

376
1973
33

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

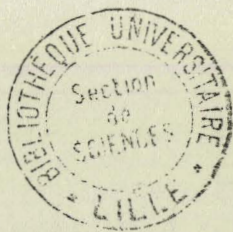
U. E. R. DE BIOLOGIE — LILLE

50376
1973
33

FRANÇOIS FLOC'H

Mémoire présenté pour l'obtention
de la Thèse de 3^e cycle (Biologie cellulaire)

ROLE DE L'HYPERSENSIBILITÉ RETARDÉE
ET DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE
DANS LA TOXOPLASMOSE EXPÉRIMENTALE



JURY : professeurs M. DURCHON Président
A. VERNES Rapporteur
E. VIVIER } Examineurs
J. BIGUET }

Présenté le 25 janvier 1973

SOMMAIRE.

<u>INTRODUCTION</u>	Page 1
-------------------------------	--------

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I.- LE TOXOPLASME ET SA BIOLOGIE.

A.- Morphologie	2
1°) Forme végétative	
2°) Forme kystique	
3°) Oocystes	
B.- Cycle évolutif	3
1°) Cycle direct	
2°) Cycle indirect	

II.- PHYSIOLOGIE DU TOXOPLASME 5

III.- STRUCTURE ANTIGENIQUE 7

- A.- Protéines
- B.- Toxine
- C.- Composition en Acides nucleiques

IV.- IMMUNOLOGIE.

A.- Rappel d'Immunologie	10
1°) Immunité humorale	
2°) Immunité cellulaire	
a) modèle <i>Listeria monocytogenes</i> .	11
b) rôle des lymphocytes	13
c) rôle des macrophages	14
d) relation avec l'H.S.R.	15

B.- Immunité dans la Toxoplasmose	16
1°) Les facteurs humoraux	17
a) facteurs non spécifiques	
b) facteurs spécifiques	
2°) Les facteurs cellulaires	19
a) facteurs non spécifiques	
b) facteurs spécifiques	

MATERIEL ET METHODES

I.- ANIMAUX	22
A.- Souris	
B.- Rats	
II.- TOXOPLASMES.	
A.- Souche avirulente 76 K	22
B.- Souche virulente RH	23
III.- RECOLTE DE CELLULES OU DE SERUMS	
A.- Serum	
B.- Cellules péritonéales	
C.- Cellules spléniques	
D.- Dose d'épreuve	
IV.- PREPARATION DES ANTIGENES	
A.- La production d'antigènes <i>T. gondii</i> . . .	24
B.- Récolte des antigènes	25
V.- IMMUNISATION DES LAPINS	26
VI.- TEST D'INHIBITION DE L'ETALEMENT DES MACROPHAGES	26

RESULTATS

I.- RAPPEL DES RESULTATS ANTERIEURS	28
A.- Relation survie - dose d'épreuve	
B.- Milieu de suspension - dose d'épreuve	
C.- Prémunition	
D.- Transferts de cellules ou de sérums; . . .	30
II.- EXPOSE DES RESULTATS ACTUELS	
A.- Analyse de la mosaïque antigénique . . .	32
B.- Etude complémentaire chez la souris Balb/c	34
1°) Utilisation de souches homologues	
2°) Obtention de kystes purifiés	
3°) Influence de la dose de prémunition	
C.- Etude des phénomènes immunologiques	
chez la souris CBA	36
1°) Influence de l'âge des animaux	
2°) Influence des voies d'immunisation et	
d'épreuve	
3°) Importance de la prémunition	37
4°) Possibilité de transfert de l'immunité	
par les cellules ou le sérum	
D.- Etude cinétique de l'H.S.R. chez la souris	
CBA	39
1°) H.S.R.	
2°) Cellules péritonéales	
3°) Expérience de survie Test	
4°) Contrôle dose-test	
E.- Etude des phénomènes immunologiques chez	
le rat WISTAR	41
1°) Résistance à la souche RH	
2°) Etude cinétique de l'H.S.R.	

DISCUSSION

I.- L'ANTIGENE	43
II.- LE MODELE EXPERIMENTAL	
A.- Influence de l'âge et des voies d'introduction	44
B.- Influence des souches de toxoplasmes	45
III.- LE ROLE DE L'HYPERSENSIBILITE RETARDEE	
A.- Choix du test	46
B.- Choix de la dose d'antigène	47
C.- Liaison avec la résistance	
D.- Role du macrophage et adaptation parasitaire	49

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I.- ROLE DES DIFFERENTS FACTEURS	
A.- Immunité cellulaire	51
B.- Immunité humorale	52
II.- ADAPTATION PARASITAIRE	
A.- Immunité chez la souris	
B.- Immunité chez le rat	53
III.- PERSPECTIVES	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	55

INTRODUCTION.

Les infections à *Toxoplasma* atteignent l'homme et de nombreux vertébrés à sang chaud dans le monde entier, à l'exception peut-être des régions polaires, mais leur fréquence varie considérablement d'un pays à l'autre.

Cette maladie revêt deux aspects particulièrement importants :

1°) Un aspect humain dû à la Toxoplasmose congénitale par transmission d'une infection primaire de la mère au fœtus.

2°) Un aspect vétérinaire provoqué également par la Toxoplasmose congénitale qui atteint des animaux domestiques tels le porc et le mouton, et qui sévit occasionnellement dans les élevages de visons ou de chiens.

La parasitose est alors responsable d'avortements, de mort-naiissances et d'une forte mortalité néonatale entraînant des pertes économiques considérables.

En raison de ces répercussions médicales et vétérinaires, l'O.M.S. (85) a conseillé un certain nombre de thèmes de recherches sur la Toxoplasmose. "L'Immunité à support cellulaire chez l'animal", qui est le but essentiel de notre travail, constitue l'un de ces thèmes.

L'exposé de nos résultats sera précédé d'un rappel sur le toxoplasme et de l'Immunité dans la Toxoplasmose.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.

Nous envisagerons au cours de ce chapitre, les éléments concernant :

- I. Le toxoplasme et sa Biologie,
- II. La Physiologie du toxoplasme,
- III. La structure antigénique des toxoplasmes,
- IV. L'Immunologie de la Toxoplasmose.

I. LE TOXOPLASME ET SA BIOLOGIE.

A.- MORPHOLOGIE.

1°) Forme végétative.

Cette forme a été découverte en 1908 par NICOLLE et MANCEAUX (78) chez un rongeur sauvage particulièrement sensible : le gondi (*Ctenodactylus gondi*).

Ce trophozoïte a 5 à 8 microns de long sur 2 à 5 microns de large avec une extrémité effilée (conoïde).

La coloration panoptique met en évidence un cytoplasme bleu contenant un gros noyau rouge. La microscopie électronique révèle une structure plus complexe bien observée dans les travaux de SHEFFIELD et MELTON (102) et de VIVIER et PETITPREZ (120).

Cette forme est celle que l'on obtient lors du passage mécanique des souches virulentes. Pour les souches avirulentes, la forme commune est le kyste.

2°) Forme kystique viscérale.

C'est un vrai kyste de 15 à 100 microns de diamètre, sphérique dans le cerveau, allongé dans le sens de la fibre dans les muscles.

Il persiste très longtemps dans les tissus d'animaux infestés de façon chronique. On en trouvera des descriptions détaillées par différents auteurs (36, 100).

Ces formes étaient les seules connues jusqu'en 1965, quand HUTCHINSON affirma que des formes infectieuses pouvaient être transmises par les oeufs d'un ascaris du chat (*Toxocara cati*) ; ce travail fut d'abord confirmé par différents auteurs JACOBS et MELTON (1966), HUTCHINSON (1967), DUBEY (1968), ROMMEL et coll. (1968), (8, 33) . Cependant, en 1967, JACOBS constatait que des selles de chats non parasitées par cet ascaris pouvaient être infectieuses. Ceci eut pour conséquence la découverte des oocystes et du cycle évolutif.

3°) Oocystes.

Découverts par WORK et HUTCHINSON (1969), leur ressemblance avec les kystes de coccidies est notée par KUHN et WEILAND (1969), (8, 33).

Éliminés dans les selles du chat, ils sont presque sphériques et ne contiennent qu'une masse granuleuse. Après sporulation dans le milieu extérieur, ils sont ovoïdes et mesurent 9 à 11 microns sur 11 à 14 microns.

