorps de plus de 10 fois (**Figure 25**), ce qui rends ces anticorps inutilisables en condition d'IHC.

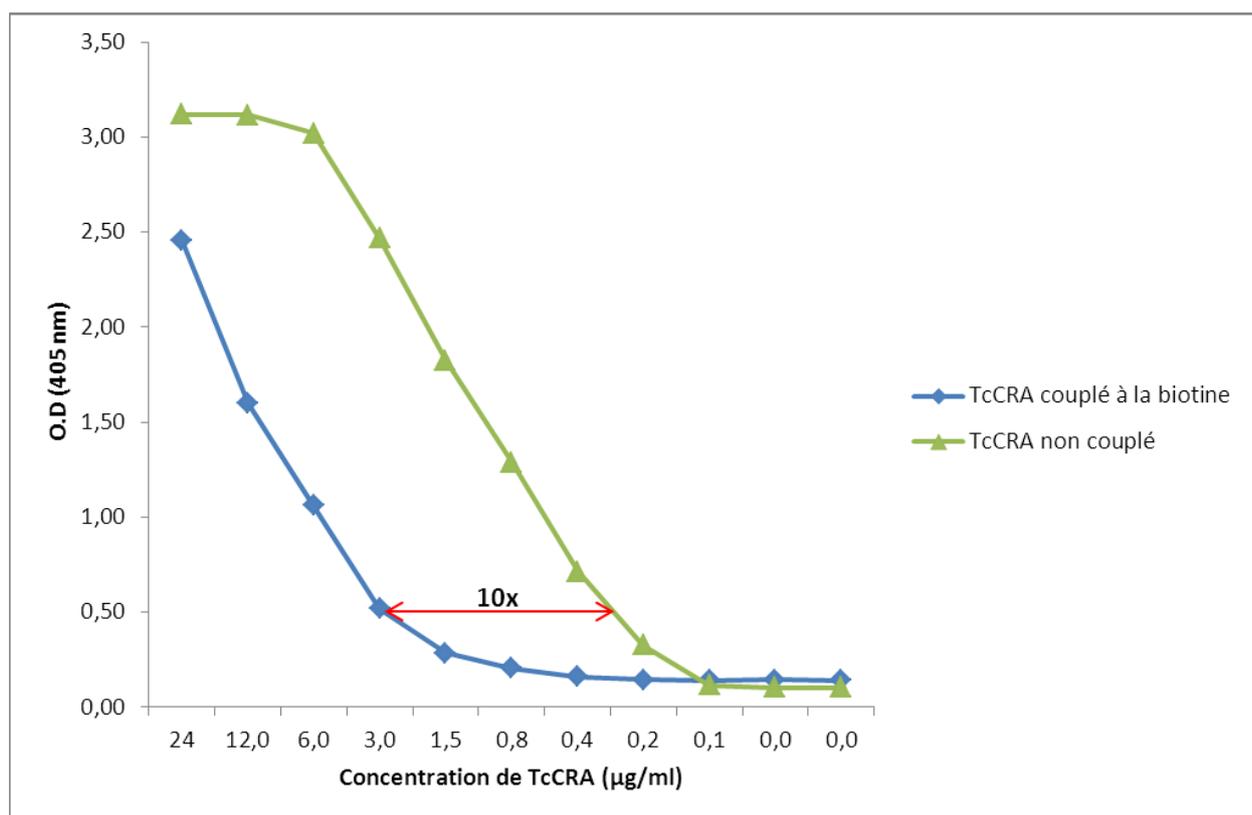


Figure 25. Titration des anticorps TcCRA biotinylés et non biotinylés. Une diminution de réactivité d'un facteur dix est observée après biotinylation, ce qui compromet leur intérêt pour une utilisation ultérieure en IHC.

7.2-Production d'anticorps monoclonaux anti-TCSP

Pour pallier aux difficultés de marquage des anticorps immunopurifiés, nous avons tenté de produire des anticorps monoclonaux anti-TcCRA afin d'obtenir une grande quantité d'anticorps avec une spécificité parfaitement définie. Pour cet objectif, quatre souris ont été immunisées. Cependant, comme le montre la **Figure 26**, la mort prématurée des animaux avant l'étape de fusion des splénocytes n'a pas permis d'atteindre l'objectif. La souris 1 est morte après la seconde injection de rappel et n'a pas pu être prélevée. Les souris 2 et 3 sont mortes rapidement après la détection d'une réponse anti-peptide ; les tentatives de fusion avec les rates de souris mortes ont échouées. Seule la souris 4 a survécu mais elle n'a pas développé de réponse immune. Ces observations pourraient suggérer un lien entre l'immunisation par TCSP et la mort des animaux.

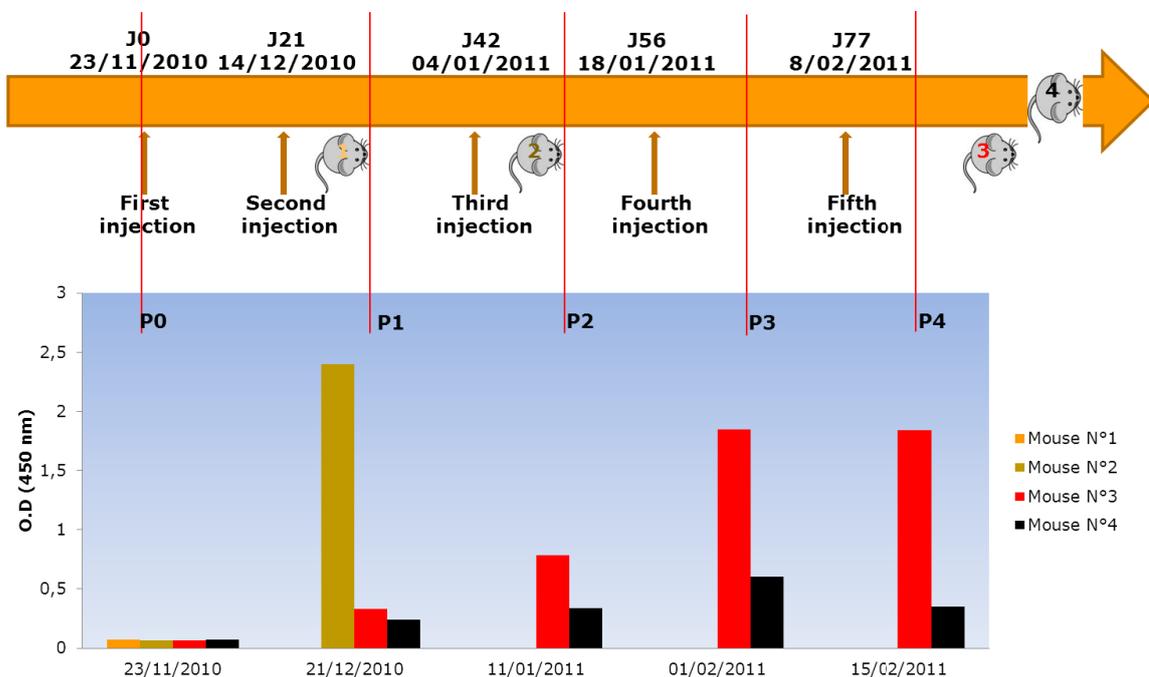


Figure 26. Protocole appliqué au développement d'anticorps monoclonaux de souris anti-TCSP. Le schéma montre les jours d'injection (J0, J21...), les jours de prélèvements (P0, P1...) et les résultats en densité optique (O.D.) des prélèvements sur le peptide TCSP sous forme d'histogrammes. Quatre souris ont été injectées à J0 par le peptide TCSP en adjuvant complet de Freund. Après 100 jours seule la souris numéro 4 est restée vivante.

Cependant, une analyse histologique comparative réalisée au niveau du cœur des souris 1, 2 et 3 et d'une souris contrôle n'a pas montré de différences significatives (**Figure 27**) ; en revanche, il a été noté une atteinte pulmonaire bilatérale chez les 3 souris immunisées qui explique probablement leur mort rapide suite à une infection respiratoire intercurrente.

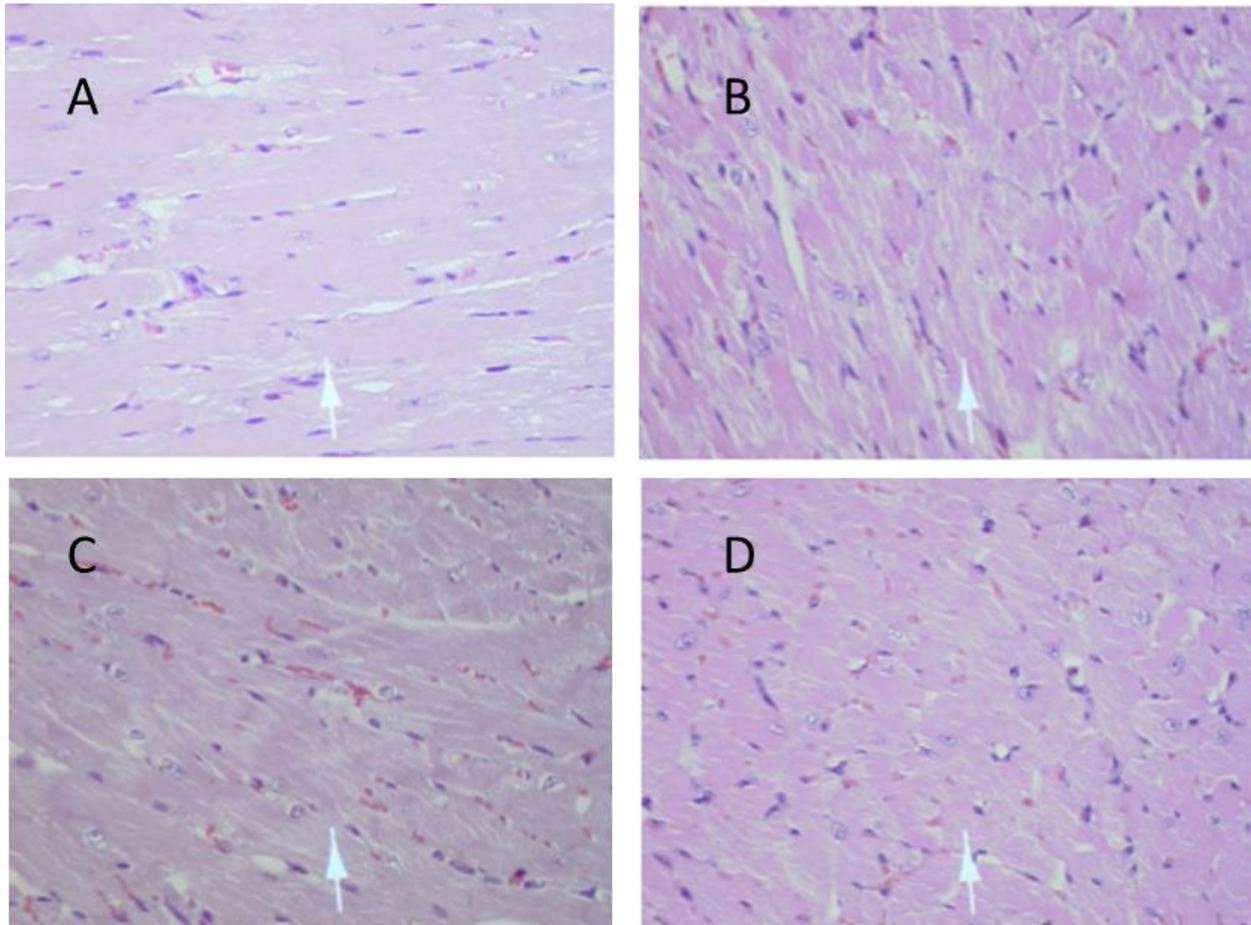


Figure 27. Coupes de tissus cardiaques des souris utilisées pour la production des anticorps monoclonaux anti-TCSP. A, B, C et D correspondent respectivement aux souris témoin, 1, 2 et 3.

7.3-Production d'anticorps polyclonaux anti-TCSP

En raison de ce qui a été présenté précédemment et afin d'accélérer l'obtention d'anticorps anti-TCSP, nous avons décidé la production d'anticorps polyclonaux chez le lapin. La **Figure 28** représente la réaction obtenue après l'immunisation de deux lapins par TCSP sur différents peptides en comparaison

avec les anticorps humains TcCRA.

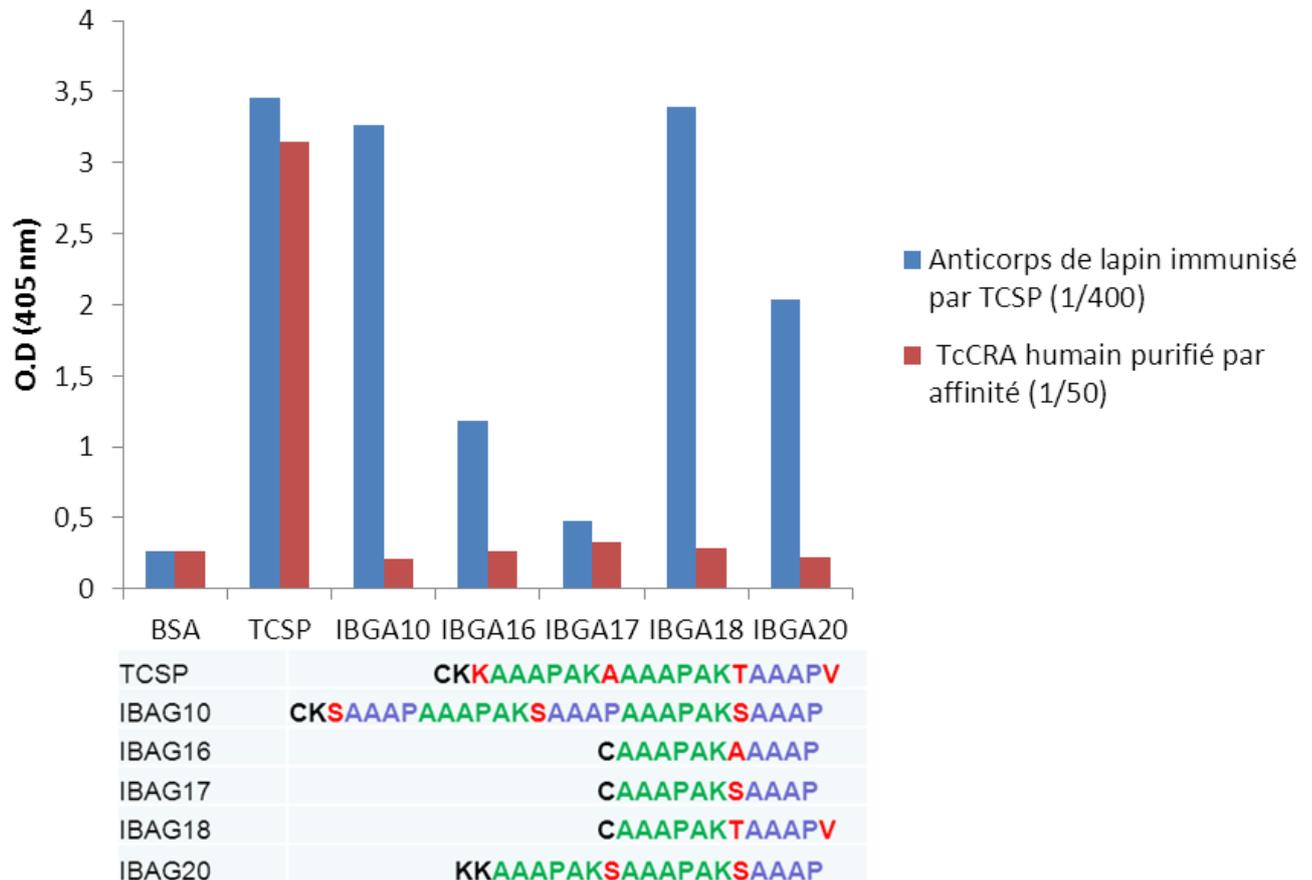


Figure 28. Comparaison entre la réactivité des TcCRA humains purifiés par affinité et la réactivité des anticorps de lapin après immunisation par TCSP. Les résultats d'un seul sérum hyper immun de lapin sont illustrés sur la Figure mais les deux animaux ont répondu de façon strictement équivalente.

Les anticorps de lapin montrent une réponse beaucoup plus intense et diversifiée non seulement vis-à-vis de TCSP mais aussi vis-à-vis des différents peptides présentés sur l'histogramme de la Figure 27. Par ailleurs, les anticorps de lapins immunisés par TCSP reconnaissent plusieurs spécificités antigéniques par western blot sur des extraits totaux des protéines d'épimastigotes de *T. cruzi* (**Figure 29**). Des bandes réactives entre les positions 38 et 36 KDa indiquent une reconnaissance spécifique par TcCRA purifié et par les anticorps de lapin après immunisation par TCSP. Les anticorps de lapin montrent

également une réactivité vis à vis d'autres protéines dont la majorité est commune avec le sérum du patient infecté par *T. cruzi*.