Limités par une membrane externe résistante, ils contiennent 2 sporocystes ovoïdes (6 à 8 microns), à l'intérieur desquels se différencient 4 sporozoïtes (7 à 8 microns sur 1,5 à 2 microns).

Ces découvertes permettent donc d'envisager comme suit le cycle évolutif de *Toxoplasma gondii*.

B.- CYCLE EVOLUTIF.

Ce cycle est complexe : il peut exister, en effet, un cycle direct où le chat, hôte définitif est le seul incriminé, et un cycle indirect où divers mammifères joueraient le rôle d'hôtes intermédiaires.

Des descriptions détaillées sont fournies dans les revues récentes (8, 100).

1°) Le cycle direct, est celui d'une coccidie classique du genre *Eimeria* ou *Isospora*.

a) Le chat hôte définitif.

Deux modes de multiplications se déroulent dans l'intestin - une multiplication asexuée ou *Schizogonie* assurant la dissémination du parasite dans le tube digestif,

- une multiplication sexuée ou *Gamogonie* à microgamétocytes mâles et macrogamétocyte femelle donnant naissance à un oocyste.

Ces phases sont illustrées dans les travaux de HUTCHINSON et coll. (45) et de FRENKEL et coll. (38).

b) Sur le sol, la maturation des oocystes ou *Sporogonie* s'effectue avec une rapidité qui est fonction de la température. Les 8 sporozoïtes sont alors infectieux pendant plusieurs mois.

2°) Le cycle indirect, comprend un ou plusieurs hôtes intermédiaires qui sont des vertébrés homéothermes.

Chez les hôtes intermédiaires :

Le mode de contamination est variable, soit par l'ingestion d'oocystes mûrs soit par les modes jusqu'ici connus (ingestion de kystes viscéraux ou accessoirement de trophozoïtes, transmission congénitale essentiellement).

Il n'y aura pas de phase coccidienne intestinale mais une multiplication des trophozoïtes dans les cellules du système réticulo-endothélial (S.R.E.) selon le processus d'endogénie, sorte de schizogénie souvent binaire mais qui peut être multiple (118). Le parasite va se disséminer dans l'organisme par parasitémie. Si la souche est virulente, elle va entraîner la mort de l'animal ; si elle est avirulente, il y aura formation de kystes.

L'ensemble de ces considérations ont amené différents auteurs et en particulier OVERDULVE (86) à rattacher le toxoplasme aux *Isospora* et les critères d'ultrastructure devraient permettre de lui donner sa place exacte dans la classification (119).

II. PHYSIOLOGIE DU TOXOPLASME.

Aucun phénomène de caractère exceptionnel ne ressort de la physiologie et la biologie du toxoplasme. Les travaux dans ces domaines sont d'ailleurs fort peu nombreux, mais nous fournissent des renseignements utiles.

D'abord en ce qui concerne la survie des toxoplasmes dans les liquides physiologiques :

1°) La survie de la souche RH (souche virulente de SABIN) est fort limitée : à la température du laboratoire, en solution saline ordinaire (NaCl à 0,9 %), peu de toxoplasmes sont vivants après 2 heures et pratiquement plus après 5 heures. L'adjonction de néopeptone augmente cette survie, mais moins que celle de sérum humain normal à 10 % (46).

2°) En prenant pour base la solution de HANKS (88), LUND et coll. (56) ont étudié l'influence de la température et de l'adjonction de protéines de diverses origines. Ils concluent que la meilleure température de conservation est de 2°C et que cette conservation est améliorée par adjonction de sérum humain ou équin préalablement chauffé à 56°. Ils confirment par là, les résultats de EYLES et COLEMAN (28) et de FELDMAN (32).

Nous avons également abordé ce sujet capital tant pour la conservation des toxoplasmes libres, en cours d'expérimentation, que pour leur conservation à basse température : - 196°C (35) ; nous y reviendrons dans l'exposé des résultats.

Ensuite, quelques résultats nous apportent des données sur la physiologie même :

1°) Le toxoplasme respire dans les cellules qu'il parasite (26) ; cette respiration est maximale à un pH de 7,4 et elle se fait par utilisation du glucose (41).

2°) Le toxoplasme possède diverses enzymes (14) et en particulier :

- une Aspartate amino-transférase localisée dans la membrane (2).

- un facteur facilitant la pénétration du toxoplasme dans les cellules de l'hôte, étudié depuis 1965 par LYCKE et coll. (59). Les résultats concernant son isolement et son mode d'action sont réunis dans un travail récent de NOORBY (79) : ce facteur, appelé "Penetration enhancing factor" est localisé dans la partie antérieure du toxoplasme et agit sur les membranes des cellules hôtes comme le lysozyme ou la hyaluronidase. Ces constituants peuvent d'ailleurs faire partie de la structure antigénique que nous aborderons maintenant.

III. STRUCTURE ANTIGENIQUE.

Nous ferons ici le point des travaux concernant les protéines, la toxine toxoplasmique et les acides nucléiques.

A.- PROTEINES.

Si PANDE et coll. (87) ont décrit un hétéroglycane, les auteurs se sont particulièrement penchés sur la composition protéique du toxoplasme en étudiant les antigènes solubles que l'on peut extraire en brisant les cellules (27, 47, 112).

Par immunodiffusion, CHORDI et coll. (48) obtiennent des arcs de précipitation, correspondants à 3 ou 4 fractions spécifiques, et entourés par de nombreux arcs (jusque 14) correspondant aux protéines plasmatiques de la souris dont les toxoplasmes ont été extraits.

La même équipe (111), par fixation du complément et hémagglutination, démontre l'existence de différences antigéniques entre 5 souches isolées de diverses espèces animales. Il eût été souhaitable que la mosaïque antigénique de ces souches ait été étudiée en immunoélectrophorèse ; cette technique analytique aurait, peut-être, permis de révéler entre les souches des différences qualitatives, d'autant qu'il est possible en réalité d'obtenir par cette méthode jusque 7 arcs spécifiques de *Toxoplasma gondii* (121).

Ces antigènes purifiés (40) sont de nature protéique comme le prouve l'hydrolyse trypsique et sont constitués de protéines et de ribonucléoprotéines.

Une localisation cellulaire grossière de ces antigènes a été faite en microscopie électronique par BRZOSKO et coll., (13) par marquage des anticorps à la ferritine. Ces auteurs mettent en évidence des antigènes de surface (la réaction d'immunofluorescence courante avait déjà prouvé leur existence) et des antigènes plus profondément situés dans le cytoplasme et ce réticulum endoplasmique.*

* La médiocre qualité de la photocopie dont nous disposons ne nous permet pas d'apprécier ce travail à sa juste valeur.

B.- TOXINE.

La toxine toxoplasmique, qui d'ailleurs a donné lieu à des controverses, mérite une mention particulière :

En 1964, LUNDE et JACOBS (56) démontraient la toxicité pour le lapin de lysats de toxoplasmes. La toxicité du liquide d'ascite de souris, injecté par voie intraveineuse au lapin, affirmée ultérieurement par certains auteurs, s'expliquerait en réalité pour NOZIK et O'CONNOR (83), par la très grande viscosité de ce liquide.

Quoiqu'il en soit, les travaux récents de PETTERSEN (89, 90) prouvent l'existence d'une toxine, que cet auteur isole par "ice-filtration" et dont l'activité serait thromboplastique.

Cette toxine n'existerait que dans les souches virulentes et ce pourrait être une endotoxine. Ceci expliquerait alors les difficultés de vaccination contre ces souches : l'expérience de la bactériologie nous a appris, en effet, que les endotoxines vaccinent mal.

C.- COMPOSITION EN ACIDES NUCLEIQUES :

La composition en ADN (76) fournit un rapport G + C/A + T de 53 % très proche de celui des hémospories.

L'étude des ARN (93) a été entreprise en comparaison avec ceux des macrophages péritonéaux des souris. Ces ARN correspondent à 3 fractions majeures de constantes de sédimentation : 24 S, 19 S et 4-5 S. La première (24 S) diffère nettement de la fraction correspondante des macrophages (28 S) et ces résultats suggèrent qu'il s'agit d'ARN ribosomiaux et d'ARN de transfert.