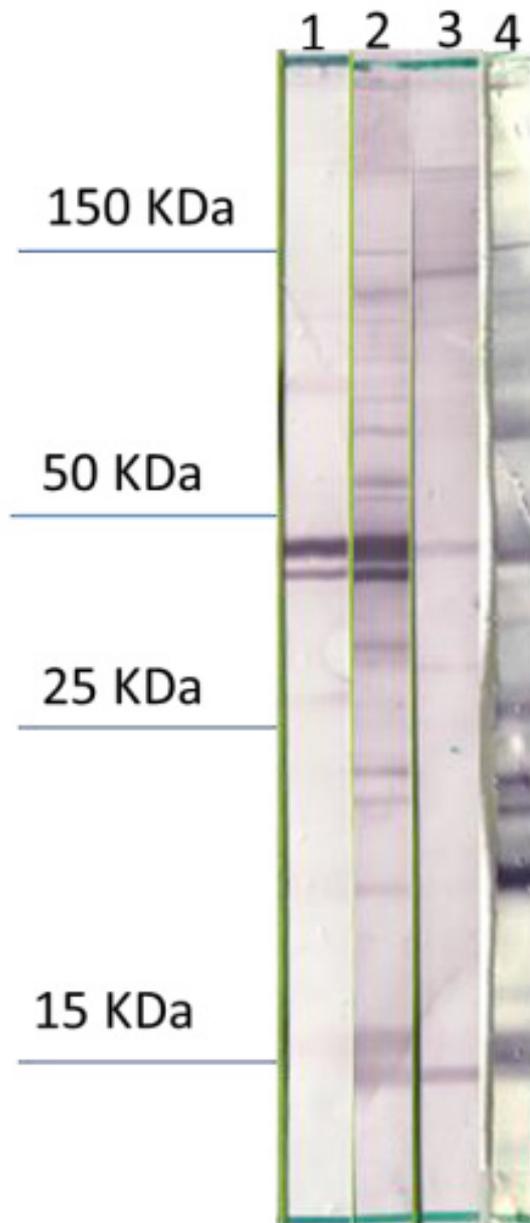


Figure 29. Réactivité en western-blot de différents anticorps vis-à-vis d'extraits totaux de protéines de *T. cruzi*. Quatre anticorps ont été testés : (1) sérum humain TcCRA positif, anticorps de lapin après (2) et avant (3) immunisation par TCSP et sérum d'une personne infecté par *T. cruzi* (4).

7.4-Résultats préliminaires de l'étude en IHC sur tissus humains

Après la validation de la réactivité des anticorps de lapins immunisés par TCSP, ces anticorps ont été testés en deux temps :

1. mise au point du marquage sur des coupes congelées de *T. cruzi*
2. application du protocole précédent sur le panel de 35 tissus humain

Les résultats de la première étape montrent une réactivité spécifique des anticorps de lapin sur une coupe congelée de *T. cruzi* (**Figure 30**).

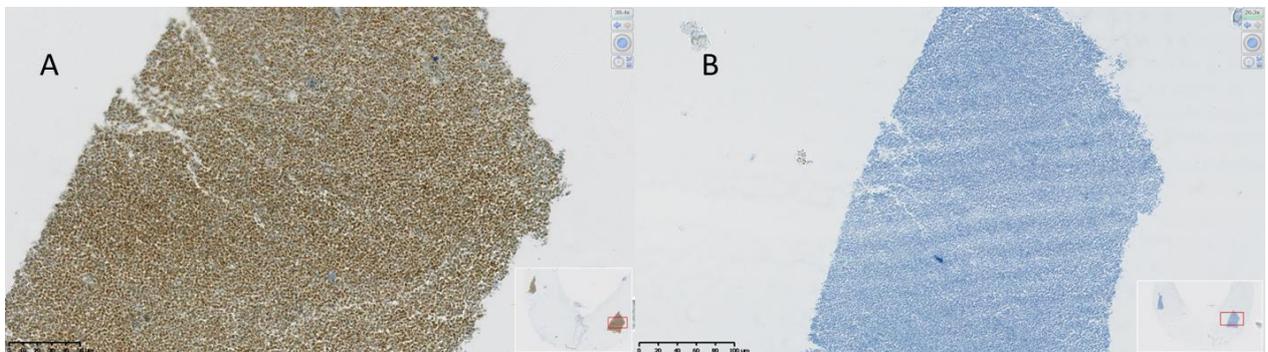


Figure 30. Validation du marquage sur des coupes congelées de *T.cruzi*. (A) montre la réactivité des anticorps de lapin après immunisation par TCSP. (B) montre l'absence de réactivité à partir d'un contrôle négatif.

Ensuite, ces anticorps de lapins anti-TCSP ont été utilisés sur un panel de 35 tissus humains : amygdale, cervelet, cœur, colon, cortex cérébral, endothélium, estomac, foie, ganglion lymphatique, glande salivaire, glande surrénale, hypophyse, moelle épinière, moelle osseuse, muscle squelettique, nerf périphérique, œil, ovaire, parotide, pancréas, peau, placenta, poumon, prostate, rate, rein, sein, testicule, thymus, thyroïde, tractus intestinal, trompe de Fallope, uretère, utérus et vessie,

Les résultats préliminaires montrent que ces anticorps reconnaissent spécifiquement les cellules musculaires striées avec une coloration intense (**Figure 30**). Des analyses complémentaires vont être entreprises pour analyser

plus en détails cette relation entre tissu musculaire squelettique et anticorps anti-TCSP, notamment en testant en parallèle des sérums humains positifs pour TcCRA et pour *T. cruzi*.

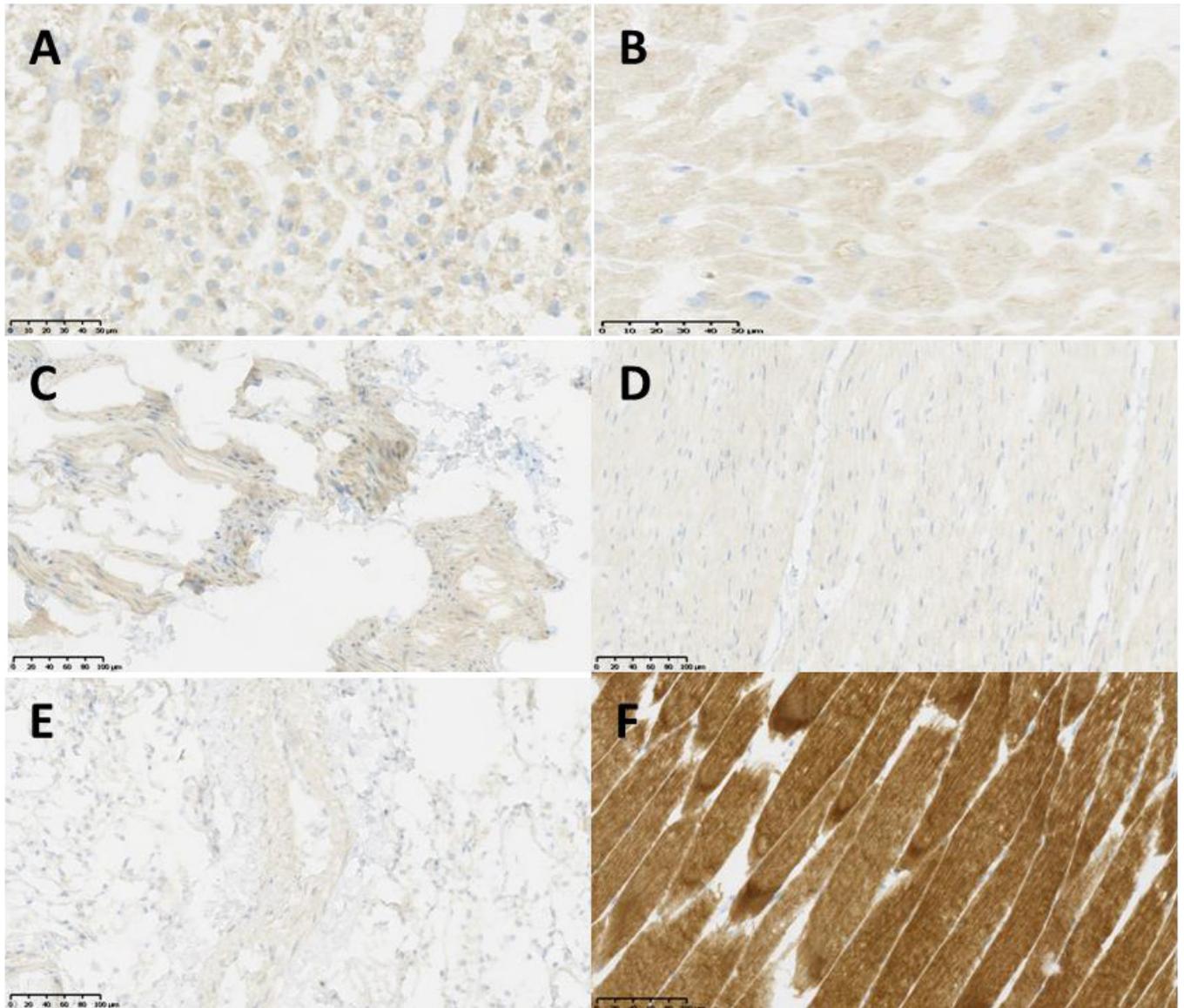


Figure 31. Marquage de différents tissus humains avec un sérum hyperimmun anti-TCSP de lapin en immunohistochimie. La figure montre la réponse des anticorps de lapin sur quelques exemples de tissus : glande surrénale (A), cœur (B), vessie (C), colon (D), poumon (E) et muscle squelettique (F)

Anti-*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies Detected at High Rate in Non-Exposed Individuals Living in Non-Endemic Regions: Seroprevalence and Association to Other Viral Serologies

Esber S. Saba^{1,2}, Lucie Gueyffier¹, Marie-Laure Dichtel-Danjoy¹, Bruno Pozzetto², Thomas Bourlet², François Gueyffier³, Yahia Mekki³, Hans Pottel⁴, Ester C. Sabino⁵, Philippe Vanhems³, Maan A. Zrein^{1,3*}

1 Infynity-Biomarkers, Ecully, France, **2** Laboratory of Bacteriology-Virology, GIMAP EA3064, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, Saint-Etienne, France, **3** UCBL-Hospices Civils de Lyon, Faculty of Medicine Rockefeller, Lyon, France, **4** Interdisciplinary Research Center, Catholic University Leuven, Campus Kortrijk, Kortrijk, Belgium, **5** Faculdade de Medicina da USP, Dep de Molestias Infecciosas e Parasitárias, São Paulo, Brazil

Abstract

Cross-reactive antibodies are characterized by their recognition of antigens that are different from the trigger immunogen. This happens when the similarity between two different antigenic determinants becomes adequate enough to enable a specific binding with such cross-reactive antibodies. In the present manuscript, we report the presence, at an “abnormal” high frequency, of antibodies in blood samples from French human subjects cross-reacting with a synthetic-peptide antigen derived from a *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) protein sequence. As the vector of *T. cruzi* is virtually confined to South America, the parasite is unlikely to be the trigger immunogen of the cross-reactive antibodies detected in France. At present, the cross-reactive antibodies are measured by using an in-house ELISA method that employs the *T. cruzi* -peptide antigen. However, to underline their cross-reactive characteristics, we called these antibodies “*Trypanosoma cruzi* Cross Reactive Antibodies” or TcCRA. To validate their cross-reactive nature, these antibodies were affinity-purified from plasma of healthy blood donor and were then shown to specifically react with the *T. cruzi* parasite by immunofluorescence. Seroprevalence of TcCRA was estimated at 45% in serum samples of French blood donors while the same peptide-antigen reacts with about 96% of *T. cruzi* -infected Brazilian individuals. In addition, we compared the serology of TcCRA to other serologies such as HSV 1/2, EBV, HHV-6, CMV, VZV, adenovirus, parvovirus B19, mumps virus, rubella virus, respiratory syncytial virus, measles and enterovirus. No association was identified to any of the tested viruses. Furthermore, we tested sera from different age groups for TcCRA and found a progressive acquisition starting from early childhood. Our findings show a large seroprevalence of cross-reactive antibodies to a well-defined *T. cruzi* antigen and suggest they are induced by a widely spread immunogen, acquired from childhood. The etiology of TcCRA and their clinical relevance still need to be investigated.

Citation: Saba ES, Gueyffier L, Dichtel-Danjoy M-L, Pozzetto B, Bourlet T, et al. (2013) Anti-*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies Detected at High Rate in Non-Exposed Individuals Living in Non-Endemic Regions: Seroprevalence and Association to Other Viral Serologies. PLoS ONE 8(9): e74493. doi:10.1371/journal.pone.0074493

Editor: Sylvie Bisser, INSERM U1094, University of Limoges School of Medicine, France

Received: June 28, 2013; **Accepted:** July 22, 2013; **Published:** September 17, 2013

Copyright: © 2013 Saba et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Infynity Biomarkers and the region Rhone Alpes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: This study was partly funded by Infynity Biomarkers the employer of ESS and MAZ. Infynity Biomarkers discovered the biomarker. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: maan.zrein@chu-lyon.fr

Introduction

The paradigm of antibody specificity is closely related to the primary amino-acid sequence forming the heavy and light chains in a spatial organization that is able to bind to a given antigenic structure. However, each individual antibody molecule has a built-in capability to bind to various antigenic motifs; this non-specific recognition can gradually attain degeneracy where an antibody molecule is able to bind to fairly distant antigens. Nevertheless, the specificity is accomplished when the sum of specific bindings to a given antigenic determinant is clearly superior to the cross-reactive bindings to a variety of different structures. This is typically obtained in polyclonal antisera.

An important cause of cross-reactivity is attributable to molecular mimicry between antigenic structures. Thus, an infective agent can partially mimic tissue-specific antigens and induce cross-reactive autoimmune antibodies. Antigen mimicry can drive an immune response, initially directed against a foreign antigen, to recognize the host antigens and then results in dysfunction and autoimmune diseases. Such mechanisms have been proposed to explain certain acquired immune pathogenesis [1][2].

In the context of an infection by *T. cruzi*, either the parasite and/or the associated polyclonal reactivity ultimately lead to Chronic Chagas Cardiomyopathy (CCC) in about 30% of infected people 10 to 30 years after the infection [3]. The detection of *T.*

cruzi nests in the heart of patients with chronic myocarditis suggests the persistence of the parasite as a cause for the development of CCC [4]. Conversely, other researchers reported unsuccessful parasite detection in a great majority of patients with CCC which constitute a doubt about the necessity of the parasite for the development of Chagas pathology [5]. Furthermore, several reports indicate that the inflammatory tissue damage may not be correlated to the local presence of *T. cruzi* [6][7]. Evidence for a direct pathogenic role of autoimmunity was suggested by the development of lesions in cardiac tissues after immunization with *T. cruzi* antigens in animal models [8]. Several *T. cruzi* antigens have been reported to present epitopes similar to mammalian antigens, including the family of trypanomastigote specific FI-160 antigens [9], cruzipain [10], calreticulin [11], SAPA [12], members of the ribosomal P protein family, and many other antigens (for a review see [3]). Aside from the controversial pathogenesis that leads to CCC after *T. cruzi* infection, in laboratory diagnostic testing, several cross-reactive antigens have been described to produce false reactivities in Chagas screening serological assays [13]. Some of them were observed to bind with antibodies induced by parasites belonging to the member of the same trypanosomatids group like for *Leishmania* [14] and also by more distant parasites like Malaria [15]. Cross reactivity is depending on the source of *T. cruzi* antigens used in the immunoassays development (recombinant proteins and synthetic peptides, or crude extracts from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms), however in such assays the frequency of cross-reactivity remains extremely limited due to regulatory considerations.

In the course of development of a new serodiagnostic assay for Chagas Oelemann *et al* observed a strong cross-reactivity of an antigen that we further called TCSP for *Trypanosoma cruzi* Synthetic Peptide [16]. This peptide belongs to the repetitive region of the 60 S L19 ribosomal protein of *T. cruzi* [17]. This repetitive region was initially described in an attempt to determine antigenic sequences of *T. cruzi* [18]. Repeated motifs are found in several members of the 60S ribosomal proteins [19]. The largest C terminal extensions (more than 160 amino acids) have been observed in *T. cruzi* L19 and *T. cruzi* S21 and are specific to trypanosomatids [20].

The objective of the present work is to describe the seroprevalence of cross-reacting antibodies to TCSP in a non-endemic region for *T. cruzi*. These antibodies are unexpectedly found at a high seroprevalence (40% to 50%) in serum of individuals living in France, not exposed to *T. cruzi*. They have thus been named TcCRA for *Trypanosoma-cruzi*-Cross Reactive Antibodies. Cross-reactivity of these TcCRA antibodies to *T. cruzi* is also demonstrated. These initial observational studies may help in further exploring potential association of TcCRA with diseases suspected but not yet proved to have an infectious origin.

Materials and Methods

Ethics Statement

The Institutional Review Board we depend upon waived the study approval (CPP Sud-Est n° 2013/017). The sera that were tested indeed represented residual quantities from samples withdrawn for other purposes and all sera were anonymized prior to testing.

All our studies comply with the French legislation on the processing of personal data and have been declared to the competent authority (CNIL National Commission for Information technology and Liberty).

T. cruzi -synthetic peptide (TCSP) antigen

The peptide sequence of 19 amino-acids is coupled to bovine serum albumin (BSA) and has the following sequence: BSA-AAAPAKAAAAPAKTAAAPV.

The peptide synthesis was performed using Fmoc-chemistry supplied by Protéogénix, France. The peptide was then covalently linked from the N-terminal side to bovine serum albumin (BSA) to facilitate its adsorption to microplates. This peptide is used as a target antigen throughout our work to detect TcCRA.

BLAST searches and Alignments

We performed a BLAST search using the Universal Protein Resource (www.uniprot.org), by querying first the TCSP peptide, then the repeated region harboring the peptide. This region, referenced as Q7M3W1 (97 amino-acids), is a fragment of *T. cruzi* ribosomal protein 60s L19 (XP_808122; 357 amino-acids). We searched across the Swiss Prot non-redundant database sequences by using the default settings [21].

Human serum collections

We tested TcCRA presence in 395 serum samples that were routinely collected for viral serology testing of one or more parameter(s) in a hospital setting (Lyon, France). We retained serum samples if a minimum of 0.5 mL was available.

In addition, 210 serum samples from healthy blood donors were obtained from different blood banks (Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône, EFS Nord and EFS Auvergne Loire). All samples from blood donors were screened negative for the following infectious serological markers, namely: human immunodeficiency viruses (HIV 1, 2 & O), Human T-lymphotropic viruses (HTLV I/II), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV) and *Treponema pallidum* (TP). Moreover, blood donors are classically asked before sampling whether they have travelled to any of the endemic regions for *T. cruzi*. In case they have, their blood is tested for the presence of the parasite infection and their sample is discarded if found reactive.

Additionally, we tested 69 serums of pediatric patients (< 18 years) obtained from Amiens biobank, as well as 79 sera of *T. cruzi*-infected patients obtained from Fundação ProSangue (São-Paulo, Brazil).

Sex and age at sampling were scored for all samples (Table 1).

Serology testing

Antibodies specific to the TCSP peptide antigen were tested in serum samples using an in-house ELISA method. Briefly, TCSP was coated at a concentration of 1 µg/ml in 100 µL coating buffer pH 9.6 into 96-wells microplates (Nunc-Immuno™). Microplates were blocked with 200 µl of blocking buffer during 2 h at room temperature. Following incubation, the microplates were washed two times with ELISA wash buffer (PBS-Tween) using an automated washer (Labatech LT-3500). Samples were then

Table 1. Demographic variables of the tested samples.

Tested samples from	Age, mean years (SD)	Gender, M/F
Hospital sources	37.5 (21.6)	229/166
Blood donors	39.5 (14.7)	134/76
<i>T. cruzi</i> infected patients	47.5 (8.5)	45/34
Pediatrics (< 18 years)	9.7 (6.0)	36/33

doi:10.1371/journal.pone.0074493.t001

diluted appropriately in sample diluents to 1/50. In brief, 100 μ l of diluted sample or controls were then added to TCSP coated plate and incubated for 60 min at room temperature. At the end of the incubation, the plates were washed three times with wash buffer to remove unbound antibodies (LT-3500 Microplate washer). Alkaline Phosphatase-conjugated (PARIS BIOTECH, Compiègne, France) was diluted 1/1000 in conjugate buffer, and 100 μ l were then added to the microplate which was incubated for a final 60 min at room temperature. At the end of the incubation period, the plates were washed three times with wash buffer. Finally 100 μ l of *para*-Nitrophenyl Phosphate (p-NPP) substrate solution (1 mg/mL) were added to each well. The plate was then incubated at room temperature for 15 min. The absorbance was measured at 405 nm using a 96-well plate reader (Labatech LT-4000 Microplate reader) and the results analyzed using analysis software (Manta, Labatech). All reported data represent the average optical density (OD) of duplicate measurements. A cut-off value of 0.5 OD was calculated for determining seropositivity, it is determined as the mean plus 3 times the standard deviations (SD) of the tested samples OD on negative control samples.

Viral serologies for clinical samples were performed in a routine setting of Lyon's Hospital as described in the kit inserts of the corresponding commercial assay used (Siemens, Germany).

Affinity-purified antibodies and immunofluorescence

50 ml from a 51 years old man TcCRA-positive plasma sample were used for affinity-purification. Gammaglobulins fraction was precipitated with 40% Ammonium Sulfate. Pellet was centrifuged at 4.000 g then dissolved in 30 ml of PBS after discarding the supernatant. When fully dispersed, the solution was dialyzed against PBS at 4°C overnight with two buffer changes. The dissolved fraction was used for immunoaffinity purification as follows: 20 mg Dynabeads MyOne™ Streptavidin T1 (Invitrogen 656.01) were incubated for 1 hour with 20 μ g/ml of a biotinylated TCSP; the beads were then washed 3 times with PBS-Tween 20 and incubated with PBS 1% BSA for another hour to saturate all the unspecific binding sites. Washed one time after the saturation, the beads were incubated with 10 ml of the precipitate (Total IgGs) for one hour. After incubation the beads were washed 3 times with PBS-Tween 20, and incubated for 10 min with a glycine-HCL (pH 2.5) to elute TcCRA. After elution, pH was immediately neutralized to pH 7.5 by adding NaOH (1N). All incubations were performed at room temperature and before each step a magnet was used for 2 min to isolate beads from supernatant.

After the immunopurification, TcCRA solution (300 μ g/mL) was diluted 1/50 then incubated in a wet chamber on an immunofluorescence assay used in routine screening (epimastigotes glass slides; from Biomérieux/IMUNOCRUIZ) during 1 h at 37°C. Later, the slide was washed three times in PBS-Tween and incubated at dark with a diluted ready to use FITC-conjugated anti-Human IgG (NOVA Lite kits, INOVA Diagnostics) during 1 h at 37°C, then washed three times in PBS and mounted in buffered glycerin for observation under a fluorescence microscope (excitation at 488 nm) 60x. A negative control was obtained by using an irrelevant purified human IgG negative to TCSP antigen under identical concentration and testing conditions.

Statistical analysis

Descriptive statistics are presented as frequencies (percentages) for categorical variables and as means (SD) for continuous variables. The Mann Whitney U test was used to compare age between sexes and Fisher's Exact test was used to test equality of the proportion of males and females in the TcCRA positive group

Table 2. TcCRA seroprevalence in blood donors. Gender and age are compared.

Blood donors (n=210)	Male (n=134)	Female (n=76)	P values
TcCRA positive (%)	57 (42.5)	38 (50)	0.315
Age, mean years (SD)	41.1 (14.6)	36.7 (14.4)	0.037

doi:10.1371/journal.pone.0074493.t002

(Table 2). To investigate the equality of viral serology of other viruses and TcCRA status, the null-hypothesis that the proportion of discordant test results equals zero is tested using a single proportion test (Table 3). All statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS version 17.0).

Results

Immunofluorescence

Affinity-purified TcCRA were tested by immunofluorescence on *T. cruzi* epimastigotes slides. These purified antibodies reacted positive with the fixed parasite giving strong fluorescence signals (Figure 1) as compared to the negative control antibodies.

Serological testing

Sera from adult blood donors and pediatric patients. We tested TcCRA in sera obtained from blood donors qualified after negative screening for all mandatory infectious markers (n=210). Since seroprevalence in healthy young individuals (below 18 years old), for ethical reasons, is relatively complex to evaluate, we estimated the seroprevalence in pediatric patients. Sixty-nine serum samples from hospitalized children were tested to evaluate the seroprevalence of TcCRA in a lower age range than for blood donors. By merging the two groups, Figure 2 shows a steady increase of TcCRA seroprevalence from childhood to adulthood. There was no significant difference related to gender in the adult blood donors group (Table 2).

Sera from patients tested for different viral serologies. 395 serum samples obtained from patients referred for viral serology testing by different hospital wards in Lyon were tested for the presence of TcCRA. Each sample was analyzed in a clinical laboratory for at least one of the IgG antibodies specific to viral serologies. Table 3 shows the seroprevalence of TcCRA in each category of negative and positive viral serology. In this table, we tested TcCRA status against presence/absence of different viral serologies and p<0.0001 was obtained, providing evidence for the difference between TcCRA and other viral serology markers.

Sera of *T. cruzi* infected patients. A cohort of 79 patients infected by *T. cruzi* and collected in Brazil for a study on Chagas disease was used in an ancillary study to evaluate the specific antibodies to the ribosomal protein antigen TCSP [22]. 96% (76/79) of samples were found reactive to this antigen. Under the testing conditions of such samples, no discrimination was feasible between genuine anti-*T. cruzi* antibodies and the cross-reactive TcCRA.

Sequence Homologies

A BLAST search with the TCSP sequence did not reveal any similarity with classical and frequent infectious agents that could explain the observed seroprevalence levels. We also performed searches with the Q7M3W1 repetitive fragment containing TCSP.

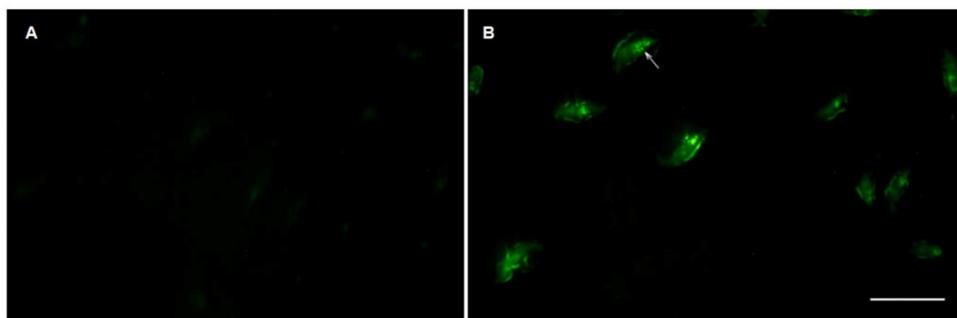


Figure 1. Immunoreactivity of affinity-purified TcCRA (B) as compared to a negative control that uses irrelevant human antibody (A) on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as shown by fluorescence microscopy. The horizontal bar embedded in the image B represents a 20 μ m scale.

doi:10.1371/journal.pone.0074493.g001

Q7M3W1 fragment has been classified in the superfamily varicella-zoster virus gene 22. Searches indeed revealed a significant similarity with a tegument protein that belongs to a herpes virus family member [O39779, equine herpes virus 1, Fragment, ORF24, identity = 57%, score = 248, E-Value = 1.0E-19] (Figure 3). No other similarity with members of the Herpes family (and especially human) was evidenced through this search.

We then checked if the *in silico* similarity between TCSP and the equine herpes virus had a biological value. The equine peptide was synthesized and tested with TcCRA seropositive samples. Although linear sequence identity of the tested antigens exceeds 69%, only a minor fraction (below 1%) of samples reacted to the herpes equine antigen and no correlation was identified between both serologies (data not shown).

Discussion

We have discovered novel antibodies, called TcCRA, observed in around 45% of French blood donors though detected with an antigen derived from a Latin American parasite.

French individuals are virtually not exposed to *T. cruzi*. We however observed at a high frequency binding reactions in the ELISA tests performed on French blood samples. This strong TcCRA cross-reactivity with *T. cruzi* was further evidenced by the specific reaction obtained between affinity-purified TcCRA and *T. Cruzi* epimastigotes in immunofluorescence assays used for routine

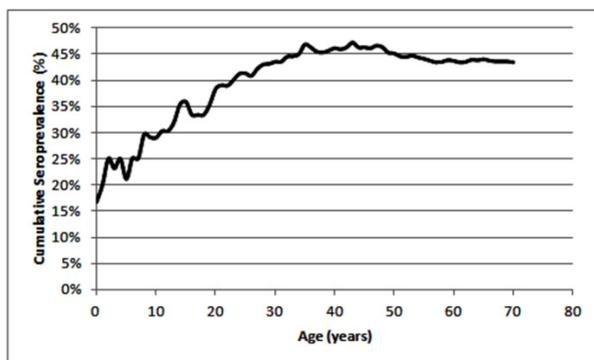


Figure 2. Cumulative seroprevalence of TcCRA in function of age (1 year intervals).

doi:10.1371/journal.pone.0074493.g002

serodiagnosis. This led us to search for characteristics of the trigger immunogen through different approaches.

We estimated seroprevalence in different groups of individuals. Our data show a steady increase of seroprevalence from early childhood to an approximate level of 47%. No differences were found between men and women. This suggests a widely spread immunogen, acquired in childhood, probably latent after acquisition or initiating an autoimmune process, which would explain its immunity maintenance during adulthood.

In a second approach, we investigated potential homologies with other antigens than the one from *T. cruzi*. We could not identify any significant similarity to known pathogens with such a high level of prevalence through our BLAST searches. Intriguingly enough, the annotation of Q7M3W1 (eukaryotic) indicated a clustering in the “super family” of varicella-zoster virus gene 22 protein, through its homology with the equine ORF24 genes. So far there is no history of Equine Herpesvirus transmission to human [23] and our *in-vitro* experiments revealed no interaction between TcCRA and the homologous peptide derived from ORF24.

Without any conclusive outcome to the *in-silico* search of potential homologies, we explored the path of *in-vitro* cross-reactivity with the commonly tested viral agents widely prevalent within the French territory. We could not find any direct association, in the sera we tested, between TcCRA and any of the analyzed viral serologies, whether they belong to the Herpes virus family (namely HSV1/2, HHV6, EBV, CMV and VZV), or other viruses (Adenovirus, Parvovirus B19, Mumps virus, Rubella virus, Respiratory Syncytial Virus, Measles and Enterovirus).

Based on our observations so far, we thus propose that the trigger immunogen, still to be characterized, could be a variant of a known infectious agent or even a new one in view of the lack of correlation with widely spread viruses. It could be of parasitic nature: cross-reactivity between *T. Cruzi* and closely related species like *T. rangeli* of *Leishmania* or with more distant species has indeed been observed [14]. However, though some of these species are found in Europe, their presence has not been reported in France. They are thus unlikely to explain the elevated seroprevalence levels of TcCRA.

Overall, the seroprevalence rate and age of acquisition hint at a cosmopolitan distribution for the target immunogen, which is likely to be present in the endemic, as well as in non-endemic, zones of *T. cruzi*. Given the strong cross-reactivity of TcCRA with the Latin American parasite, these antibodies could explain a certain amount of false reactivities typically observed in *T. cruzi*-screening assays that use whole extracts of the parasite. This

Table 3. Different viral serologies as compared to TcCRA.

Viral serologies (IgG measurements)		TcCRA Negative	TcCRA Positive	Disagreements (%)
Adenovirus	–	3	1	20/52
	+	19	29	(38.4)
Epstein Barr Virus (EBV)	–	15	16	129/257
	+	113	113	(50.1)
Enteroviruses (Echo-Coxsackie viruses)	–	15	18	48/100
	+	30	37	(48)
Human Herpes Virus 6 (HHV6)	–	11	6	53/110
	+	47	46	(48.1)
Mumps	–	7	3	39/82
	+	36	36	(47.5)
Parvovirus	–	16	16	56/110
	+	40	38	(50.9)
Measles	–	16	15	53/104
	+	38	35	(50.9)
Respiratory Syncytial Virus (RSV)	–	2	1	26/44
	+	25	16	(59)
Rubella virus	–	4	1	45/87
	+	44	38	(51.7)
Varicella Zoster Virus (VZV)	–	3	2	95/185
	+	93	87	(50.2)
Herpes Simplex Viruses 1&2 (HSV)	–	30	19	89/191
	+	70	72	(46.5)
Cytomegalovirus (CMV)	–	53	49	132/263
	+	83	78	(50.1)

P values calculated by using single proportion tests are <0.0001 for each viral serology.
doi:10.1371/journal.pone.0074493.t003

```

Q7M3W1_TRYCR -----AAPAKAAAAAP----AKAAAA----PAKAAAA-- 23
O39779_9ALPH VHGLPPSDSNVTQSTKEPPKPAVETPAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPA 180
                *****;****      **:***      ***;***

Q7M3W1_TRYCR --PAKAAAA----PAKAAAA----PAKAAA----APAKAAAAAP----AKAAAAPA----K 61
O39779_9ALPH AAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAKSAAAPAAAPAK 240
                ***;***      ***;***      ***;**      *****;****      **:*****      *

Q7M3W1_TRYCR T---AAAAPAKAAAAAPAKAAAAPAKTAAAPVGKKAGGKK----- 97
O39779_9ALPH SAAAPAAAPAKSAAAPA---AAPAKSAAAPAAAPAKDQTKSAAEVPKPAKDQAKDQAKDQ 297
                :      *****;*****      *****;****;.      *      ;.
    
```

Figure 3. Alignment between the repetitive fragment Q73MW1 and the tegument protein of equine herpes virus.
doi:10.1371/journal.pone.0074493.g003

hypothesis is reinforced by our immunoassay results on *T. Cruzi* infected patients (96% of positive reactions in a group of 79 individuals) showing that TCSP is an immunodominant antigen for Tc immunoassays and concomitantly can yield false reactivities in individuals uninfected by Tc. To resolve such false reactivities and achieve high assay specificity, Oelemann et al. made a careful selection of protein composition that excluded some of the *T. cruzi* antigens (such as TCSP) that might sustain the cross-reactivities [16].

We are confronted here to a case of cross-reactivity between distinct infectious agents striking by its extent: elevated prevalence estimated in different groups of individuals, either healthy (blood donors) or not (patients with diverse pathologies). Other examples in humans have been described in the literature but not necessarily on humoral immunity, such as cross-reactivity between HCV and Influenza virus, impacting cellular immunity. Wedemeyer et al. were indeed able to expand T-cells specific to a peptide derived from NS3 protein of HCV from blood of 9 of 15 HCV-negative blood donors (60%) [24]. They further confirmed that the cross-reactivity originated from a peptide of Influenza virus. They concluded on the influence past exposure to pathogens might have on host cellular responses to a new infection. Could there be a similar mechanism in Latin American patients having first acquired TcCRA target immunogen, where the immune response takes a different path in the course of an infection by *T. cruzi* due to the presence of cross-reactive antibodies?

Most of documented cross-reactivity cases refer to an infectious agent and a self-antigen rather than between pathogens. *T. cruzi* is an exemplar of molecular mimicry between some of the epitopes it bears and human proteins, which may initiate autoimmune disorders and alter several organs. This has been in particular proposed to explain (at least partially) Chagas pathogenesis through the induction of autoantibodies against Beta1-adrenoreceptors, provoking dilated cardiomyopathies (DCMs) [5]. Based on the reported presence of autoantibodies against the Beta1-adrenoreceptor in all forms of DCMs (idiopathic and chagasic), Levin and Hoebeke have proposed a parallel between both forms and a consensus peptide common to *T. cruzi*, to the Beta1-adrenoreceptor and to other pathogens that could explain the origin of idiopathic forms [25]. Their research works lead us to raise the question of potential analogous autoimmune mechanisms that may be elicited by the peptide sequence shared by *T. cruzi* and TcCRA target immunogen. This may be one possible explanation for the persistence of TcCRA during adulthood, another one being a repetitive exposure to the antigen through a latent infection. Exploring this hypothesis will be pursued, with the full

awareness of the difficulty of the task. First, the long time span (several years or even decades) between the autoantibodies generation and the development of the associated clinical disease indeed requires long-term epidemiologic studies, taking many years to produce results [26]. Moreover, the occurrence of autoimmune diseases is suspected to be associated with a confluence of several factors such as genetic predisposition and environmental exposure [3]. Another source of complication in comprehending autoimmune processes is due to the low prognosis value of functional autoantibodies. Indeed only low correlations are found between autoantibodies and a given disease severity [27]. This extensive complexity probably explains why direct evidence about infections and their contribution to autoimmunity have been established only in a few instances, such as Guillain-Barré syndrome [28] and rheumatic fever [29]. As for Chagas disease, some controversies are still under debate about its origin: either autoimmunity or parasite persistence.