Le rôle des acides nucléiques pourrait être important à double titre :

1°) d'abord dans le diagnostic : ces ARN seraient extraits dans le test de lyse (51). S'il en est de même *in vivo* la présence d'anticorps les agglutinant peut alors être mise en évidence par hémagglutination puisque l'antigène utilisé contient des ribonucléoprotéines (40).

2°) Ensuite dans la virulence : le parallélisme entre quantité d'ARN et virulence semble évident (3). Dans d'autres domaines de la Parasitologie, l'attention a été attirée sur ces relations. C'est ainsi que des acides nucléiques extraits d'une souche virulente de *Trichomonas* rendent virulente une souche qui ne l'est pas (42). Ceci est équivalent au transfert de la résistance médicamenteuse d'une souche de *Plasmodium vinckei* à une souche de *Plasmodium berghei* qui y est sensible (124).

IV. IMMUNOLOGIE.

Cette section sera divisée en deux paragraphes. Le premier fera le rappel des données d'Immunologie générale et plus particulièrement de l'Immunologie cellulaire, le second analysera les travaux concernant l'Immunité dans la Toxoplasmose.

A.- RAPPEL D'IMMUNOLOGIE.

L'immunologie peut être schématiquement divisée en 2 grands chapitres selon qu'elle est spécifique ou non. Dans les deux cas, les facteurs en cause peuvent être humoraux ou cellulaires.

1°) Immunité humorale.

a) facteurs non spécifiques : citons en exemples

- l'Interféron : substance libérée par les cellules et empêchant la pénétration des virus dans ces dernières.

- le Complément : facteur non spécifique mais intervenant dans des processus spécifiques par l'intermédiaire d'anticorps qui le fixent.

b) facteurs spécifiques : il s'agit essentiellement d'anticorps parmi lesquels on distingue diverses classes : IgG, IgM, IgA, IgE, IgD,...

Classiquement la réponse humorale débute par une production d'immunoglobine M (IgM) qui est ensuite inhibée par la production d'IgG. Nous ne développerons pas plus ce paragraphe pour nous attarder plus sur l'immunité cellulaire.

2°) Immunité cellulaire.

Découverte au début du siècle par METCHNIKOFF (73), la résistance cellulaire à l'infection a été pratiquement oubliée jusqu'à la dernière décennie, période pendant laquelle elle a été très étudiée en particulier par l'équipe de MACKANESS dont nous relatons les résultats.

Le terme d'immunité cellulaire peut paraître ambigu, car utilisé de façons quelque peu différentes selon qu'il s'agit de résistance antimicrobienne, de greffe, d'auto-immunité ou d'hypersensibilité de type retardé (H.S.R.). Tous ces aspects cependant semblent relever d'un même mécanisme que nous décrirons ici sous l'aspect de la résistance cellulaire à l'infection. Résistance au cours de laquelle les macrophages de l'hôte accroissent leur capacité de destruction envers les organismes ingérés (70).

Cette immunité représente le mécanisme essentiel de protection contre les maladies infectieuses où le germe se multiplie dans les macrophages de l'hôte, et où les anticorps sériques n'ont montré aucun degré significatif de protection.

Nous décrirons les faits correspondants au modèle *Listeria monocytogenes* puis nous envisagerons le rôle des différents facteurs : lymphocytes, macrophages, H.S.R.

a) modèle *Listeria monocytogenes*.

Si on injecte des *Listeria* par voie intra-veineuse (I.V.) à des souris, ces bactéries se développent dans l'organisme durant 3 jours. Le 4ème jour, on constate l'apparition de l'H.S.R. et en même temps la destruction des germes dans les macrophages qui les ont ingérés et à l'intérieur desquels ils se sont multipliés.

Cette destruction des bactéries nécessite donc l'activation des macrophages qui se déclenche lorsque la population bactérienne a atteint une "densité critique".

Pendant une certaine période, cette densité critique peut être atteinte par l'injection d'autres bactéries dont la population s'ajoute à la population résiduelle de la primo-infection.

Passé ce délai, la densité critique ne peut être obtenue que par l'injection du germe de primo-infection, cette réaction, qui est alors spécifique, fait appel à la mémoire immunologique des lymphocytes à vie longue.

Voici brièvement résumés les faits essentiels de l'immunité cellulaire que nous allons aborder plus en détail maintenant.

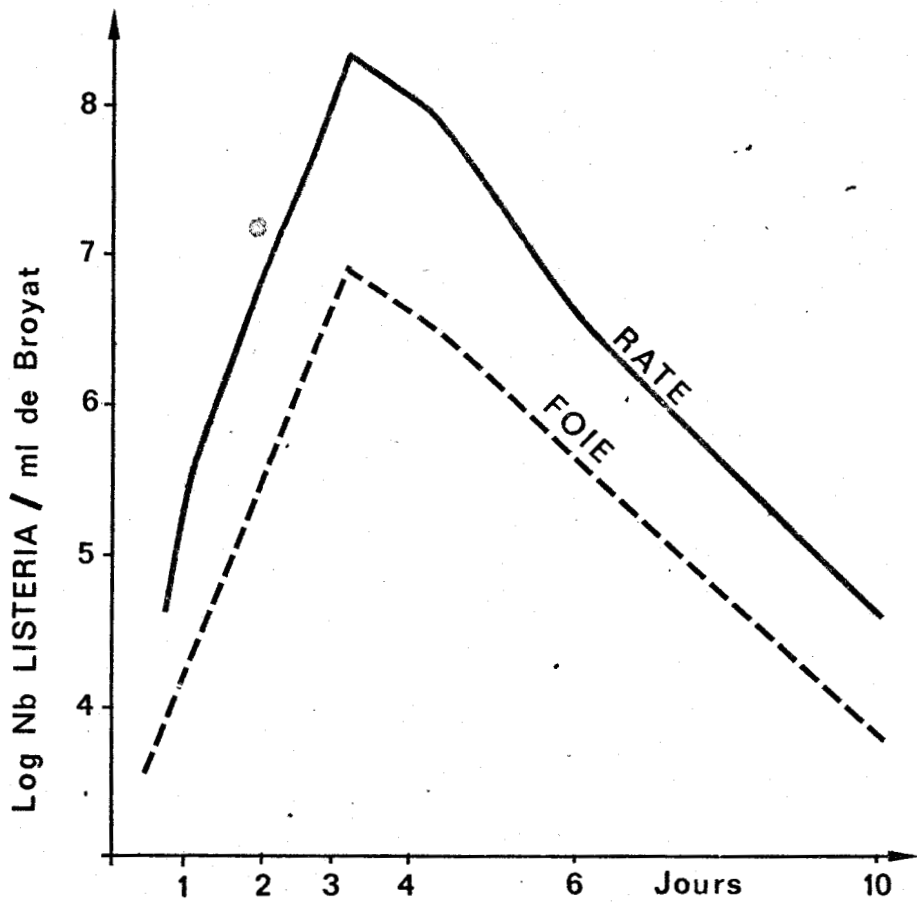


FIGURE 1

Evolution de L.monocytogenes dans le foie et la rate de
Souris saines après injection intra-veineuse.
d'après MACKANESS (63).



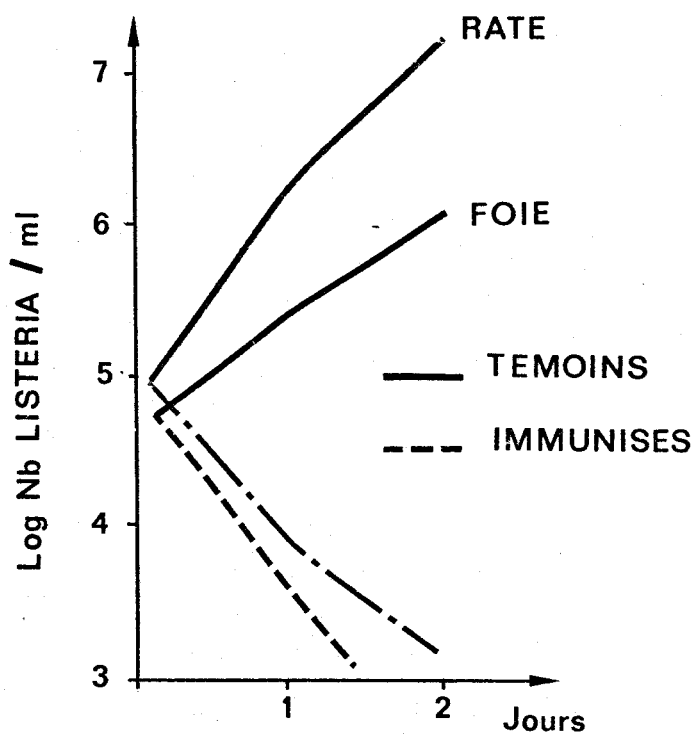


FIGURE 2

Evolution comparée de 10 DL 50 de L.monocytogenes dans le foie ou la rate de souris témoins ou immunisées depuis 19 jours par 0,1 DL 50. D'après MACKANESS (63).