Conclusion

The present report unveils a possible antigen mimicry characterized by a serological reactivity to a well-defined *T. cruzi* antigen in blood samples from individuals not exposed to the parasite. The measured seroprevalence of such cross-reactivity is in favor of a highly prevalent immunogen, acquired in childhood, which doesn't seem to be associated with common known pathogens in clinical routine. Additional studies are required to identify the candidate agent probably bearing a structural immunogenic motif similar to the ribosomal antigen of *T. cruzi*. This initial work will serve as the basis for organizing prospective clinical investigations, where we will pursue the analysis of TcCRA in different groups of individuals (diseased and healthy) with the aim to identify its potential clinical significance and etiology.

Acknowledgments

All co-authors would like to thank Professor Olivier Garraud Director of EFS Auvergne-Loire for the supply of plasma that helped in affinity purification of TcCRA. We thank Professor Bruno Lina as well for providing access to the samples with viral serology results. Finally, thanks to Dr. Marc Vanregenmortel for the constructive discussions over the subject.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MAZ ESS BP PV. Performed the experiments: MAZ ESS. Analyzed the data: MAZ ESS LG HP FG. Contributed reagents/materials/analysis tools: MAZ YM TB ECS HP. Wrote the paper: MAZ ESS LG MD.

References

1. Cusick MF, Libbey JE, Fujinami RS (2012) Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 42: 102–111.
2. Ercolini AM, Miller SD (2009) The role of infections in autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 155: 1–15.
3. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115: 1109–1123.
4. Benvenuti LA, Rogério A, Freitas HFG, Mansur AJ, Fiorelli A, et al. (2006) Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med Parasitol* 102: 481–487.
5. Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N (2011) Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* 24: 592–630.
6. Elias FE, Vigliano CA, Laguens RP, Levin MJ, Berek G (2003) Analysis of the Presence of *Trypanosoma Cruzi* in the Heart Tissue of Three Patients with Chronic Chagas' Heart Disease. *Am J Trop Med Hyg* 68: 242–247.
7. Palomino SAP, Aiello VD, Higuchi ML (2000) Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 94: 571–579.
8. Teixeira AR, Gomes C, Nitz N, Sousa AO, Alves RM, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1000.
9. Van Voorhis WC, Barrett L, Koelling R, Farr AG (1993) FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J Exp Med* 178: 681–694.
10. Giordanengo L, Guiñazú N, Stempin C, Fretes R, Cerbán F, et al. (2002) Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol* 32: 1003–1011.
11. Ribeiro CH, López NC, Ramirez GA, Valck CE, Molina MC, et al. (2009) *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol Immunol* 46: 1092–1099.
12. Giordanengo L, Gea S, Barbieri G, Rabinovich GA (2004) Anti-galactin-1 autoantibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection: differential expression of this beta-galactoside-binding protein in cardiac Chagas' disease. *Clin Exp Immunol* 124: 266–273.
13. Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, et al. (2008) High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e316.

Deuxième partie : étude de TcCRA en greffe de moelle osseuse

Le système immunitaire a évolué pour établir un équilibre subtil entre une protection efficace contre les agents pathogènes et l'absence de développement de maladies auto-immunes. Plusieurs facteurs peuvent avoir un impact sur l'efficacité de la réponse immunitaire ; un certain niveau d'immunosuppression est souvent observé au cours d'états aussi divers que le vieillissement, la malnutrition ou les infections par des virus, des bactéries ou des parasites. Avec l'augmentation de l'espérance de vie malgré des pathologies lourdes (cancers, infections par HIV, greffes d'organes et de moelle osseuse), le nombre de sujets exposés à une immunodépression sévère est de plus en plus important dans la pratique médicale courante. Ces états d'immunosuppression parfois très profonds ont changé le spectre des maladies infectieuses, à la fois dans la présentation anormale ou la gravité accrue de maladies établies comme l'infection à cytomégalovirus et dans l'émergence de nouvelles pathologies infectieuses avec des agents opportunistes comme *Pneumocystis jirovecii* ou *Aspergillus spp.* C'est dans ce contexte que nous nous sommes interrogés sur le rôle potentiel de l'agent responsable de l'émergence de la réactivité TcCRA comme germe opportuniste, d'autant que nos premières observations, non confirmées par la suite, semblaient montrer une prévalence accrue de ce biomarqueur chez les patients infectés par HIV. Les patients recevant une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques combinent le plus souvent une immunodépression sévère et un risque élevé de développer des infections opportunistes.

Suite à une collaboration avec un service de transplantés médullaires du CHU de Lyon, nous avons la possibilité d'étudier TcCRA chez des patients greffés de

moelle. L'intérêt de cette pathologie est immense en immunologie car on peut observer une reconstitution du système immunitaire après la greffe, avec la possibilité d'explorer des phénomènes infectieux *de novo* en rapport avec l'immunodépression et la capacité de développer de nouvelles infections, notamment pendant la phase d'aplasie, ou de réactiver des infections persistantes ou latentes. Cette étude a fait l'objet d'un article intitulé « *Trypanosoma cruzi* cross-reactive antibodies longitudinal follow-up: a prospective observational study in hematopoietic stem cell transplantation » qui est actuellement soumis pour publication.

Quarante-sept pour cent des donneurs de sang français sont porteurs des anticorps appelés TcCRA pour "*Trypanosoma cruzi* Cross reactive antibodies". Afin d'évaluer l'acquisition de TcCRA et caractériser davantage l'origine et le rôle de ce biomarqueur, nous avons mené une étude sur une cohorte de 47 patients qui ont subi une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH). Cette situation constitue effectivement une occasion unique d'observer le développement et/ou la réactivation d'infections ainsi que la reconstitution immunitaire du receveur. De plus, ces patients sont étroitement surveillés pour de nombreuses variables cliniques et biologiques, ce qui rend une étude ancillaire relativement performante.

Recrutée au sein du CHU de Lyon, la cohorte a été suivie pendant plus d'un an : les donneurs et les receveurs ont été testés pour TcCRA avant la transplantation. Les receveurs ont également été testés au cours du suivi thérapeutique. Les données démographiques, cliniques et biologiques ont été recueillies. Notre objectif primaire était d'évaluer le risque d'acquisition du marqueur TcCRA après transplantation. Nous n'avons observé aucune acquisition de TcCRA chez les patients recevant des cellules d'un donneur TcCRA négatif (n = 23), mais nous avons détecté 4 séroconversions parmi les 24

patients ayant reçu des cellules d'un donneur TcCRA positif. Dans cet article, nous discutons les différents scénarios possibles pour expliquer le transfert de l'immunité TcCRA du donneur au receveur et ses causes possibles (transfert adaptatif de l'immunité, transmission de l'agent inducteur de TcCRA, réactivation virale...).

***Trypanosoma-cruzi* Cross-Reactive Antibodies longitudinal follow-up: a prospective observational study in Hematopoietic Stem Cell Transplantation**

Esber S Saba^{1,3*}, Lucie Gueyffier^{1*}, Marie-Laure Dichtel-Danjoy¹, Philippe Vanhems², Bruno Pozzetto³, Mohamad Sobh², Hans Pottel⁴, Mauricette Michallet² and Maan A Zrein^{1,2}.

1 InfYnity-Biomarkers, Ecully, France,

2 Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

3 Laboratories of Bacteriology-Virology, GIMAP EA3064, Faculty of Medicine Jacques Lisfranc, Saint-Etienne, France

4 Interdisciplinary Research Center, Catholic University Leuven, Campus Kortrijk, Kortrijk, Belgium

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: maan.zrein@chu-lyon.fr. 40 avenue Guy de Collongue 69130 Ecully, France. Tel :+33427858064/Fax :+33427502112.

Competing Interests: This study was partly funded by Infynity-Biomarkers the employer of Esber S SABA, Lucie GUEYFFIER, Marie-laure DICHTEL-DANJOY and Maan A ZREIN. Infynity-Biomarkers discovered the biomarker. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all of the Bone Marrow Transplantation journal policies on sharing data and materials. We declare no potential conflict of interest.

Abstract

Forty seven percent of French Blood Donors are carrying antibodies named TcCRA “Trypanosoma cruzi Cross Reactive Antibodies”. In order to evaluate the passive or active transmissibility of TcCRA and further characterize its role and etiology, we have conducted a study in a cohort of 47 patients who underwent Hematopoietic Stem Cell Transplantations (HSCT). HSCT actually offers a unique opportunity to observe the development and/or the reactivation of infections along with receivers’ immune reconstitution. Moreover, those patients are closely monitored for many biological and clinical variables. Recruited from Hôpital Edouard Herriot (Lyon)’s hematology ward, the cohort was followed up over one year: donors and receivers were tested for TcCRA prior to transplantation. Receivers were further tested during the complete therapeutic follow-up (FU). Demographical, clinical and biological data were collected as well. Our primary end-point was to assess the risk of TcCRA acquisition after transplantation. During this initial analysis, we observed no seroconversion in patients receiving cells from a TcCRA negative donor (n=23) but detected seroconversion in 4 out of 24 patients who received cells from a positive donor. Here, we are discussing the possibility of adaptive transfer of TcCRA-immunity from donor to receiver and its possible scenarios (adaptive immunity transfer, and latent virus reactivation).

Introduction

In the course of biomarker evaluation for a neglected disease (Chagas disease), we took an interest in antibodies that are highly prevalent in European serum samples. These specific antibodies were named “*Trypanosoma cruzi* Cross Reactive Antibodies” (TcCRA) to stress out the fact that they were induced by another antigen than the one from *T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease. This serological marker is progressively expressed from childhood to adulthood and reaches a prevalence peak of 47%. Its prevalence stabilizes around 40% in older age groups. These observations suggest a widely spread immunogenic agent, probably latent after acquisition. Additionally, these antibodies are not associated to any of the current clinically-relevant infectious viral agents that we tested [119].

Although many infective agents that constitute human microbiota are not harmful in healthy individuals, some of them can become critical for immunocompromized patients[120],[121]. While HSCT constitutes an effective therapy for blood cancer and bone marrow failure states, adverse effects such as relapse, graft vs. host disease and infections continue to be major causes of morbidity and mortality following the engraftment [122],[123].

Focusing on opportunistic infection, we investigated TcCRA in patients receiving a graft of hematopoietic stem cells and explored potentially associated symptoms. We found that HSCT is well adapted to study TcCRA induction and

dynamics for several reasons:

1/ The close monitoring routine of patients' health are suitable for a non-invasive longitudinal follow-up.

2/ Patients who undergo myeloablative therapy followed by HSCT suffer from a prolonged period of dysfunctional immunity creating favorable conditions for infection and virus reactivation [124],[125].

3/ HSCT provides a unique opportunity to study reconstitution of cellular and humoral immune responses [126],[127],[128].

4/ Donor-receiver pairing are important to evaluate the transmissibility risk of TcCRA adaptive immunity as well as their unknown inducer.

5 / The frequency of latent viral infections tend to increase throughout the adult years, therefore HSCT patients are at greater risk for virus transmission [129].

Consequently, in a prospective study, we tested samples from 47 adult recipients who experienced HSCT as well as from their paired donors. Data concerning age, sex, stem cell source, conditioning regimen, complications and infections were collected during the follow-up (FU) in the Hematology Unit of Hospital Edouard Herriot (HEH, Lyon France). The main objective of the study was to identify whether the seropositive status of the donor constitutes a possible risk of TcCRA seroconversion in patients and the associated mechanisms (transfer of adaptive immunity and/or transmission of TcCRA inducing agent). The secondary objective was to uncover associated clinical outcomes and signs.

Patients and methods

Study design, Patient population

We performed a prospective observational study. Patients and donors were recruited at HEH between January and June 2011. This prospective follow-up was approved by HEH Research institutional review board and all patients gave written informed consent and assent as appropriate. All patients who were eligible for hematopoietic stem cells engraftment were included in the study.

Serum samples collection

In this study, all blood samples were collected during patient's standard care. Likewise, blood samples were drawn from the patients before starting the conditioning regimen, and then before HSCT. During the FU, sera for TcCRA determination were made available at various dates tuned to routine care, with a minimal frequency of one per week during the 12 first weeks following graft. Standard samplings were performed for almost all the patients at 3, 6, 9 and 12 months after the engraftment. For donors, a blood sample was drawn at the time of cells harvest.

Serological testing and events definition

TcCRA were measured in serum samples using an optimized in-house ELISA test. The used method and reagents are described in SABA *et al* 2013. All the collected samples were tested in duplicate at least one time, if necessary twice,

for validation. For some patients we tested serum for anti-measles, anti-mumps and anti-CMV IgG. Those tests were performed using Enzygnost® from SIEMENS.

Conditioning regimen and GVHD (graft vs. host disease) prophylaxis

The conventional conditioning regimen was mainly a combination of cyclophosphamide and total body irradiation (TBI). The reduced-intensity conditioning regimen was mainly fludarabine combined with melphalan, cyclophosphamide, TBI and busulfan. The standard GVHD prophylaxis after the transplantation consisted of cyclosporine A and methotrexate with or without methylprednisolone. Cyclosporine or anti-thymocyte globulin or steroids or a combination of those treatments were used for the treatment of established acute or chronic GVHD.

Viral monitoring

Patient's serological status of cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus and toxoplasmosis were determined prior to transplantation. The serology for human herpes virus 6 (HHV-6) was not performed. Prospectively, all HSCT patients were watched by quantitative real-time PCR for plasma viral load of EBV, CMV and HHV-6 during the FU after HSCT. All patients received prophylactic treatment of acyclovir. Pre-emptive treatment for reactivation of EBV or CMV was initiated

when viral load was detected. CMV was treated with valganciclovir and plasma EBV reactivation with valacyclovir.

Statistical analysis

Statistical analysis was done using the SPSS ver.19 and Graph-pad prism 5. The two-tailed *P* value was considered significant when <0.05 . Mann-Whitney and Fisher exact tests were used to calculate significance of continuous and categorical variables respectively.

Results

Patients' characteristics and TcCRA status at baseline (BL)

Sixty one patients eligible for transplantation of hematopoietic stem cells were included in the study. Fourteen of them were not considered in the analysis because of graft cancellation ($n=5$), auto-engraftment ($n=2$) or absence of donor's sample ($n=7$). Consequently, 47 adult donor / recipient pairs were retained in the analysis and the signals of TcCRA antibody were followed in the sera for a median of 280 days (Median FU, see Table 1 for patients' characteristics). 72% of patients were hospitalized for blood-related malignancy such as acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, Hodgkin's lymphoma and non-Hodgkin's lymphoma. The remaining had nonmalignant hematologic disorders including idiopathic aplastic anemia and myelodysplasia. Twenty patients died during the FU, due to graft complications

or relapse. As a consequence, the numbers of available samples at 3, 6, 9 and 12 months were respectively 41, 39, 31 and 27.

Table 1. Patients' characteristics. None of the variables showed a significant difference in both groups.

	Group donor TcCRA (-)	Group donor TcCRA (+)
Variable [Median (percentile)]		
TcCRA receiver BL (OD)	0.55(0.29-0.81)	0.41(0.20-0.64)
Age receiver (years)	52(35-57)	50(38-58)
FU (days)	304(152-367)	277(104-368)
Total nb of engrafted cells (10 ⁸ cells/Kg)	3.1(1.6-9.8)	4.8(2.3-13.1)
CD 34+ (10 ⁶ cells/kg)	3.05(1.1-.7)	4.5(2.2-6)
CD 3+ (10 ⁶ cells/kg)	39.6(17.3-249)	51.8(21.6-206)
Gender receiver (%)		
Female	11 (50)	11 (50)
Male	12 (48)	13 (52)
Deceased (%)		
No	13 (48)	14 (52)
Yes	10 (50)	10 (50)
Blood malignancy (%)		
No	7 (54)	6 (46)
Yes	17 (48)	18 (52)
Conditioning regimen (%)		
MA	13 (57)	10 (53)
RIC	10 (43)	13 (57)
Stem cells source (%)		
PB	11 (50)	11 (50)
BM	10 (44)	13 (56)
UC	2 (100)	0 (0)
Relation donor-receiver (%)		
Sibling	8 (53)	7 (47)
Unrelated	15 (47)	17 (53)
CMV serology receiver (%)		
IgG (-)	8 (57)	6 (43)
IgG (+)	15 (46)	18 (54)
EBV serology receiver (%)		
IgG (-)	0	0
IgG (+)	23 (48)	24 (50)
HSV1 serology receiver (%)		
IgG (-)	3 (43)	4 (57)
IgG (+)	20 (50)	20 (50)
VZV serology receiver (%)		
IgG (-)	1	0
IgG (+)	22 (48)	24 (52)
Toxoplasmosis serology receiver (%)		
IgG (-)	9 (69)	4 (31)
IgG (+)	14 (41)	20 (59)

Abbreviations: TcCRA = Trypanosoma cruzi Cross Reactive Antibodies; FU = Follow-up; BL = baseline CMV = cytomegalovirus; EBV = Epstein Barr virus; HSV1 = herpes simplex virus 1; VZV = varicella zoster virus; MA = myeloablative; RIC = reduced intensity conditioning; PB = peripheral blood; BM = bone marrow; UC = umbilical cord.

Influence of the donor's serological status on the acquisition of TcCRA immunity

In order to estimate the influence of the donor's TcCRA immunostatus on the receiver, we separated patients with respect to the TcCRA status of their donor. We compared patients' characteristics at baseline of both populations and found out they were homogenous (Table 1). To address the transfer of TcCRA immunity, we calculated the difference in signal vs. baseline (Delta TcCRA) at regular time intervals: 3, 6, 9 and 12 months following graft and compared the distribution of these deltas between both groups defined by the donor's TcCRA immunostatus (Figure 1). A difference between groups started being visible 9 months after graft and significant at 12 months, in a sense that Delta TcCRA signals showed a decrease in patients receiving cells from a seronegative donor as compared to an upward trend in patients receiving cells from a seropositive donor. Donor's positive TcCRA-status apparently had an effect on recipient TcCRA-immunity.

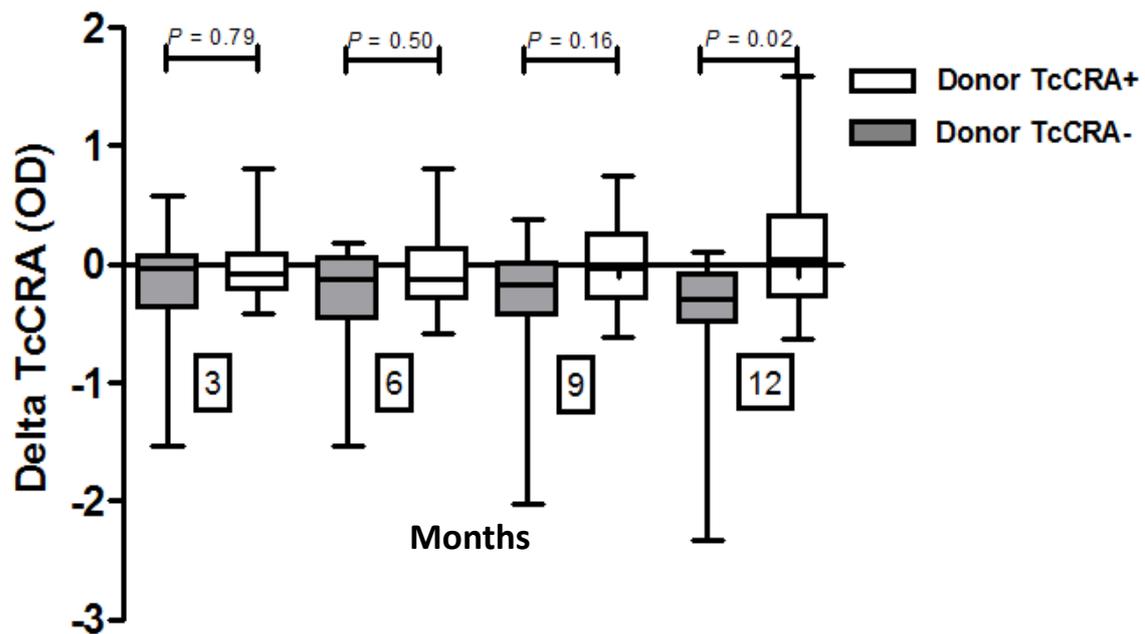


Figure 1: Effect of donor's TcCRA serological status on patients' TcCRA-signal evolution. Delta TcCRA was calculated at 3 (e.g. delta TcCRA= TcCRA3m-TcCRA0m), 6, 9 and 12 months after graft to evaluate the gain or loss of TcCRA signal. The numbers of available samples at 3, 6, 9 and 12 months were respectively 41, 39, 31 and 27. Mann Whitney test was used to calculate P values. A P value < 0.05 was considered as significant.

Longitudinal follow-up of TcCRA over one year after graft

Based on the observation of a late influence of the donor's TcCRA-status, we focused our analysis on the 27 patients with available samples after 9 months. We established a graphical representation of TcCRA signal evolution for each of these 27 patients and observed 4 different profiles (Figure 2 showing a selection of representative cases for each). The first pattern is characterized by a general downward trend of TcCRA signal. In 8 patients with high level of TcCRA (> 1 OD) at inclusion, a decrease in signal was observed after the conditioning phase until the end of the follow-up (Figure 2, IB1). The second one, documented only in one patient, TcCRA signal rises early after graft (forty seven days) and then

stabilizes until the end of the follow-up. A late increase in TcCRA signal, happening in the last half of the post-graft year, typifies the third profile represented by IB3. Finally, some patients were neutral “IB4”; no signal variation was observed (Figure 2). We have also observed transient peak (> 0.2 OD) of TcCRA signal. We were able to correlate these peaks with a passive transfer of antibodies, carried out mainly through IVIg (intravenous immunoglobulin) injections (symbolized by black arrows in Figure 2) and to a lesser extent through transfusions.

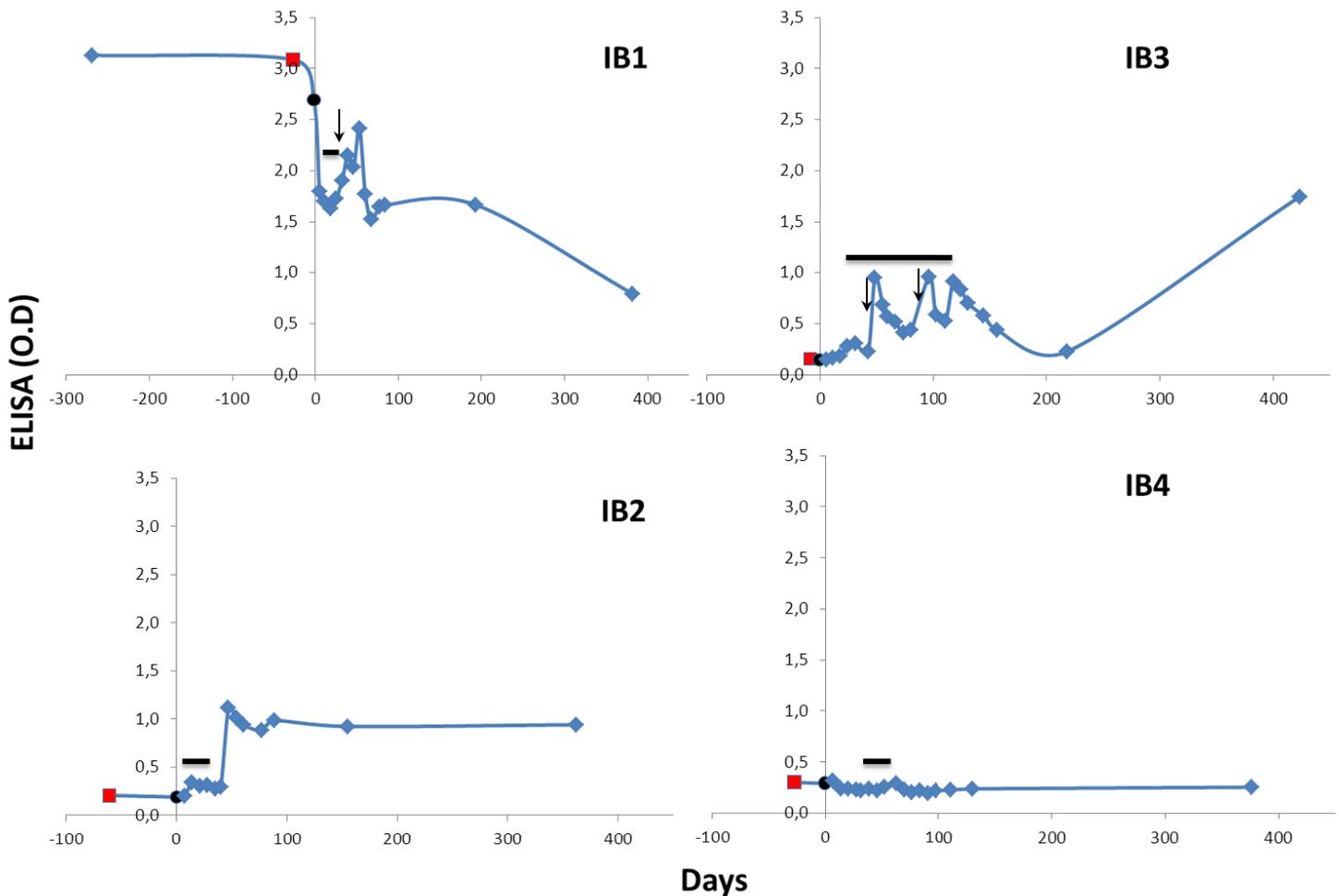


Figure 2: TcCRA profile of four patients during the follow-up.

The X axis represents time in days, where day zero designates the engraftment day. The Y axis represents TcCRA signals (OD) in receivers. The red square and black circle respectively represent the beginning and end of the conditioning period. Black arrows symbolize the dates of IVIg injections while black lines indicate transfusion periods of other blood-products. Patient IB1 is showing that TcCRA is stable before conditioning but significantly decreases afterwards with fluctuations (the peak correlating to IVIg injection). Patient IB2 exhibits an increase after graft then some fluctuations before stabilization in the TcCRA response from day 47 till day 362. For the patient IB3, TcCRA signal shows a transient peak, correlated with consecutive injections of IVIg, before dropping back to the initial TcCRA signal, this patients experience a major increase in TcCRA at the end of the FU. Finally, patient IB4 represents the group of patients who had no signal variation till the end of the follow-up.

Influence of the donor's serological status on the receiver's post-graft antibody repertoire

Interestingly, three patients who had a profile similarity to the third one, with a late increase in TcCRA signal, have had TcCRA seropositive donors which evoked the process of immune reconstitution in patients. To validate this hypothesis, we tested patients for anti-measles and anti-mumps IgGs, representative of infections that are widely prevalent but unlikely to reactivate. We found that, over one year of follow-up, patients were more likely to acquire their donor's immune repertoire, as was apparent for patients IB5, IB3 and IB2 (Figure 3). Interestingly enough, while the timeline for TcCRA acquisition could differ (late in the third profile vs. early in the fourth one), no discrepancy was witnessed on both other tested antibodies.

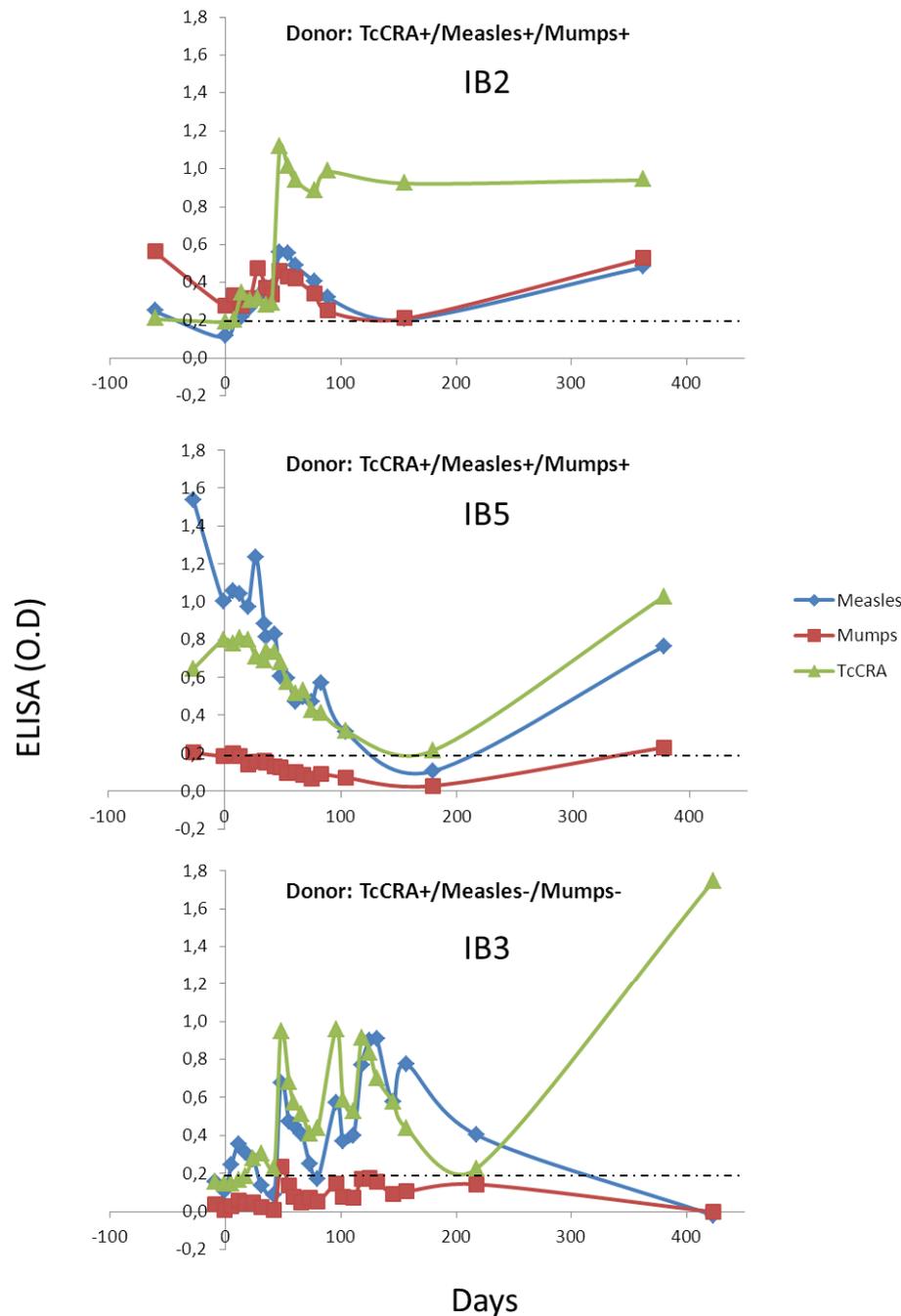


Figure 3: Three patients' antibodies profiling including TcCRA (blue line), anti-measles (red line) and anti-mumps (green line). Donor's serological status is presented for each patient as well. 0.2 O.D represents the cutoff for anti-measles and anti-mumps antibodies (black dotted line). Patient IB5 had a positive donor for the three tested antibodies, one year post-graft the patient developed positive antibody signal for TcCRA, anti-measles and anti-mumps. Patient IB3 had a TcCRA positive, anti-measles negative and anti-mumps negative donor, his antibodies profile after more than one year turned out to be equivalent to his donor's. Finally, patient IB2, with a donor profile similar to patient IB5, showed a strong positive TcCRA signal shortly after graft, which was not the case for both other antibodies displaying the same pattern as for patient IB5 (increase over the second half of the year following graft).

Early post-graft specific antibody forming ability

To further investigate the observation documented for the patient IB2, with an early increase in TcCRA signal suggesting a specific stimulus, we selected a third infectious agent (CMV) as a comparison basis, also largely spread and strongly susceptible to reactivation in transplanted patients. We measured anti-CMV antibodies in receivers who underwent CMV reactivation (Figure 4). All the tested patients were CMV positive at inclusion. Patients who received cells from a CMV seropositive donor were able to specifically respond upon CMV reactivation: Figure 4 shows that these patients had an increase in anti-CMV antibodies after the detection of CMV viremia (symbolized by a black arrow) occurring within the first three months after graft. This was not the case of patients with a CMV seronegative donor who were not able to respond after the reactivation and failed to produce specific anti-CMV antibodies during the early post-graft stages.

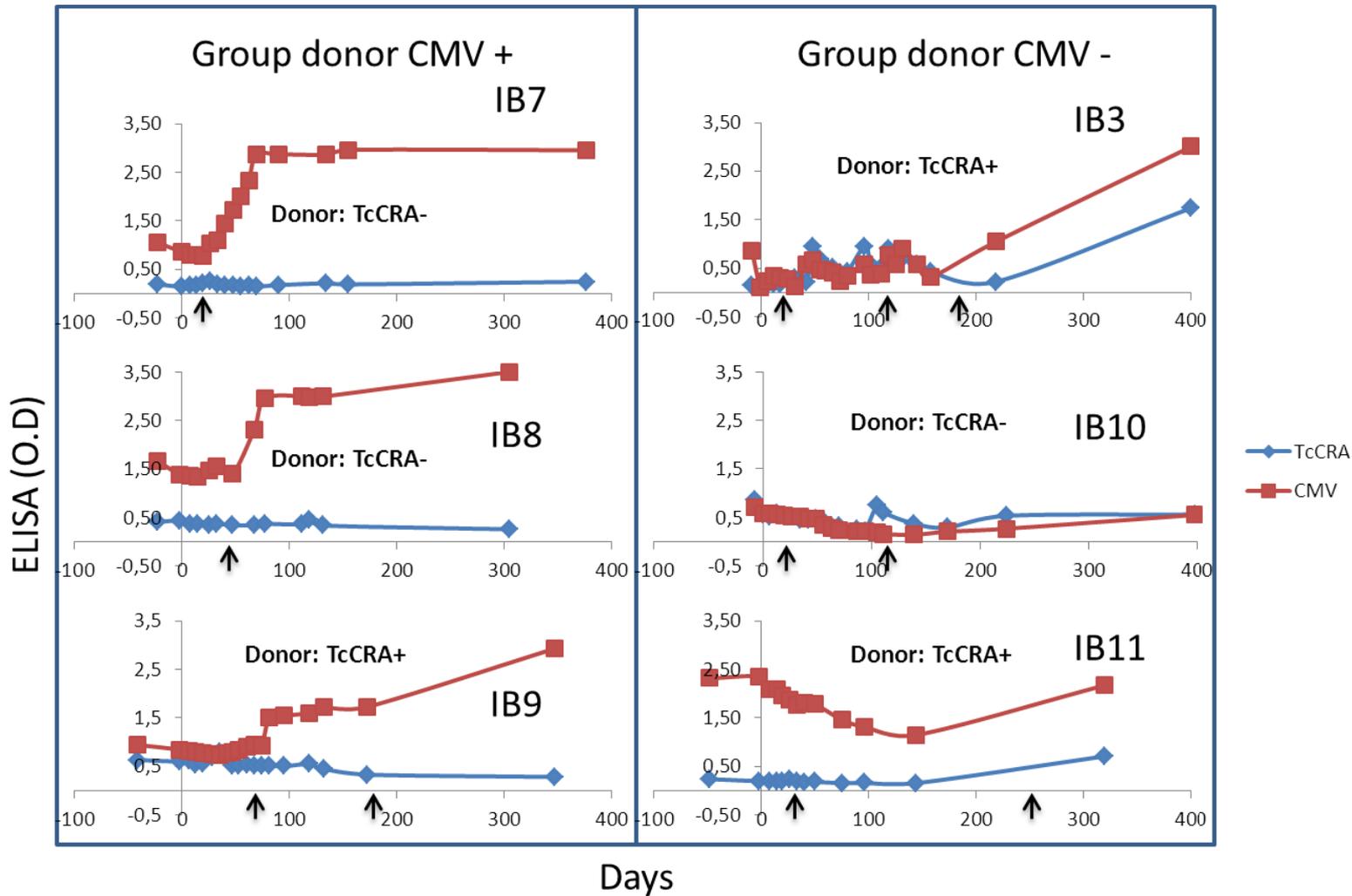


Figure 4: Patients' antibodies profiling including TcCRA (blue line) and anti-CMV (red line). Donor's serological status is presented for each patient as well. 0.2 O.D represents the cutoff for anti-CMV antibodies. The black arrows indicate the day of post-graft CMV reactivation (measured by PCR). Patients who received cells from a CMV seropositive donor were able to specifically respond upon CMV reactivation, whereas patients with a CMV seronegative donor failed to prompt a specific anti-CMV response. Nevertheless, IB3, IB10, IB11 had a positive anti-CMV signal at the final point of the follow-up, at a time when the immune system seems to be functioning again.