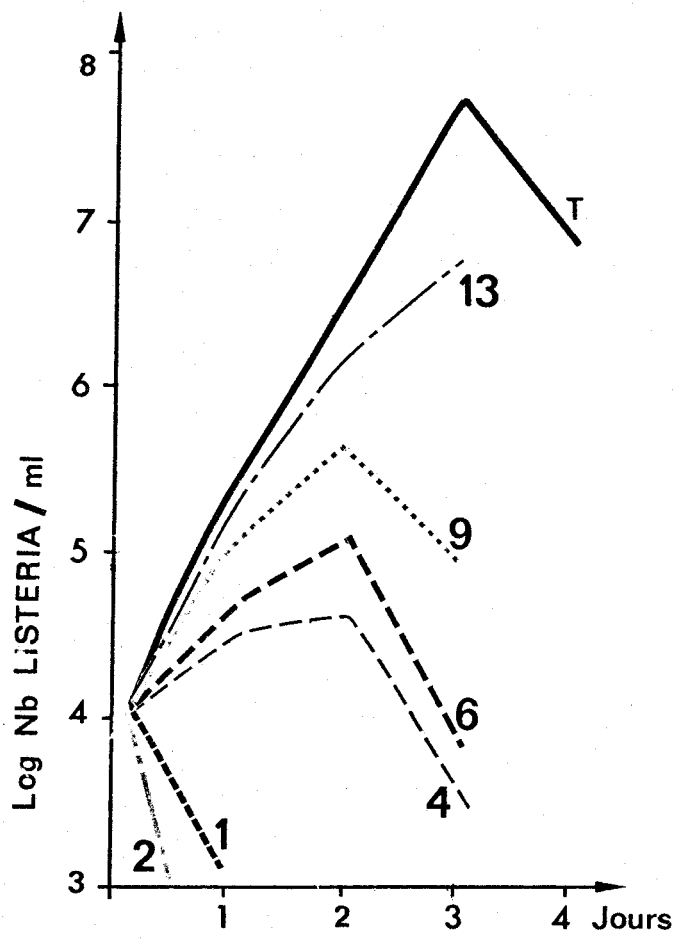


FIGURE 3

Evolution de la résistance à L.monocytogenes en fonction du délai d'immunisation: T=souris témoins , I-2-4-6-9-13= souris immunisées depuis 1,2,4,6,9,13 semaines.D'après MACKANESS (63);



1) Dans un travail princeps, MACKANESS (63) établit les bases du modèle *Listeria*. Après injection intra-veineuse, les micro-organismes sont comptés, à des temps donnés, par étalement des dilutions de broyats de foie ou de rate. Leur nombre est exprimé par son logarithme. Cette technique permet de comparer des lots d'animaux témoins ou ayant subi diverses manipulations.

Par ailleurs, il est très facile d'immuniser les animaux en leur injectant par voie intra-veineuse 0,1 dose létale 50 % (DL 50).

La figure 1 représente la croissance des *Listeria* dans le foie et la rate des souris, animaux qui seront utilisés tout au long des expériences.

Il est dès lors possible de tester la résistance des animaux en employant 10 DL 50 et d'effectuer la numération des germes. La figure 2 illustre cette résistance chez des souris ayant reçu 0,1 DL 50, 19 jours auparavant.

Sa durée peut être étudiée en effectuant la surinfection d'épreuve 1, 2, 4, 6, 9, ou 13 semaines après la première infection. La figure 3 montre que la résistance a pratiquement disparu vers la 13^{ème} semaine.

Celle-ci n'est pas due aux anticorps car l'incubation de la bactérie dans du sérum immun ou le transfert passif de ce sérum fournit des rétrocultures contenant des quantités de germes identiques à celles obtenues chez les souris témoins.

Enfin, il est possible, *in vitro*, de montrer la résistance des macrophages, isolés d'animaux immuns, à la lyse provoquée par *Listeria monocytogenes*.

2) Dans un autre travail (64) mené à la fois avec *Listeria monocytogenes* et *Brucella abortus*, bactérie sans relation antigénique avec la précédente, MACKANESS démontre que des souris infectées par *Listeria* détruisent plus rapidement *Brucella* que les souris témoins.

L'effet inverse peut également être mis en évidence. Cependant, si le délai entre l'infection d'épreuve et l'infection primaire par *Listeria* est assez long, les souris immunisées détruisent plus rapidement *Listeria* que *Brucella* (figure 4).

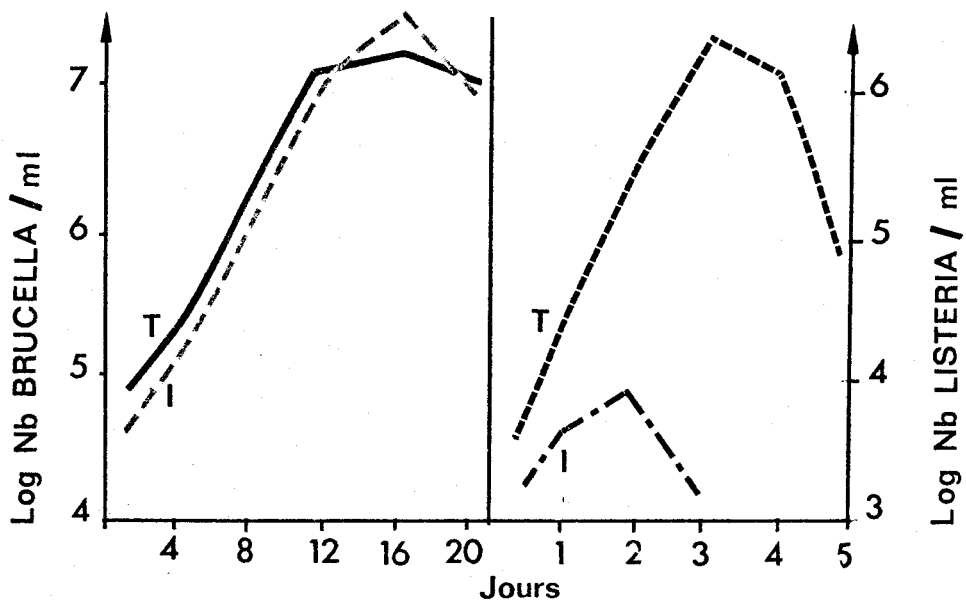


FIGURE 4

Evolution comparée de LISTERIA et BRUCELLA dans la rate de souris témoins (T) ou de souris immunisées depuis plus de 3 semaines. D'après MACKANESS (63);



Bien que la réaction puisse apparaître, pendant une période, comme non spécifique, elle est cependant spécifique lorsque l'on fait appel à la mémoire immunologique (lymphocytes à vie longue).

Telles peuvent être résumées les bases expérimentales de la résistance cellulaire. Nous envisagerons maintenant, à la lumière des travaux récents, le rôle des divers facteurs : lymphocytes, macrophages et les réactions de l'immunité cellulaire avec l'hypersensibilité retardée, d'après de récentes revues de MACKANESS (68, 69).

b) rôle des lymphocytes.

- nature et fonction.

Le stimulus antigénique provoqué par une infection listérienne ou tuberculeuse entraîne la formation d'une population nombreuse de lymphocytes. Ceci dans la rate si l'injection est faite par voie intra-veineuse (I.V.) et dans le ganglion lymphatique périphérique proche de l'injection sous-cutanée (S.C.).

Cette multiplication peut être mise en évidence dans les 48 heures au niveau des zones paracorticales, des ganglions lymphatiques, qui sont thymo-dépendantes. Elle est toujours évidente vers le 10ème ou 12ème jour mais il n'y a pas accumulation de ces cellules qui vont migrer par la lymphe sous forme de cellules blastiques (80).