Discussion

TcCRA are newly discovered antibodies of unknown origin, which might be the result of infection with an asymptomatic latent agent [119]. In this observational, non-interventional study, we prospectively evaluated the expression and dynamics of TcCRA in 47 pairs of adult HSCT donors/receivers. This study was the first longitudinal observation made on TcCRA. In the few patients we had samples from before graft, TcCRA expression showed to be stable over time (Figure 2, IB1). Along with immunodepletion entailed by conditioning regimens, a decrease in TcCRA levels was observed. The loss or decline of protective immunity is common in the early phase following allogeneic HSCT and generally contributes to patients' susceptibility to infections [130]. This decline has been documented for immunity acquired in childhood through natural infections or vaccines, for example against mumps, rubella and poliomyelitis [131]. We found that TcCRA-positive patients experienced a similar trend with a 50 % loss of reactivity 90 days after graft (Data not shown). We also observed that transient peaks in TcCRA signal mainly correlate with exogenous IgGs administration. The level of those passively transferred IgGs progressively decreased until complete clearance 30-60 days after the initial injections. Furthermore, intervals to seronegativity were also totally dependent on the amount and the frequency of injections (data not shown). Taking into consideration that TcCRA is present in 47% of blood donations, we were not

surprised to detect its presence in human blood plasma used to prepare polyclonal therapeutic IVIGs.

Our primary end-point was to assess the risk of TcCRA-immunity acquisition after the receiver exposition to either a positive or a negative donor following HSCT. We are reporting here a TcCRA immunity acquisition in four patients after engraftment of cells from positive donors, clearly unrelated to IVIG. In three patients out of four, TcCRA acquisition showed a similar profile to the ones of anti-measles and anti-mumps antibodies, characteristic by their large prevalence in the general population and the low probability of acute infection of their inducing pathogens. The antibody production observed in these patients beyond 6 month after HSCT appeared to reflect the transfer of immunity from donors' cells after complete hematopoietic engraftment [132]. This hypothesis is built on four pieces of evidence. First, the antibodies that were induced in receivers after HSCT matched the donors' immune repertoire. Second, when donors were negative, receivers were found to be negative, including receivers who were positive at base-line. Third, receivers who developed serum IgG titers to measles and mumps were unlikely to be "environmentally re-immunized". Fourth, passive antibodies transferred through administered blood derivatives did not influence antibody titers 6 months after graft. It is important to mention that a positive donor did not automatically lead to a positive receiver, however, our results showed that the reciprocal was true, at least for TcCRA, anti-measles and anti-mumps. Apparently, other factors such as prolonged immune dysfunction and GVHD might play a role in obstructing the receiver's immune

reconstitution and antibody production [133]. Without samples collected beyond one year after graft, we could not validate this possible explanation in cases where the immune repertoire of the donor was not reconstituted in the receiver. To our perspective, evidences mentioned above were not sufficient to explain why the TcCRA profile for patient IB2 was different (Figure 2). Interestingly, in this case, the donor's TcCRA signal was amongst the highest. The early development and the consequent persistence of this immune response were particularly remarkable. The levels of detected antibodies suggested a main role of specific B cells activation upon specific stimulus. To challenge this idea, we measured anti-CMV antibodies in patients who underwent periods of CMV reactivation. Remarkably, only receivers whose donors had a CMV positive serology were capable of responding quickly after reactivation. It has indeed been described that selecting a CMV-seropositive donor was preferable for a CMV-seropositive recipient [134]. Moreover, CMV-seropositive patients who receive grafts from CMV-seronegative donors have an increased risk of both repeated CMV reactivation and CMV disease [135] which was the case of patient IB3 figure 4 , though, it doesn't seems plausible that the detected anti-CMV antibodies resulted from the persistence of differentiated host B cells, because it would also be observed in patients receiving cells from CMV-seronegative donors, like IB3 and IB9 (Figure 4). It was evident that anti-CMV antibodies response was detected before complete hematopoietic engraftment which usually takes from 6 months up to 2 years depending on the cell type and on complication's like cGVHD [136],[137]. Moreover, these serum antibodies could

not be explained by passive transfer associated with blood products or IVIg, because, first the response were correlated with CMV reactivation, second the response increases specifically and stabilized until the end of the follow-up. Therefore, the adaptive transfer of primed immune cells from the donor to the recipient appeared to be a more suitable scenario. Actually, the adaptive transfer of immunocompetent cells routinely occurs during allogeneic HSCT [138]. This was reported in publications on the effectiveness of vaccination after HSCT [131],[139], as well as through cancer therapy where immunized donor against tumor specific antigen might increase the recipient anti-cancer response after HSCT [140],[141]. The ultimate goal of those treatments was to instruct donors' immune system to recognize either viral or cancer specific antigen, with the hope that antigen-primed lymphocytes were present in the harvested cells transferred to the patients. For instance, Parkkali et al. showed that immunization of donors with Hib and diphtheria vaccines before cells harvest resulted in higher Hib and diphtheria antibody concentrations after recipient vaccination with these same vaccines [142]. Similarly, Gottlieb et al. immunized donors and/or recipients before transplant with a polyvalent pseudomonas O-polysaccharide- toxin a conjugate vaccine. They found that when either donor or recipient alone was vaccinated, no increase in specific antibody signals was detected in the recipient after transplant. But, when both donor and recipient were vaccinated, antibody signals increased to levels shown to be protective early enough in the engraftment process [143]. Taking this into consideration, the obligation to immunize both donor and recipient revealed the need for primed

donor's lymphocytes to be transmitted in the grafted cells inoculum and *de novo* stimulation by the antigen in the receiver to produce specific IgGs. Our experiments further document this double condition to be met to mount a specific anti-CMV antibody response immediately after graft, i.e. the combination of primed B-cells from the donor and an immunogenic booster (CMV reactivation in this case).

The comparison with the early rise in TcCRA signal in patient IB2 suggested a possible stimulation of donor's primed B-cells by the infectious agent inducing TcCRA. This patient being TcCRA-seronegative at inclusion, it was unlikely that the agent was present in the host before graft. It could therefore derive either concomitantly with the graft or from an external source like transfusion or environmental exposure. The second possibility was however unlikely to explain the seroconversion of patient IB2; seroconversion occurred in a short period of time after graft when patients were carefully isolated from the outside world, which excluded environmental contamination. As for the infection risk related to transfusion, it was highly minimized by the use of leuco-reduced products [144]. Given the high TcCRA level of the donor and the fact that latent viruses such as the ones from the herpes family are frequently transmitted via the transplanted cells [129], we couldn't unacknowledged the possibility of agent transmission via donor cells, at least for this specific case.

In conclusion, this study has undoubtedly put forward our hypothesis of the implication of an unknown, probably latent, asymptomatic virus responsible of TcCRA induction and possibly transmitted by blood cell. This agent may be

part of the uncharacterized viruses that constitute 15% of healthy individuals' blood virome as it was recently proposed by Popgeorgiev N *et al.* in their work on marseillevirus [145],[146]. Some logistic difficulties and the insufficient numbers of donor-recipient pairs did not allow us to cover our other objectives regarding clinical signs, factors and complications that might be correlated with the induction of TcCRA specific antibodies. Nonetheless our data showed the need to pursue research on the composition of blood derived products used in transplantation that may have a clinical significance at one point in time.

Chapitre 4 : Discussion générale et conclusion

L'antigène TCSP est dérivé de la famille de protéine ribosomale 60S du parasite *T. cruzi*. Cette séquence peptidique constitue un fragment d'une région plus large, structurée en tandems répétitifs et riche en alanine et en proline. De plus, la recherche *in silico* de similarités montre que TCSP porte des homologies de séquence avec plusieurs protéines exprimées par le parasite (**Tableau 9**, p.78). Ces observations *in silico* ont été confirmées lorsque nous avons montré que les anticorps de lapin produits après immunisation avec TCSP ont reconnu spécifiquement plusieurs protéines de tailles différentes sur un western blot de *T. cruzi* (**Figure 29**, p.90). Les protéines contenant des répétitions en tandems ont été décrites en tant que cibles de la réponse immunitaire au cours de l'infection par *T. cruzi*. C'est le cas notamment des membres de la famille de la trans-sialidase [147], de l'antigène répétitif cytoplasmique, de l'antigène répétitif flagellaire [148], de la protéine B13 de la surface du trypomastigote [149] et des protéines ribosomales [150]. Ainsi, les riboprotéines sont fortement immunogènes chez les vertébrés, ce qui explique pourquoi elles ont été utilisées dans le diagnostic sérologique de l'infection par *T. cruzi* [151] [152]. Il a été suggéré que la réponse immunitaire dominante dirigée contre ces protéines pourrait être consécutive à leur abondance, à leur stabilité dans la circulation et à leur capacité à être phagocytées et transformées par les cellules présentatrices d'antigènes [153]. Cependant, ces épitopes répétitifs trouvés dans de nombreuses protéines parasitaires ne suscitent pas une protection immunitaire très efficace et peuvent faciliter un échappement du parasite en déviant la réponse immunitaire vers ces régions répétées hautement immunogènes mais qui ne sont pas nécessairement importantes pour la survie du parasite [154]. Nous avons vu que la majorité des personnes infectées par *T. cruzi* développe des anticorps anti-TCSP avec une

séroprévalence de l'ordre de 96%. Même si cette sensibilité de TCSP pour le sérodiagnostic de la maladie de Chagas paraît intéressante, TCSP est inutilisable à titre diagnostique à cause de son manque de spécificité.

Les personnes non infectées par *T. cruzi* prises hors zone endémique ont une séroprévalence de 45% pour les anticorps anti-TCSP. Pour distinguer ces derniers des anticorps anti-TCSP induits par l'infection par *T. cruzi*, nous les avons appelés TcCRA. Dans le cadre des tests ELISA employés dans le dosage des anticorps anti-TCSP, la discrimination n'est pas possible entre les anticorps produits suite à une infection par *T. cruzi* et les anticorps à réactivité croisée TcCRA. Chez certains donneurs de sang, nous avons observé que le taux de TcCRA peut atteindre des titres supérieurs à 12800 (**Figure 17**, p.75). Nous avons aussi montré que TcCRA purifié par affinité à partir d'une poche d'un plasma fortement positif pour ce marqueur est capable de reconnaître des protéines natives du parasite en immunofluorescence (**Figure 14**, p.71) ; ces protéines sont localisées entre 35 et 38 KDa sur un western-blot de *T. cruzi* (**Figure 15**, p.72). Compte tenu de la forte réactivité croisée de TcCRA avec le parasite, ces anticorps pourraient expliquer un certain nombre de fausses réactivités généralement observées dans les tests de dépistage qui utilisent des extraits totaux de *T. cruzi* [89] [96] [97].

Toutes ces expériences ont permis de documenter un phénomène de mimétisme moléculaire entre le parasite *T. cruzi* et un agent inconnu qui pourrait être un parasite, un virus, une bactérie ou un antigène du soi.

En dehors peut-être de certains antigènes bactériens, il existe peu d'exemples de mimétisme moléculaire entre pathogènes relativement distants dans la littérature. Tel est le cas de la réactivité croisée entre HCV et le virus de la grippe décrite par Wedemeyer et al. Ces auteurs ont réussi à stimuler spécifiquement des cellules T provenant des donneurs de sang HCV négatif par

un peptide dérivé de la protéine NS3 de HCV. Ils ont en outre confirmé que la réactivité croisée est liée à un peptide du virus de la grippe [155]. La plupart des cas documentés de réactivité croisée en pathologie infectieuse fait référence à une interaction entre un agent infectieux et un auto-antigène plutôt qu'entre deux agents pathogènes.

T. cruzi est l'un des exemples les plus étudiés pour le mimétisme moléculaire. Ce mimétisme a été notamment proposé pour expliquer (au moins partiellement) la pathogénèse de la maladie de Chagas. L'immunisation avec le peptide R13 (EEEDDDMGFGLFD) dérivé de la protéine ribosomale TcP2beta génère des anticorps anti-R13 qui ont une activité stimulante du récepteur bêta-1 adrénergique. Il existe en effet une corrélation entre la présence d'anticorps anti-R13 et l'existence d'une tachycardie supra-ventriculaire entraînant la mort des souris. Ces résultats suggèrent que ces anticorps seraient capables de générer des troubles du rythme suite à leur fixation sur le tissu cardiaque normal, puisque aucune lésion inflammatoire ou de fibrose n'a été constatée suite à un examen histologique [156] [74] [157]. Plusieurs équipes de chercheurs ont validé expérimentalement la capacité de liaison de ces auto-anticorps fonctionnels au récepteur bêta-adrénergique cardiaque, mais le débat reste ouvert sur le rôle de ces anticorps dans la genèse de la maladie de Chagas par rapport à celui de la persistance parasitaire. Sur un nombre très faible d'animaux (4 souris), nous avons observé une corrélation entre la mort des souris immunisées par TCSP et la réponse sérologique anti-TCSP (**Figure 26**, p.87). Les analyses effectuées sur les cœurs des souris mortes ne montraient aucune anomalie (**Figure 27**, p.88); la présence de stigmates de congestion pulmonaire pourrait expliquer la mort des animaux suite à une infection respiratoire. Etant donné l'historique des travaux sur R13, il sera sans doute long et difficile d'apporter les preuves que les anticorps TcCRA induisent des maladies auto-immunes, d'autant qu'il faut souvent attendre une très

longue période (plusieurs années, voire des décennies) entre la génération des auto-anticorps et le développement d'une maladie clinique associée, ce qui nécessite des études épidémiologiques sur de nombreuses années avant de produire des résultats [3]. Par ailleurs, l'apparition de maladies auto-immunes nécessite souvent l'association de plusieurs facteurs comme une prédisposition génétique et des expositions environnementales [158]. Cette complexité explique sans doute pourquoi la preuve directe de la contribution d'une infection à un phénomène auto-immun est si difficile à apporter, comme ce fut le cas pour le syndrome de Guillain-Barré [159] et le rhumatisme articulaire aigu [160].

En 1999, notre équipe a montré que les personnes infectées par HIV ont les titres de TcCRA les plus élevés ; quasiment la totalité des personnes séropositives pour HIV étaient également positives pour TcCRA (**Figure 9**, p.54). Ces observations évoquent la survenue ou la réactivation d'une infection opportuniste favorisée par l'état immunitaire médiocre de ces patients. En revanche, en 2010, nous avons montré que les personnes infectées par HIV n'ont plus la même séroprévalence pour TcCRA (**Figure 13**, p.68). La diminution du titre de TcCRA entre les années 1999 et 2010 pourrait être expliquée par l'instauration de traitements anti-HIV plus efficaces. Il a en effet été rapporté une diminution de 96,6 % des infections opportunistes suite à l'initiation des thérapies antirétrovirales hautement actives (HAART) [161]. Dans les pays développés, il a été constaté une réduction d'environ 30% de la prévalence de la cardiomyopathie associée à HIV, en lien possible avec une réduction des infections opportunistes [162].

Nous avons montré par ailleurs que l'agent inducteur de TcCRA est acquis dès l'enfance ; ainsi, la séroprévalence des anticorps TcCRA augmente au fur et à mesure de l'âge pour atteindre 45 % à 30 ans (**Figure 16**, p.73). Il faut noter que

la prévalence réelle de l'agent inducteur des anticorps TcCRA est difficile à évaluer en se basant sur une seule spécificité anticorps, d'autant qu'il est fortement probable que les personnes infectées par cet agent ne développeront pas toutes des anticorps TcCRA. En conséquence, cette prévalence de 45% chez les donneurs de sang pourrait représenter une sous-estimation de la réelle prévalence de l'agent inducteur. Nous avons remarqué que le profil de l'acquisition en bas âge de TcCRA est similaire au profil d'acquisition de l'immunité antivirale en général. La constatation d'une immunité progressivement croissante au cours de l'âge est courante pour de nombreuses infections virales, comme cela a été montré notamment pour HSV1, CMV, le parvovirus B19, VZV, le virus de la rubéole, le virus des oreillons ou encore celui de la rougeole [163][164][165][166][167]. Nous avons exploré l'hypothèse que les anticorps TcCRA pourraient être induits suite à une infection par un des agents viraux largement répandus dans la population générale. Nous n'avons pas trouvé d'association directe entre TcCRA et différents virus, que ce soit des herpesviridae bien identifiés (à savoir HSV1 et 2, VZV, HHV6, EBV et CMV) ou d'autres virus (adénovirus, parvovirus B19, virus des oreillons, virus de la rubéole, virus respiratoire syncytial, virus de la rougeole et entérovirus) (**Tableau 8**, p.77). Sur la base de ces observations, nous suggérons que le déclencheur de l'immunité TcCRA puisse être soit un variant majeur d'un agent infectieux connu soit un nouvel agent encore non décrit. Il pourrait aussi s'agir d'un agent de nature parasitaire ; en effet, la réactivité croisée entre *T. cruzi* et des espèces étroitement apparentées comme *T. rangeli* ou *Leishmania* ou avec des espèces plus éloignées a été effectivement observée [91]. Cependant, aucune de ces espèces ne circule en Europe et notamment en France ; il est donc peu probable qu'elles puissent expliquer la séroprévalence élevée de TcCRA. *Toxoplasma gondii* serait un candidat plus intéressant car il s'agit d'un parasite assez répandu et acquis

principalement durant l'enfance [168]. La recherche *in silico* de la similarité de séquence avec Q7M3W1 montre une homologie avec la protéine V5AYY3 de *T. gondii*. Néanmoins nous n'avons pas trouvé de différence de prévalence de TcCRA entre les groupes immuns et non immuns vis-à-vis de ce parasite, ce qui réduit la probabilité que *T. gondii* soit l'agent inducteur des anticorps TcCRA. Par cette même approche, nous avons observé des homologies potentielles de séquences entre TcCRA et des antigènes autres que ceux de *T. cruzi*. Il n'a pas été identifié de similarités significatives avec des pathogènes connus en clinique humaine. Assez curieusement, l'annotation de Q7M3W1 (eucaryote) a indiqué un regroupement de TcCRA au sein de la superfamille de protéines du gène 22 du virus varicella-zona (**Figure 20**, p.81). Indépendamment, Q7M3W1 présente des homologies avec les gènes d'ORF24 de certains virus herpès des équidés. Nous avons montré que le peptide résultant de cette similarité ne réagit qu'avec une minorité des sérums provenant d'individus TcCRA positif. L'intérêt pratique de ces travaux dans l'étude du marqueur TcCRA n'est pas totalement clarifié ; néanmoins, ces résultats confortent l'hypothèse de l'implication d'un nouveau virus dans l'induction de TcCRA.

Au cours de l'étude observationnelle non interventionnelle que nous avons conduite chez les patients ayant subi une allogreffe des cellules souches hématopoïétiques, nous avons évalué prospectivement l'expression et la dynamique d'acquisition de TcCRA chez 47 paires d'adultes (donneurs et receveurs). Cette étude est la première analyse observationnelle longitudinale réalisée sur TcCRA. L'objectif était d'évaluer le risque d'acquisition des anticorps TcCRA chez les receveurs après transplantation. Nous rapportons l'acquisition d'une immunité TcCRA chez quatre patients après la greffe. Chez trois de ces quatre patients, l'acquisition de TcCRA a montré un profil similaire à celui des anticorps anti-rougeole ou anti-oreillons. La production d'anticorps observée chez ces patients au-delà de six mois après TCSH semblait refléter le

transfert de l'immunité des cellules du donneur après reconstitution hématopoïétique complète [132]. Cette hypothèse repose sur quatre éléments de preuve. Tout d'abord, les anticorps qui ont été induits chez les receveurs après TCSH correspondent au répertoire immunitaire du donneur. Deuxièmement, lorsque les donneurs étaient négatifs, les receveurs devenaient également négatifs, y compris ceux qui étaient positifs à l'inclusion. Troisièmement, les receveurs qui ont développé des titres d'IgG sériques contre les virus de la rougeole et des oreillons avaient peu de chance d'être infectés par ces agents pendant cette période. Finalement, en raison de leur demi-vie relativement courte, les anticorps passifs transférés par les dérivés sanguins administrés n'ont pas pu influencer les titres d'anticorps durant six mois après la greffe. Il est important de souligner qu'un donneur positif ne conduisait pas automatiquement à un receveur positif après la greffe, au moins pour TcCRA, les anticorps anti-rougeole et les anticorps anti-oreillons. Le quatrième patient a acquis TcCRA d'une façon totalement différente dans le sens que l'acquisition a été très précoce après la greffe. Il est intéressant de noter que, dans ce dernier cas, le signal TcCRA (reflet du titre) du donneur était parmi les plus élevés. Le développement précoce et la persistance de cette réponse immunitaire ont été particulièrement remarquables. Les anticorps détectés suggèrent un rôle principal de l'activation des cellules B spécifiques après la stimulation antigénique correspondante. Pour confirmer cette idée, nous avons mesuré les anticorps anti-CMV chez les patients ayant présenté une réactivation par CMV. Remarquablement, seuls les receveurs dont les donneurs avaient une sérologie positive pour CMV étaient capables de réagir rapidement après la réactivation. Les anticorps anti-CMV ont été détectés avant la reconstitution complète du système immunitaire, qui prend généralement de 6 mois à 2 ans selon le type de cellules greffées et les complications après la greffe [136] [137]. Par conséquent, le transfert adaptatif des cellules

immunitaires du donneur au receveur semble être le scénario le plus approprié pour expliquer ces observations [138]. Il semble qu'une double condition doive être remplie pour obtenir une réponse humorale spécifique immédiatement après la greffe, à savoir le transfert adaptatif de cellules matures spécifiques de l'antigène et une stimulation antigénique par l'agent (réactivation ou infection). Compte tenu du titre élevé de TcCRA chez le donneur et du fait que les virus latents, tels que ceux de la famille de l'herpès sont souvent transmis par les cellules transplantées [129], alors que le risque d'infection lié à une transfusion est minime suite à l'utilisation de produits leucodéplétés [144], nous concluons dans ce cas à une possibilité de transmission de l'agent inducteur de TcCRA par l'intermédiaire des cellules du donneur.

En conclusion, nous avons établi que la spécificité TcCRA observée dans les sérums de sujets européens non exposés à *T. cruzi* résultait vraisemblablement d'une stimulation antigénique suite à une infection par un nouvel agent acquis tout au long de la première moitié de la vie. La nature de cet agent reste inconnue, même si différents arguments sont plutôt en faveur d'un piste virale et notamment d'un virus appartenant aux herpesviridae. Cet agent peut être transmis au cours d'une greffe de cellules hématopoïétiques. Nous rapportons en effet le cas d'un patient qui a présenté une séroconversion TcCRA suite au transfert adaptatif de cellules potentiellement infectées par cet agent.

D'autres travaux sont nécessaires pour caractériser plus finement l'agent incriminé. Nous envisageons notamment un séquençage haut débit du sérum du patient qui a montré un profil de séroconversion, avec l'objectif d'identifier l'agent inducteur. En parallèle, nous étudierons la présence du marqueur TcCRA sur les patients de la cohorte PROOF avec l'idée de mettre en évidence d'autres séroconversions tardives sur des suivis longitudinaux sur le long terme (plusieurs dizaines d'années).

Le rôle physiopathologique de ce biomarqueur mérite également d'être approfondi. Par analogie avec le mimétisme moléculaire potentiellement à l'origine des lésions cardiaques de la maladie de Chagas, nous avons observé une forte réactivité de TcCRA sur le muscle squelettique. Ce résultat doit être conforté dans les mois à venir sur une banque de tissus musculaires sains et pathologiques disponibles au Laboratoire de Physiologie de l'exercice de la Faculté de médecine à Saint-Etienne.

Même si les travaux présentés dans ce rapport ne permettent pas de conclure définitivement, ils suggèrent l'existence d'un pathogène, vraisemblablement viral, qui serait acquis au cours de l'enfance, de l'adolescence et chez l'adulte jeune. L'antigène immunodominant généré par la réponse humorale contre cet agent est très proche d'une protéine ribosomale de *T. cruzi*. Cependant les études *in silico* montrent que cette protéine pourrait également être apparentée à une famille de protéines présentes chez les *alpha-herpesvirinae*. Les travaux ultérieurs qui découleront de cette étude permettront de vérifier si les hypothèses avancées ci-dessus correspondent effectivement à la caractérisation d'un nouveau pathogène humain.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Vasan RS (2006) Biomarkers of Cardiovascular Disease Molecular Basis and Practical Considerations. *Circulation* 113: 2335–2362.
2. Klareskog L, Amara K, Malmström V (2014) Adaptive immunity in rheumatoid arthritis: anticitrulline and other antibodies in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 26: 72–79.
3. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, et al. (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349: 1526–1533.
4. Lindner G, Pfortmueller CA, Braun CT, Exadaktylos AK (2013) Non-acute myocardial infarction-related causes of elevated high-sensitive troponin T in the emergency room: a cross-sectional analysis. *Intern Emerg Med*.
5. Nakamura M, Koeda Y, Tanaka F, Onoda T, Itai K, et al. (2013) Plasma B-type Natriuretic Peptide as a Predictor of Cardiovascular Events in Subjects with Atrial Fibrillation: A Community-Based Study. *PloS One* 8: e81243.
6. Noh JM, Han B-K, Choi DH, Rhee SJ, Cho EY, et al. (2013) Association between BRCA Mutation Status, Pathological Findings, and Magnetic Resonance Imaging Features in Patients with Breast Cancer at Risk for the Mutation. *J Breast Cancer* 16: 308–314.
7. Honrado E, Benítez J, Palacios J (2005) The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 18: 1305–1320.
8. Califf RM (2013) Biomarkers, putative surrogates, surrogates, and decision making. *Circ Cardiovasc Imaging* 6: 6–7.
9. Aronson JK (2005) Biomarkers and surrogate endpoints. *Br J Clin Pharmacol* 59: 491–494.
10. Scaros O, Fisler R (2005) Biomarker technology roundup: from discovery to clinical applications, a broad set of tools is required to translate from the lab to the clinic. *BioTechniques Suppl*: 30–32.
11. Marrer E, Dieterle F (2007) Promises of biomarkers in drug development--a reality check. *Chem Biol Drug Des* 69: 381–394.
12. Cummings J, Ward TH, Dive C (2010) Fit-for-purpose biomarker method validation in anticancer drug development. *Drug Discov Today* 15: 816–825.
13. LaBaer J (2005) So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). *J Proteome Res* 4: 1053–1059. doi:10.1021/pr0501259.
14. Fortmann SP, Ford E, Criqui MH, Folsom AR, Harris TB, et al. (2004) CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the population science discussion group. *Circulation* 110: e554–559.
15. Apple FS, Parvin CA, Buechler KF, Christenson RH, Wu AHB, et al. (2005) Validation of the 99th percentile cutoff independent of assay imprecision (CV) for cardiac troponin monitoring for ruling out myocardial infarction. *Clin Chem* 51: 2198–2200.
16. Sunderman FW Jr (1975) Current concepts of “normal values,” “reference values,” and “discrimination values,” in clinical chemistry. *Clin Chem* 21: 1873–1877.

Références bibliographiques

17. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, et al. (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360: 1903–1913.
18. Hecker M, Lorenz P, Steinbeck F, Hong L, Riemekasten G, et al. (2012) Computational analysis of high-density peptide microarray data with application from systemic sclerosis to multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 11: 180–190.
19. Gibson DS, Banha J, Penque D, Costa L, Conrads TP, et al. (2010) Diagnostic and prognostic biomarker discovery strategies for autoimmune disorders. *J Proteomics* 73: 1045–1060.
20. Fritzler MJ (2008) Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. *Autoimmun Rev* 7: 616–620.
21. Prata A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1: 92–100.
22. Alves MJM, Mortara RA (2009) A century of research: what have we learned about the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host cells? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1: 76–88.
23. Foley EA, Khatchikian CE, Hwang J, Ancca-Juárez J, Borrini-Mayori K, et al. (2013) Population structure of the Chagas disease vector, *Triatoma infestans*, at the urban-rural interface. *Mol Ecol* 22: 5162–5171.
24. Coura JR (2013) Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 962–967.
25. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W (2012) Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1749.
26. Osorio L, Ríos I, Gutiérrez B, González J (2012) Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect Inst Pasteur* 14: 1390–1402.
27. Caradonna KL, Burleigh BA (2011) Mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 76: 33–61.
28. Epting CL, Coates BM, Engman DM (2010) Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 126: 283–291. doi:10.1016/j.exppara.2010.06.023.
29. Nagajyothi F, Weiss LM, Silver DL, Desruisseaux MS, Scherer PE, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* utilizes the host low density lipoprotein receptor in invasion. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e953.
30. Martínez Ortiz A, Herranz Aguirre M, Guibert Valencia J, Ezpeleta Baquedano C (2013) [Congenital transmission of Chagas disease in non-endemic countries. The use of PCR for diagnosis: advantages over conventional techniques]. *An Sist Sanit Navar* 36: 115–118.
31. Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, et al. (2013) Donor-Derived *Trypanosoma cruzi* Infection in Solid Organ Recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*.
32. Trypanosoma cruzi (2014). Wikipédia. Available: http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Trypanosoma_cruzi&oldid=102868460. Accessed 29 August 2014.

Références bibliographiques

33. Brutus L, Schneider D, Postigo J, Delgado W, Mollinedo S, et al. (2007) Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 1159–1160.
34. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico M-C, et al. (2004) Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 70: 201–209.
35. Schmunis GA, Cruz JR (2005) Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* 18: 12–29.
36. Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E (2007) Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion (Paris)* 47: 540–544.
37. Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, et al. (2008) Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 46: e44–47.
38. Sánchez Negrette O, Mora MC, Basombrío MA (2005) High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* 115: e668–672.
39. Martín-Dávila P, Fortún J, López-Vélez R, Norman F, Montes de Oca M, et al. (2008) Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clin Microbiol Rev* 21: 60–96.
40. Senior K (2007) Chagas disease: moving towards global elimination. *Lancet Infect Dis* 7: 572.
41. Chippaux J-P, Postigo JR, Santalla JA, Schneider D, Brutus L (2008) Epidemiological evaluation of Chagas disease in a rural area of southern Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 578–584.
42. Aznar C, La Ruche G, Laventure S, Carme B, Liegeard P, et al. (2004) Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in French Guiana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 805–808.
43. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, et al. (2007) Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA J Am Med Assoc* 298: 2171–2181.
44. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC (2012) Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847166>. Accessed 6 September 2012.
45. Dejour Salamanca D, La Ruche G, Tarantola A, Degail MA, Jeannel D, et al. (2009) [Chagas disease in France: estimated number of infected persons and cardiac diseases in 2009, by risk groups]. *Bull Société Pathol Exot* 102: 285–290.
46. Assal A, Corbi C (2011) [Chagas disease and blood transfusion: an emerging issue in non-endemic countries]. *Transfus Clin Biol J Société Fr Transfus Sang* 18: 286–291.
47. Salamanca-Dejour D, Blanchet D, Aznar C, La Ruche G, Jeannel D, et al. (2012) [Chagas disease (American trypanosomiasis) in France.]. *Med Mal Infect*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22591727>. Accessed 21 May 2012.
48. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Cárdenas A-Arroyo F, Aufderheide A (2000) Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 553–555.

Références bibliographiques

49. Teive HAG, Arruda WO (2009) Did Darwin have syncope caused by Chagas' disease? *Arq Neuropsiquiatr* 67: 371.
50. Coura JR (2007) Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1: 113–122.
51. Parada H, Carrasco HA, Añez N, Fuenmayor C, Inglessis I (1997) Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiol* 60: 49–54.
52. Bestetti RB, Muccillo G (1997) Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 60: 187–193.
53. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, et al. (2006) Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 355: 799–808.
54. Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB (2009) The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clin São Paulo Braz* 64: 1219–1224.
55. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, et al. (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 144: 724–734.
56. Daliry A, Caldas IS, de Figueiredo Diniz L, Torres RM, Talvani A, et al. (2014) Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazole. *Int J Cardiol* 170: e66–67.
57. Kransdorf EP, Czer LSC, Luthringer DJ, Patel JK, Montgomery SP, et al. (2013) Heart transplantation for Chagas cardiomyopathy in the United States. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg* 13: 3262–3268.
58. Pérez-Molina JA (2014) Management of *Trypanosoma cruzi* coinfection in HIV-positive individuals outside endemic areas. *Curr Opin Infect Dis* 27: 9–15.
59. Bocchi EA, Fiorelli A (2001) The paradox of survival results after heart transplantation for cardiomyopathy caused by *Trypanosoma cruzi*. *Ann Thorac Surg* 71: 1833–1838.
60. Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, et al. (2000) Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 63: 111–118.
61. Botoni FA, Ribeiro ALP, Marinho CC, Lima MMO, Nunes M do CP, et al. (2013) Treatment of Chagas cardiomyopathy. *BioMed Res Int* 2013: 849504.
62. Urbina JA (1999) Parasitological cure of Chagas disease: is it possible? Is it relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1: 349–355.
63. Kierszenbaum F (1999) Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12: 210–223.
64. Kierszenbaum F (2005) Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* 21: 513–516.

Références bibliographiques

65. Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, et al. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 41: 530–538.
66. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, et al. (1995) Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3541–3545.
67. Sterin-Borda L, Borda E (2000) Role of neurotransmitter autoantibodies in the pathogenesis of chagasic peripheral dysautonomia. *Ann N Y Acad Sci* 917: 273–280.
68. Kerner N, Liégeard P, Levin MJ, Hontebeyrie-Joskowicz M (1991) *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp Parasitol* 73: 451–459.
69. Van Voorhis WC, Barrett L, Koelling R, Farr AG (1993) FL-160 proteins of *Trypanosoma cruzi* are expressed from a multigene family and contain two distinct epitopes that mimic nervous tissues. *J Exp Med* 178: 681–694.
70. Gironès N, Rodríguez CI, Basso B, Bellon JM, Resino S, et al. (2001) Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 1039–1043.
71. Talvani A, Rocha MOC, Ribeiro AL, Borda E, Sterin-Borda L, et al. (2006) Levels of anti-M2 and anti-beta1 autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect Inst Pasteur* 8: 2459–2464.
72. Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, et al. (1996) Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98: 1709–1712.
73. Sterin-Borda L, Cremaschi G, Genaro AM, Echagüe AV, Goin JC, et al. (1996) Involvement of nitric oxide synthase and protein kinase C activation on chagasic antibodies action upon cardiac contractility. *Mol Cell Biochem* 160-161: 75–82.
74. Lopez Bergami P, Cabeza Meckert P, Kaplan D, Levitus G, Elias F, et al. (1997) Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2beta protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18: 75–85.
75. Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Iosa D, Girones N, et al. (2000) Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. *Eur J Immunol* 30: 3181–3189.
76. Tarleton RL, Zhang L, Downs MO (1997) "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3932–3937.
77. Pontes-de-Carvalho L, Santana CC, Soares MBP, Oliveira GGS, Cunha-Neto E, et al. (2002) Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J Autoimmun* 18: 131–138.
78. Motrán CC, Fretes RE, Cerbán FM, Rivarola HW, Vottero de Cima E (2000) Immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term

Références bibliographiques

- duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice. *Clin Immunol Orlando Fla* 97: 89–94. doi:10.1006/clim.2000.4919.
79. Gironès N, Cuervo H, Fresno M (2005) *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 296: 89–123.
 80. Giordanengo L, Fretes R, Díaz H, Cano R, Bacile A, et al. (2000) Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle Nerve* 23: 1407–1413.
 81. Levy GV, Tasso LM, Longhi SA, Rivello HG, Kytö V, et al. (2011) Antibodies against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins induce apoptosis in HL-1 cardiac cells. *Int J Parasitol* 41: 635–644.
 82. Abdelkrim MA, Noireaud J, Chatagnon G, Gogny M, Desfontis J-C, et al. (2012) [Antibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptor induce aortic endothelial dysfunction in Wistar rat]. *Ann Cardiol Angéiologie* 61: 167–172.
 83. Medei EH, Nascimento JHM, Pedrosa RC, Barcellos L, Masuda MO, et al. (2008) Antibodies with beta-adrenergic activity from chronic chagasic patients modulate the QT interval and M cell action potential duration. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol* 10: 868–876.
 84. Goin JC, Venera G, Biscoglio de Jiménez Bonino M, Sterin-Borda L (1997) Circulating antibodies against nicotinic acetylcholine receptors in chagasic patients. *Clin Exp Immunol* 110: 219–225.
 85. Aiello VD, Reis MM, Benvenuti LA, Higuchi M de L, Ramires JAF, et al. (2002) A possible role for complement in the pathogenesis of chronic chagasic cardiomyopathy. *J Pathol* 197: 224–229.
 86. Sosa-Estani S, Colantonio L, Segura EL (2012) Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention. *J Trop Med* 2012: 292138.
 87. Nicholls RS, Cucunubá ZM, Knudson A, Flórez AC, Montilla M, et al. (2007) [Acute Chagas disease in Colombia: a rarely suspected disease. Report of 10 cases presented during the 2002-2005 period]. *Bioméd Rev Inst Nac Salud* 27 Suppl 1: 8–17.
 88. Longhi SA, Brandariz SB, Lafon SO, Niborski LL, Luquetti AO, et al. (2012) Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. *Am J Trop Med Hyg* 87: 267–271.
 89. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL (2012) A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1881
 90. Pirard M, Iihoshi N, Boelaert M, Basanta P, López F, et al. (2005) The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. *Transfusion (Paris)* 45: 554–561.
 91. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES (2007) Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1045–1049.
 92. Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, et al. (2004) Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang* 87: 204–207.