Les cellules ainsi produites, injectées à des souris saines, les protègent contre une dose d'épreuve létale de *Listeria* (66), tandis que le sérum ne confère aucune protection. Cette protection n'est pas obtenue si les donneurs ou les receveurs sont préalablement traités par du sérum antilymphocytaire (71).

Les cellules protectrices ont des caractéristiques bien définies et proviennent de précurseurs à division rapide (60, 61). La plupart d'entre-elles peuvent être marquées à la thymidine ce qui permet d'affirmer qu'il s'agit de petits lymphocytes à vie courte, qui migreront dans les exsudats inflammatoires. Ils contrastent ainsi avec les lymphocytes à vie longue, initiateurs de la réponse immunitaire et responsables de la mémoire immunologique, qui ne migrent pas vers les lieux d'inflammation.

L'action de ces petits lymphocytes à vie courte est spécifique : produites en réponse au BCG, ces cellules ne protègent pas contre *Listeria* (66).

- interaction avec les macrophages.

Les lymphocytes du canal thoracique de donneurs sensibles à la tuberculine ne peuvent transférer cette sensibilité aux rats receveurs irradiés (19). Cette déficience peut être abolie par transfert de cellules de moelle osseuse (55). Et il est raisonnable de penser que ces cellules sont des monocytes dont les précurseurs sont médullaires (67a, 67b). Les observations récentes de TRIPATHY et MACKANESS (114), Mc GREGOR et KOSTER (61, 62), et plus particulièrement de NORTH (81, 82) prouvent clairement que la réponse cellulaire dépend également des monocytes, qui comme les petits lymphocytes vont migrer vers les lieux d'infection où ils vont exercer leur fonction macrophagique. Une interaction entre ces deux types cellulaires, dans les foyers d'infection, paraît donc nécessaire.

c) rôle des macrophages.

Cette accumulation, dans les foyers d'infection, n'est cependant pas suffisante pour prouver le rôle des macrophages. Ces cellules du SRE représentent, chez les animaux normaux, un milieu idéal de multiplication des bactéries, jusqu'à l'apparition de la réponse immunologique de cet hôte.

Elle entraîne alors des modifications morphologiques et fonctionnelles des macrophages (10) qui se traduisent en particulier par une augmentation du pouvoir bactéricide envers les organismes ingérés, que ce soit :

- *Listeria monocytogenes* (30, 63)
- *Brucella abortus* (64)
- *Salmonella sp* (9, 29)

et ceci après une période de multiplication de ces bactéries qui leur permet d'atteindre la densité critique.

Les macrophages pour être activés requièrent la présence des lymphocytes migrants à vie courte. Mais ces lymphocytes seuls, transférés, ne provoquent pas l'activation des macrophages qui ont également besoin d'une certaine densité de bactéries vivantes (66).

Deux stimuli sont donc nécessaires au macrophage : celui du lymphocyte et celui du micro-organisme vivant. Mais durant cette phase

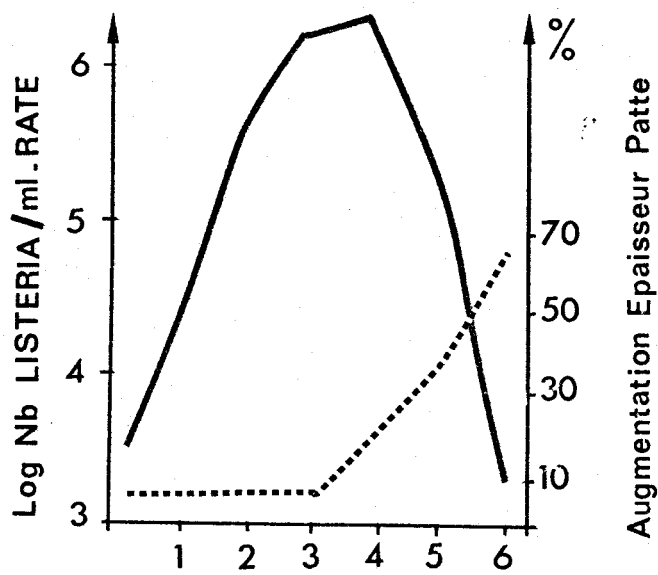


FIGURE 5

Evolution de L.monocytogenes dans la rate des souris et de l'Hypersensibilité retardée détectée par augmentation de l'épaisseur de la patte.

D'après MACKANESS (63).



d'activation, l'action du macrophage sera non spécifique car la densité critique de bactéries peut être atteinte par 2 germes distincts comme le démontre l'expérimentation suivante :

L'injection de quantités différentes de *Salmonella* à des souris permet de retrouver, à un temps donné, des quantités différentes de cette bactérie dans la rate ou le foie. Une nouvelle injection de *Listeria*, en quantité constante, à ces divers groupes de souris, fournira des quantités inverses de *Salmonella* ou de *Listeria* dans les rétrocultures d'organes.

Cette notion de seuil critique de la population bactérienne entraîne également une certaine dissociation entre résistance cellulaire et H.S.R. que nous allons examiner maintenant.

d) relation avec l'H.S.R.

Comme nous l'avons déjà indiqué, il existe une relation temporelle dans le modèle listérien entre l'apparition de l'H.S.R. au 4ème jour et celle de la résistance cellulaire qui se traduit par l'élimination des bactéries dans les macrophages devenus résistants (figure 5).

Nous avons vu que les phénomènes pouvaient cependant être dissociés :

- les lymphocytes ne transfèrent que l'H.S.R.
- les macrophages activés ne confèrent que la résistance.

De plus, il est possible, par des injections répétées, de désensibiliser les animaux (perte de l'H.S.R.) sans pour autant leur enlever leur résistance à l'infection (65).

Pour d'autres modèles, nous montrerons également qu'il existe une dissociation temporelle :

Brucella abortus : ce germe se multiplie plus lentement que *Listeria* et si l'H.S.R. est détectable dès le 4ème jour, la population bactérienne n'atteint le seuil critique qu'au 8ème jour, après quoi les macrophages détruisent ce germe.

Mycobacterium bovis (BCG) : sa multiplication dans les macrophages est presque nulle. Si on l'injecte en faible quantité, l'H.S.R. détectée vers le 4ème jour est nettement présente au 11ème jour, alors qu'il n'apparaît pas de macrophages résistants puisque la population bactérienne est insuffisante.

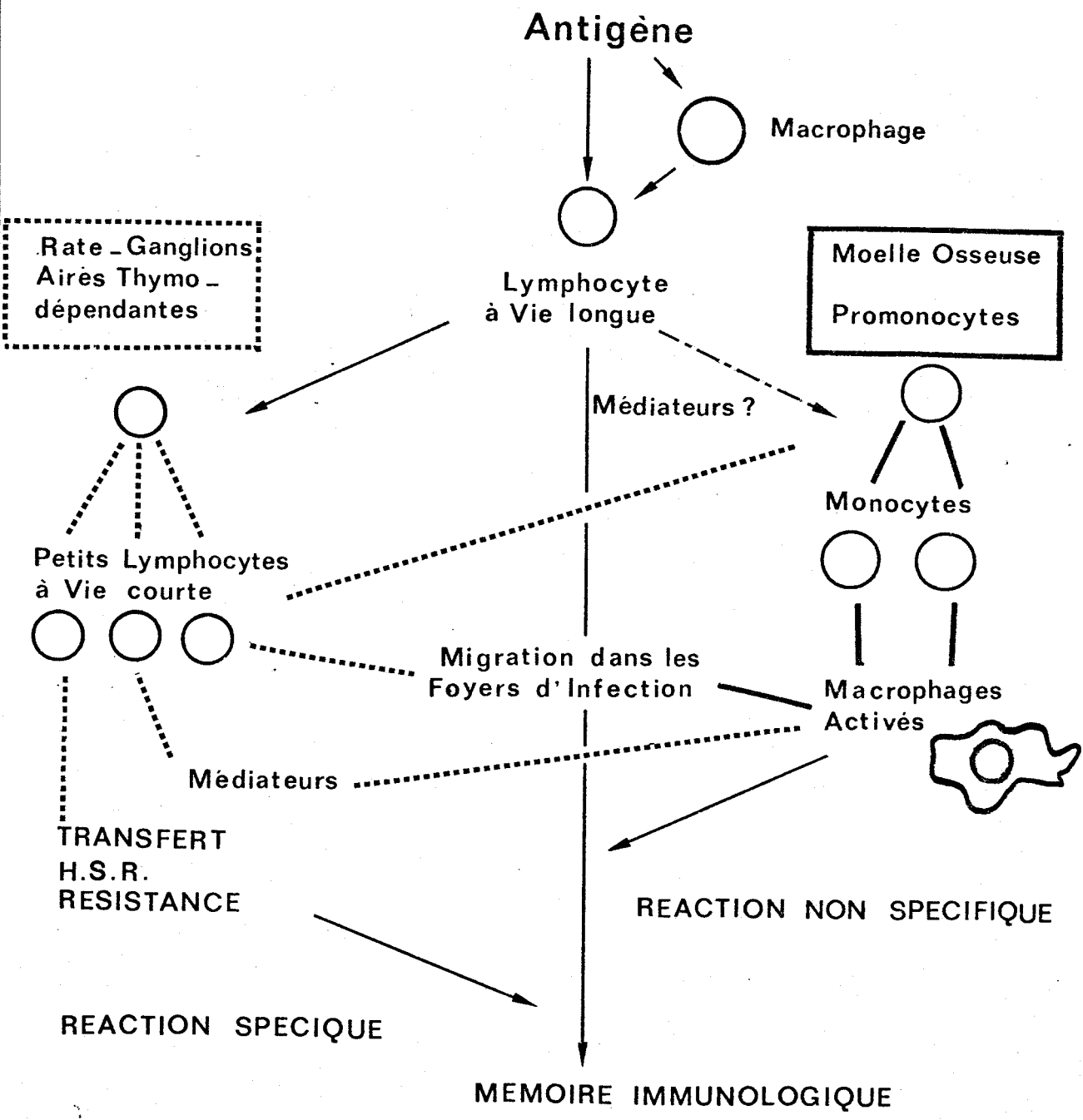


FIGURE 6

Schéma de la réaction immunologique de la souris à L.monocytogenes vu selon l'origine des cellules, la durée et le type de réaction.



Il semble donc qu'il soit possible de distinguer l'H.S.R. de la résistance cellulaire, la relation temporelle entre les 2 phénomènes n'étant pas toujours évidente.

Cependant, il faut admettre que l'on ne fait pas toujours appel aux mêmes cellules (lymphocytes ou macrophages) et il semble bien que l'H.S.R. et l'immunité cellulaire relèvent toutes deux du même mécanisme ou de mécanismes très apparentés, car les cellules impliquées localement dans une réaction d'H.S.R. (11) sont les mêmes que celles réagissant dans les foyers d'infection (cf. supra).

La figure 6 résume l'ensemble des réactions impliquées dans l'infection à *Listeria*.

En définitive, la réaction immunologique à médiation cellulaire se traduit par deux phénomènes : l'un (H.S.R.) est spécifique et relève de la compétence des lymphocytes qui, par l'intermédiaire de médiateurs, agissent sur les macrophages. L'autre (résistance cellulaire et destruction des germes phagocytés après leurs multiplication) n'est pas spécifique et résulte de l'activation des macrophages.

B.- L'IMMUNITÉ DANS LA TOXOPLASMOSE.

En 1913, très peu de temps après la découverte des toxoplasmes, LAVERAN notait que des animaux guéris de la maladie devenaient résistants, et, dès 1929, LEVATIDI et coll. (54), sur le lapin montraient la dualité de la résistance, humorale et tissulaire.

On connaît la différence de virulence des souches de toxoplasmes : les unes comme la souche virulente RH de SABIN, tuent très rapidement les animaux, les autres comme la souche chronique de BEVERLEY provoquent seulement la formation de kystes tissulaires.

On sait également par l'observation clinique que l'âge est un facteur important, puisque le fœtus est plus particulièrement atteint (5), et que cette éventualité ne peut se produire qu'une seule fois, la mère devenant alors résistante.

Il faut donc envisager les deux aspects de la défense de l'individu (immunité de type humoral ou de type cellulaire).

1°) Les facteurs humoraux.

Ils peuvent être spécifiques ou non spécifiques.

a) les facteurs non spécifiques, représentent la défense immédiate de l'organisme. Nous avons déjà noté que les sérums de divers animaux étaient défavorables à la survie des toxoplasmes, mais sans savoir s'il s'agissait d'anticorps naturels ou bien du facteur accessoire, dont l'apparition est d'ailleurs subordonnée à l'âge (5).

Avec *Listeria monocytogenes*, *Plasmodium berghei* et *Pericillium funiculosum*, les toxoplasmes font partie des rares organismes non viraux qui ont été décrits jusqu'ici comme des inducteurs d'interféron. (En fait, comme il semble dans bien des cas que les ARN bicaténaires soient en cause, le phénomène pourrait être assez général ; seule une étude systématique, qui n'a pas encore été entreprise, permettrait de s'en assurer).

En 1966, RYTEL et JONES (98) ont affirmé l'induction d'interféron dans les cellules parasitées par les toxoplasmes. La même année, FRESHAM, MERIGAN et REMINGTON (39), confirmaient la production en culture cellulaire après infection par le toxoplasme, d'une substance ressemblant à l'interféron, et entraînant une résistance aux virus. En corollaire, REMINGTON et MERIGAN (98) montraient deux ans plus tard, que les cellules produisant l'interféron étaient plus résistantes à l'infection par des toxoplasmes.

b) les facteurs humoraux spécifiques. Ils sont présents dès le 4ème jour de l'infection. Ces anticorps détruits par le 2-Mercapto-Ethanol, sont des anticorps de type IgM (106). Les immunoglobulines de type IgG qui sont résistantes à cet agent apparaissent ensuite.

Ces anticorps agissent bien sur les toxoplasmes libres et sont mis en évidence dans le test de lyse de SABIN et FELDMAN (dye-test, 99). Chez le rat, la parasitémie commence à disparaître avec l'apparition des anticorps (95).

STRANNEGARD (108) a suivi l'évolution des deux types d'anticorps chez le lapin, dans divers cas d'immunisation. L'utilisation d'extrait antigénique ne faisait apparaître que des anticorps de type IgG.

Il a complété cette étude par la recherche des conditions de l'immuno-inactivation (109). Elle est une fonction sigmoïdale de la dose d'anticorps et dépend de la concentration de l'activateur sérique *, de la température, de la concentration des sels, du pH et de la classe d'anticorps (IgM ou IgG). Les deux classes d'immunoglobulines nécessitent l'activateur, mais les IgM semblent plus actives.

STRANNEGARD (1967, c) a décrit l'action de ces anticorps en les marquant à la ferritine et en recherchant leur localisation en microscopie électronique :

- sans activateur, ils sont présents à la surface des toxoplasmes qu'ils ne semblent pas endommager.

- avec l'activateur, ils sont localisés à l'intérieur des toxoplasmes dont les membranes sont endommagées et les IgM s'y concentrent d'ailleurs mieux que les IgG.

Ces expériences prouvent bien l'action des anticorps *in vitro* sur des toxoplasmes libres ; mais *in vivo*, FOSTER et Mc CULLOCH (34) n'ont obtenu chez la souris, par transfert d'immunsérum de cobaye et de facteur accessoire, qu'une très légère protection.

C'est qu'en effet, les toxoplasmes sont des parasites intra-cellulaires. Dans cette localisation, ils paraissent être à l'abri des anticorps comme l'ont noté SABIN et FELDMAN (99) lors de la présentation du "dye-test". Ceci est confirmé par marquage des anticorps à la ferritine (72). Les anticorps s'arrêtent principalement à la membrane cellulaire et accessoirement à la membrane du phagosome, n'atteignant jamais les toxoplasmes. L'efficacité des anticorps ne peut donc être que passagère, lors de la libération des toxoplasmes, avant qu'ils ne pénètrent dans une nouvelle cellule et à condition que cette cellule soit plongée dans une humeur biologique contenant ces anticorps (58).