Références bibliographiques

93. Cooley G, Etheridge RD, Boehlke C, Bundy B, Weatherly DB, et al. (2008) High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS Negl Trop Dis 2: e316.
94. WHO Expert Committee (2002) Control of Chagas disease. World Health Organ Tech Rep Ser 905: i–vi, 1–109, back cover.
95. Chang C-D, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, et al. (2006) Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. Transfusion (Paris) 46: 1737–1744.
96. Oelemann WM, Vanderborgh BO, Verissimo Da Costa GC, Teixeira MG, Borges-Pereira J, et al. (1999) A recombinant peptide antigen line immunoassay optimized for the confirmation of Chagas' disease. Transfusion (Paris) 39: 711–717.
97. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, et al. (2012) Identification of a Western Blot Pattern for the Specific Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Human Sera. Am J Trop Med Hyg 86: 412–416. doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0111.
98. Saez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, et al. (2000) Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA chagas. J Clin Microbiol 38: 851–854.
99. Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, et al. (1999) Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. J Clin Microbiol 37: 1554–1560.
100. Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser DR, Yost WJ, et al. (1989) *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. Infect Immun 57: 1959–1967.
101. Syed FF, Sani MU (2013) Recent advances in HIV-associated cardiovascular diseases in Africa. Heart Br Card Soc 99: 1146–1153.
102. Ntsekhe M, Mayosi BM (2009) Cardiac manifestations of HIV infection: an African perspective. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 6: 120–127.
103. Twagirumukiza M, Nkeramihigo E, Seminega B, Gasakure E, Boccara F, et al. (2007) Prevalence of dilated cardiomyopathy in HIV-infected African patients not receiving HAART: a multicenter, observational, prospective, cohort study in Rwanda. Curr HIV Res 5: 129–137.
104. Shaboodien G, Maske C, Wainwright H, Smuts H, Ntsekhe M, et al. (2013) Prevalence of myocarditis and cardiotropic virus infection in Africans with HIV-associated cardiomyopathy, idiopathic dilated cardiomyopathy and heart transplant recipients : a pilot study : cardiovascular topic. Cardiovasc J Afr 24: 218–223.
105. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, et al. (2005) High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. Circulation 111: 887–893.
106. Maisch B, Richter A, Sandmüller A, Portig I, Pankuweit S (2005) Inflammatory dilated cardiomyopathy (DCMI). Herz 30: 535–544. doi:10.1007/s00059-005-2730-5.
107. Lappé JM, Pelfrey CM, Tang WHW (2008) Recent insights into the role of autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. J Card Fail 14: 521–530.

Références bibliographiques

108. Du Y, Yan L, Wang J, Zhan W, Song K, et al. (2012) β 1-Adrenoceptor autoantibodies from DCM patients enhance the proliferation of T lymphocytes through the β 1-AR/cAMP/PKA and p38 MAPK pathways. *PloS One* 7: e52911. doi:10.1371/journal.pone.0052911.
109. Caforio AL, Mahon NJ, Mckenna WJ (2001) Cardiac autoantibodies to myosin and other heart-specific autoantigens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity* 34: 199–204.
110. Baba A, Akaishi M, Shimada M, Monkawa T, Wakabayashi Y, et al. (2010) Complete elimination of cardiodepressant IgG3 autoantibodies by immunoadsorption in patients with severe heart failure. *Circ J Off J Jpn Circ Soc* 74: 1372–1378.
111. Herda LR, Felix SB, Staudt A (2009) Immunoadsorption in patients with dilated cardiomyopathy. *Atheroscler Suppl* 10: 126–128.
112. Li Y, Bourlet T, Andreoletti L, Mosnier JF, Peng T, et al. (2000) Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101: 231–234.
113. Levin MJ, Hoebeke J (2008) Cross-talk between anti-beta1-adrenoceptor antibodies in dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *Autoimmunity* 41: 429–433.
114. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VMC, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, et al. (2013) Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation* 127: 1105–1115.
115. Barthélémy J-C, Pichot V, Dauphinot V, Celle S, Laurent B, et al. (2007) Autonomic nervous system activity and decline as prognostic indicators of cardiovascular and cerebrovascular events: the "PROOF" Study. Study design and population sample. Associations with sleep-related breathing disorders: the "SYNAPSE" Study. *Neuroepidemiology* 29: 18–28.
116. The UniProt Consortium (2011) Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 40: D71–D75.
117. Maupetit J, Derreumaux P, Tuffery P (2009) PEP-FOLD: an online resource for de novo peptide structure prediction. *Nucleic Acids Res* 37: W498–W503.
118. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, Wilding P, Petitclerc C, et al. (2013) The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC* 51: 47–64. doi:10.1515/cclm-2012-0682.
119. Saba ES, Gueyffier L, Dichtel-Danjoy M-L, Pozzetto B, Bourlet T, et al. (2013) Anti-*Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies Detected at High Rate in Non-Exposed Individuals Living in Non-Endemic Regions: Seroprevalence and Association to Other Viral Serologies. *PLoS ONE* 8: e74493.
120. Jeulin H, Agrinier N, Guery M, Salmon A, Clément L, et al. (2013) Human herpesvirus 6 infection after allogeneic stem cell transplantation: incidence, outcome, and factors associated with HHV-6 reactivation. *Transplantation* 95: 1292–1298.
121. Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW, Gratama JW, Henzen-Logmans S, et al. (2000) Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95: 2240–2245.

Références bibliographiques

122. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2) Graft-versus-host disease. *The Lancet* 373: 1550–1561.
123. Dykewicz CA (2001) Summary of the Guidelines for Preventing Opportunistic Infections among Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis* 33: 139–144.
124. De Pagter PJA, Schuurman R, Keukens L, Schutten M, Cornelissen JJ, et al. (2013) Human herpes virus 6 reactivation: important predictor for poor outcome after myeloablative, but not non-myeloablative allo-SCT. *Bone Marrow Transplant*.
125. Brown JA, Stevenson K, Kim HT, Cutler C, Ballen K, et al. (2010) Clearance of CMV viremia and survival after double umbilical cord blood transplantation in adults depends on reconstitution of thymopoiesis. *Blood* 115: 4111–4119.
126. Majhail NS, Douglas Rizzo J (2013) Surviving the cure: long term followup of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*.
127. Kim HO, Oh HJ, Lee JW, Jang P-S, Chung N-G, et al. (2013) Immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a single institution study of 59 patients. *Korean J Pediatr* 56: 26–31.
128. Guillaume T, Rubinstein DB, Symann M (1998) Immune reconstitution and immunotherapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 92: 1471–1490.
129. Behzad-Behbahani A, Pouransari R, Tabei SZ, Rahiminejad MS, Robati M, et al. (2005) Risk of viral transmission via bone marrow progenitor cells versus umbilical cord blood hematopoietic stem cells in bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 37: 3211–3212.
130. Bemark M, Holmqvist J, Abrahamsson J, Mellgren K (2012) Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation - revelation of B cell developmental pathways and lineage phenotypes. *Clin Exp Immunol* 167: 15–25.
131. Avigan D, Pirofski L, Lazarus HM (2001) Vaccination against infectious disease following hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7: 171–183.
132. Lum LG, Munn NA, Schanfield MS, Storb R (1986) The detection of specific antibody formation to recall antigens after human bone marrow transplantation. *Blood* 67: 582–587.
133. Johnston BL, Conly JM (2002) Immunization for bone marrow transplant recipients. *Can J Infect Dis J Can Mal Infect* 13: 353–357.
134. Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frassoni F, Niederwieser D, et al. (2003) Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 102: 4255–4260.
135. Beck JC, Wagner JE, DeFor TE, Brunstein CG, Schleiss MR, et al. (2010) Impact of Cytomegalovirus (CMV) Reactivation after Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16: 215–222.
136. Abu-Khader A, Krause S (2013) Rapid monitoring of immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation - a comparison of different assays for the detection of cytomegalovirus-specific T cells. *Eur J Haematol* 91: 534–545.

Références bibliographiques

137. Bosch M, Khan FM, Storek J (2012) Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 19: 324–335.
138. Scheinberg P, Melenhorst JJ, Brenchley JM, Hill BJ, Hensel NF, et al. (2009) The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor. *Blood* 114: 5071–5080.
139. Storek J, Dawson MA, Lim LC-L, Burman BE, Stevens-Ayers T, et al. (2003) Efficacy of donor vaccination before hematopoietic cell transplantation and recipient vaccination both before and early after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 33: 337–346.
140. Foglietta M, Neelapu SS, Kwak LW, Jiang Y, Nattamai D, et al. (2013) Neoantigen and tumor antigen-specific immunity transferred from immunized donors is detectable early after allogeneic transplantation in myeloma patients. *Bone Marrow Transplant* 48: 269–277.
141. Neelapu SS, Munshi NC, Jagannath S, Watson TM, Pennington R, et al. (2005) Tumor antigen immunization of sibling stem cell transplant donors in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 36: 315–323.
142. Parkkali T, Käyhty H, Hovi T, Ölander R-M, Roivainen M, et al. (2007) A randomized study on donor immunization with tetanus–diphtheria, Haemophilus influenzae type b and inactivated poliovirus vaccines to improve the recipient responses to the same vaccines after allogeneic. *Bone Marrow Transplant* 39: 179–188.
143. Gottlieb DJ, Cryz SJ Jr, Furer E, Que JU, Prentice HG, et al. (1990) Immunity against *Pseudomonas aeruginosa* adoptively transferred to bone marrow transplant recipients. *Blood* 76: 2470–2475.
144. Thiele T, Krüger W, Zimmermann K, Ittermann T, Wessel A, et al. (2011) Transmission of cytomegalovirus (CMV) infection by leukoreduced blood products not tested for CMV antibodies: a single-center prospective study in high-risk patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (CME). *Transfusion (Paris)* 51: 2620–2626.
145. Popgeorgiev N, Boyer M, Fancello L, Monteil S, Robert C, et al. (2013) Marseillevirus-Like Virus Recovered From Blood Donated by Asymptomatic Humans. *J Infect Dis*.
146. Popgeorgiev N, Colson P, Thuret I, Chiarioni J, Gallian P, et al. (2013) Marseillevirus prevalence in multitransfused patients suggests blood transmission. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*.
147. Burns JM Jr, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, et al. (1992) Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1239–1243.
148. Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, et al. (1992) Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 46: 427–434.
149. Gruber A, Zingales B (1993) *Trypanosoma cruzi*: characterization of two recombinant antigens with potential application in the diagnosis of Chagas' disease. *Exp Parasitol* 76: 1–12.
150. Fabiano S, Pais, Wanderson D, DaRocha, Ramon M, Almeida, Sophie Y, Leclercq, Marcus L, Penido, et al. (2008) Molecular characterization of ribonucleoproteic antigens containing repeated amino acid sequences from *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* 10: 716–725.

Références bibliographiques

151. DaRocha WD, Bartholomeu DC, Macêdo CDS, Horta MF, Cunha-Neto E, et al. (2002) Characterization of cDNA clones encoding ribonucleoprotein antigens expressed in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Parasitol Res* 88: 292–300.
152. Levin MJ, Vazquez M, Kaplan D, Schijman AG (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitol Today Pers Ed* 9: 381–384.
153. Requena JM, Alonso C, Soto M (2000) Evolutionarily Conserved Proteins as Prominent Immunogens during Leishmania Infections. *Parasitol Today* 16: 246–250.
154. Lesénéchal M, Becquart L, Lacoux X, Ladavière L, Baida RCP, et al. (2005) Mapping of B-cell epitopes in a *Trypanosoma cruzi* immunodominant antigen expressed in natural infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 329–333.
155. Heiner Wedemeyer, Eishiro Mizukoshi, Anthony R. Davis, Jack R. Bennink, Barbara Rehermann (2001) Cross-reactivity between hepatitis C virus and Influenza A virus determinant-specific cytotoxic T cells. *J Virol* 75: 11392–11400.
156. López Bergami P, Scaglione J, Levin MJ (2001) Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 15: 2602–2612.
157. Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N (2011) Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* 24: 592–630.
158. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simões MV (2007) Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 115: 1109–1123.
159. Islam Z, Gilbert M, Mohammad QD, Klaij K, Li J, et al. (2012) Guillain-Barré Syndrome-Related *Campylobacter jejuni* in Bangladesh: Ganglioside Mimicry and Cross-Reactive Antibodies. *PLoS One* 7: e43976.
160. Rashid T, Ebringer A (2012) Autoimmunity in Rheumatic Diseases Is Induced by Microbial Infections via Crossreactivity or Molecular Mimicry. *Autoimmune Dis* 2012: 539282.
161. Srirangaraj S, Venkatesha D (2011) Opportunistic infections in relation to antiretroviral status among AIDS patients from south India. *Indian J Med Microbiol* 29: 395–400.
162. Barbaro G, Barbarini G (2011) Human immunodeficiency virus & cardiovascular risk. *Indian J Med Res* 134: 898–903.
163. Sauerbrei A, Schmitt S, Scheper T, Brandstädt A, Saschenbrecker S, et al. (2011) Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Thuringia, Germany, 1999 to 2006. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 16.
164. Dowd JB, Aiello AE, Alley DE (2008) Socioeconomic disparities in the seroprevalence of cytomegalovirus infection in the US population: NHANES III. *Epidemiol Infect* 137: 58.
165. Röhler C, Gärtner B, Sauerbrei A, Böhm S, Hottenträger B, et al. (2008) Seroprevalence of parvovirus B19 in the German population. *Epidemiol Infect* 136: 1564.
166. Bayani M, Hasanjani-Roushan MR, Siadati S, Javanian M, Sadeghi-Haddad-Zavareh M, et al. (2013) Seroepidemiology of varicella zoster virus in healthcare workers in Babol, Northern Iran. *Casp J Intern Med* 4: 686–691.

Références bibliographiques

167. Gürgöze MK, Yilmaz E, Gödekmerdan A, Akça Z, Doğan Y, et al. (2006) Seroprevalence of mumps, varicella and rubella antibodies in children 1-16 years of age in eastern Turkey. *Turk J Pediatr* 48: 185–188.
168. Rey LC, Ramalho ILC (1999) Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 41: 171–174.

Résumé

Les anticorps à réactivité croisée sont caractérisés par leur reconnaissance d'épitopes différents de ceux qui ont causé l'induction de ces mêmes anticorps. Cela se produit lorsque des similitudes structurales entre les deux déterminants antigéniques deviennent suffisantes pour permettre une liaison spécifique. Nous rapportons ici pour la première fois la présence, à une haute fréquence, d'anticorps dans des échantillons de sang provenant de sujets humains avec une protéine de *Trypanosoma cruzi*. Nous avons appelé ces anticorps " *Trypanosoma cruzi* Cross-reactive antibodies " ou TcCRA. Nos résultats montrent une forte séroprévalence des anticorps à réaction croisée, suggérant qu'ils sont induits par un immunogène largement répandu, acquis dès l'enfance et qui ne semble pas être associé à des agents pathogènes connus communs en clinique humaine. Les recherches effectuées *in silico* orientent vers un virus de la famille des *Herpesviridae*. Cette hypothèse est renforcée par la documentation d'un profil sérologique de séroconversion chez un patient qui a subi une transplantation de cellules souches allogéniques. Ce premier travail va servir de base à la mise en œuvre d'investigations cliniques rétrospectives et prospectives destinées à élucider l'étiologie et l'importance clinique du biomarqueur TcCRA.

Abstract

Cross-reactive antibodies are characterized by their recognition of antigens that are different from the trigger immunogen. This happens when the similarity between two different antigenic determinants becomes adequate enough to enable a specific binding. Here, we report for the first time the presence, at an "abnormal" high frequency in blood samples from French human subjects, of antibodies that cross-react with a protein of a *Trypanosoma cruzi*. We called these antibodies " *Trypanosoma cruzi* Cross-Reactive Antibodies" or TcCRA. Our findings show a large seroprevalence of cross-reactive antibodies and suggest that they are induced by a widely spread immunogen, acquired during childhood. Furthermore TcCRA serology does not seem to be associated with commonly known pathogens in clinical routine. Our hypothesis of the implication of a viral agent in the induction of TcCRA was further put forward when we documented a seroconversion pattern in a patient after allogenic stem cell transplantation. This initial exploratory work will serve as the basis for organizing prospective and retrospective clinical investigations, where we will pursue the analysis of TcCRA in order to elucidate its etiology and clinical importance.