Les facteurs sériques jouent de ce fait un rôle dans la défense de l'organisme, mais ne suffisent pas à enrayer l'évolution de la maladie comme le prouvent également les tentatives de vaccination à l'aide

* L'activateur sérique dont il est question est synonyme de facteur accessoire, terme employé par d'autres auteurs. Il agit comme le complément auquel il doit être apparenté.

de toxoplasmes tués, par différents moyens physiques ou chimiques, qui suscitent bien l'apparition d'anticorps, mais non celle de la résistance à la maladie.

L'intervention des facteurs cellulaires, est donc indispensable à la manifestation de l'Immunité.

2°) Les facteurs cellulaires.

a) facteurs non spécifiques.

RUSKIN et REMINGTON (96) ont étudié la résistance conférée par une souche avirulente de *Toxoplasma gondii* vis-à-vis de *Listeria*. Elle est effective. Il en est de même de la résistance inverse, mais seulement pour des souches moins virulentes que la souche RH. Ils ont montré que l'interféron n'intervenait pas.

Dans un travail postérieur, (97), ces auteurs ont prouvé que la phagocytose aspécifique n'est pas seule en cause, puisqu'il n'y a pas d'augmentation du coefficient d'épuration sanguine de BIOZZI. Ils ont noté en outre une plus grande résistance à la nécrose des macrophages péritonéaux qui joueraient un rôle majeur dans la résistance hétérologue (cf. MACKANESS).

L'injection de glycogène ou d'adjuvant de Freund entraîne une disparition plus rapide des toxoplasmes chez les animaux stimulés de cette manière (84). Il est donc possible de rapprocher cette stimulation non spécifique de celle obtenue avec le B.C.G. et *Corynebacterium parvum* (107).

Les macrophages apparaissent bien comme les cellules responsables de cette résistance non spécifique.

b) facteurs spécifiques.

Si l'inoculation d'organismes non apparentés ou de substances chimiques permet une protection contre les toxoplasmes, il en est de même à fortiori, des souches avirulentes du parasite, comme l'ont montré de nombreux auteurs (7, 37a, 75, 104, 122), en particulier avec la souche avirulente "Beverley", vis-à-vis de la souche "RH".

Cette prémunition apparaît vers la 3ème semaine et elle atteint son maximum après 4 semaines suivant ainsi l'immunité humorale, ce

qui fit penser à certains (104) que les deux phénomènes étaient liés. Cependant, si les anticorps apparaissent dès le 4ème jour, il en serait de même de l'hypersensibilité retardée (44) ; et comme dans le cas de *Bruceella abortus*, il se peut que la résistance n'apparaisse qu'ensuite.

Certains résultats sont nettement en faveur de l'immunité à médiation cellulaire.

Nous avons déjà noté la résistance à la nécrose des macrophages (97). NAKAYAMA (75) a envisagé également leur rôle pour expliquer la disparition plus rapide de la cavité péritonéale des toxoplasmes virulents chez les animaux prémunis ; ceci avait d'ailleurs été suggéré antérieurement par l'étude *in vitro* de VISCHER et SUTER (117).

FRENKEL (37b), chez le hamster, a réussi le transfert de l'immunité à partir de cellules spléniques et ganglionnaires. Il l'a fait à la fois pour *Besnoitia jellisoni* et *Toxoplasma gondii* sans obtenir d'immunité croisée.

D'autres faits apparaissent moins nettement en faveur de l'immunité cellulaire car ils peuvent être sujets à controverse : HULDT (43) a mis en évidence une augmentation de volume de la rate et des ganglions lymphatiques plus nette chez les animaux ayant guéri naturellement que chez les animaux vaccinés, ainsi qu'un nombre moins important de parasites. Puis, ce même auteur a montré que les lymphocytes de la rate possèdent le plus fort pourcentage de transformation lymphoblastique (44).

La rate semblerait donc jouer un rôle important dans l'immunité. Cependant, chez la souris inoculée avec la souche Beverley, peu virulente, la très faible augmentation de mortalité après splénectomie (20 % de morts, pour 15 % chez les témoins), contraste avec l'élévation importante de mortalité obtenue par un traitement immunodépresseur à la cortisone ou à la 6-Mercapto-purine (105).

A ces réactions immunologiques de défense pourraient s'ajouter pour l'hôte des réactions immunopathologiques, telles que les réactions de type auto-immunitaires, comme l'a suggéré ASHERSON (4) dans une revue générale. Elles iraient à l'encontre de la résistance.

C'est un phénomène de ce type qui expliquerait la survie prolongée des souris infectées par *Plasmodium berghei* et soumises à des injections de sérum anti-lymphocitaire ; ces dernières bloquant les réactions de défense auraient dû, suivant toute logique, abréger l'existence des animaux expérimentés (101).

Nous avons donc affaire à des phénomènes complexes, dont l'abord peut s'avérer délicat, et qu'il est nécessaire d'analyser soigneusement afin d'indiquer la part de chaque phénomène.

Nous avons donc repris cette étude sur la base de ces différents travaux, dont ceux de FRENKEL, en essayant de transposer à la souris, principalement, les résultats obtenus sur le hamster. Nous nous sommes attachés à suivre l'hypersensibilité retardée et la résistance à l'infection.

MATERIEL ET METHODES.

I.- ANIMAUX.

Fournis par le C.S.E.A.L.-C.N.R.S., 45 - ORLEANS-la-source.

1°) Souris.

- souche Swiss : pour l'entretien des souches de toxoplasmes.
- souches consanguines : Balb/c, CBA, C57/B1, DEA pour les expériences de résistance et de transfert cellulaire.

Les animaux utilisés ont généralement 4 à 5 semaines au début de l'expérimentation (20 g environ).

2°) Rats.

- souche Wistar : consanguine, animaux de 200 g environ.

II.- TOXOPLASMES.

1°) Souche avirulente : 76 K (52).

Entretenu sur souris : le cerveau d'une souris inoculée depuis plus d'un mois par voie intrapéritonéale (I.P.) est prélevé aseptiquement, lavé et broyé doucement dans homogénéiseur de type Potter avec 5 ml de solution de HANKS *.

Les kystes, dénombrés à la cellule de THOMA dont la faible épaisseur permet de bien les identifier, ont en moyenne 30 à 40 microns de diamètre. Il est cependant nécessaire de lire toute la surface de la lamelle comprise sous la bande au faible grossissement.

Le nombre de kystes est établi par la moyenne de 2 lectures. Les souris sont reinoculées par la suspension ajustée à 30 kystes pour 0,5 ml.

* Cf. livre de PAUL (88).

2°) Souche virulente RH :

Entretenue par passage bihebdomadaire sur péritoine de souris. Le liquide d'ascite est récupéré stérilement à la seringue, après injection de 2 ml de HANKS contenant 5 U/ml d'héparine, selon la technique de récolte des macrophages.

III.- RECOLTE DE CELLULES OU DE SERUMS.

A) Sérums.

Prélèvement à la veine sous-clavière après anesthésie à l'éther de l'animal.

B) Cellules péritonéales.

Récoltées selon la technique de FAUVE (29) : après sacrifice de l'animal par écrasement cervical, le péritoine est mis à nu par décollement de la peau. On injecte 3 à 5 ml de milieu 199 contenant 2 % de BSA (1) 50 UI/ml de Pénicilline, 50 g/ml de Streptomycine et 5 U/ml d'Héparine. Le liquide de lavage est recueilli dans un Erlenmeyer posé dans de la glace pilée.

C) Cellules spléniques.

Après prélèvement et incisions, la rate est broyée dans un broyeur lache (2), contenant 2 ml de milieu, puis filtrée sur un tamis (3) (maille 60 microns). Les cellules sont lavées 2 fois et centrifugées à 65 g pendant 5 minutes. Elles sont comptées après dilution au 1/40 dans l'acide acétique à 2 %, puis ajustées à la concentration désirée pour l'injection intravaineuse (I.V.).

(1) Sérum albumine Bovine : Fraction V ARMOUR (Industrie Biologique française) ou Albumine BD-MERIEUX.

(2) Broyeur lache type Biozzi : La Verrerie Soufflée.

(3) Tamis : Glass and Co.

D) Dose d'épreuve.

Pratiquée avec la souche RH. Les toxoplasmes récoltés dans le liquide d'ascite sont séparés des cellules par filtration sur papier à 4°C. Le filtrat est centrifugé à 450 g pendant 5 mn. Le culot est re-suspendu dans le milieu 199 et les toxoplasmes sont comptés dans une cellule de THOMA. La concentration est ajustée pour l'inoculation intrapéritonéale (I.P.) ou sous-cutanée (S.C.).

IV.- PREPARATION DES ANTIGENES.

A.- La production d'antigènes *T. gondii* peut se faire de différentes façons.

1°) Sur souris.

- par simple passage sur souris comme pour l'entretien des souches,
- par passage combiné avec un sarcome ascitique (TG 180 de SARTORELLI) ce qui permet d'augmenter le nombre de toxoplasmes récoltés..

2°) Sur culture cellulaire *in vitro*.

Comme nous nous proposons d'analyser la structure antigénique et de rechercher d'éventuelles communautés avec l'hôte (souris), il nous fallait utiliser un antigène n'ayant pas eu de contact avec ce dernier, en raison des adsorptions possibles de protéines de l'hôte.

De nombreux auteurs ont montré la possibilité de cultiver les toxoplasmes sur cultures de tissus depuis les travaux de CHERNIN et WELLER (1954). Nous avons utilisé la technique de BETZ (1968) : la multiplication se fait sur cellules Hela.

a) Culture des cellules Hela.

Il s'agit d'une lignée continue de cellules humaines isolées d'un carcinome utérin.

La culture se fait en tapis sur des flacons plats de 250 ml. En 4 jours le tapis est confluent ; les cellules sont alors dis-

sociées par le versène et détachées avec une pipette munie d'une poire. Chaque flacon permet l'ensemencement de 4 nouveaux flacons qui sont additionnés de 30 ml de milieu HLEG * contenant 10 % de sérum de veau (figure 7).

b) Culture des Toxoplasmes sur cellules.

Après 2 jours de multiplication, le milieu HLEG est remplacé par du milieu 199 sans sérum et l'on ajoute à la boîte 0,2 à 0,5 ml de liquide d'ascite de souris.

Après 3 à 4 jours, apparaissent des plages de lyse cellulaire où l'on peut voir des toxoplasmes. En 8 à 9 jours, toutes les cellules sont lysées, il ne reste que des toxoplasmes (figure 7).

B.- Récolte des antigènes.

1°) Antigène toxoplasme.

Nous avons fait 5 passages de culture à culture avant de récupérer l'antigène comme suit :

- après ensemencement en toxoplasme les cellules sont conservées 5 jours à l'étuve, la plupart des cellules sont alors lysées.
- après agitation vigoureuse, le liquide du flacon est filtré sur papier. Le filtrat qui contient les toxoplasmes est mis à dialyser contre de l'eau distillée, à 4°C, pendant 48 heures.
- le contenu du boudin à dialyse est récupéré, centrifugé à 20.000 t/mn pendant 1 heure, le surnageant est alors congelé puis lyophilisé (figure 7). Nous obtenons ainsi un antigène contenant à la fois les protéines intra-cellulaire et les produits de métabolisme.
- l'antigène toxoplasme ainsi préparé est ensuite titré en azote total selon la méthode de DUMAS qui est un micro-KJELDHAL adapté à un appareil automatique (1).

* HLEG : Hydrolysate de Lactalbumine, Earle, Glucose.

(1) Nitrogen Analyzer : COLEMAN Inst. Co.

CULTURE DE
CELLULES HELA

PREPARATION DES ANTIGENES

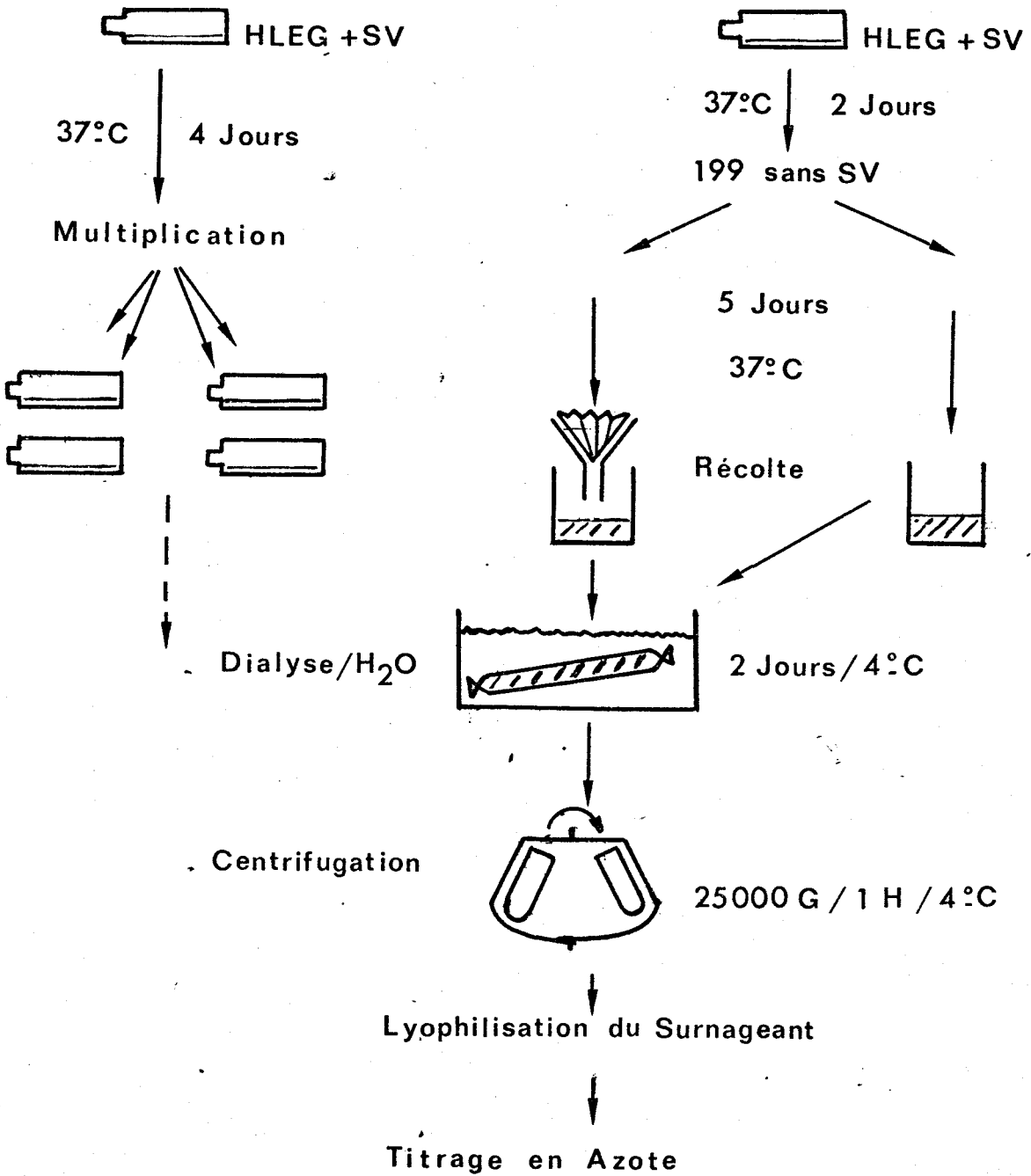


FIGURE 7

HLEG : Hydrolysate de Lactalbumine, EARLE, Glucose.
S V : Sérum de Veau .



2°) Antigène cellules Hela.

La méthode utilisée est identique à la précédente hormis la filtration sur papier. Cet antigène est également titré en azote (figure 7)

V.- IMMUNISATION DES LAPINS.

Nous avons immunisé des lapins selon les techniques habituelles

- 0,5 ml de sérum physiologique contenant 2 mg d'antigène additionné du même volume d'adjuvant de Freund complet pour la première injection et incomplet pour les suivantes.

- le mélange est injecté dans la cavité "sous-claviculaire" chaque semaine (1).

- une prise de sang est effectuée tous les 15 jours pour vérifier l'immunisation.

Lorsque le nombre d'arcs comptés sur l'immunoélectrophorégramme n'augmente plus, le lapin est considéré comme hyperimmunisé et peut être saigné à blanc pour récupérer le maximum de sérum.

Nous avons ainsi préparé des lapins pour :

- l'antigène toxoplasme
- l'antigène cellules Hela
- l'antigène milieu de culture (HLEG + sérum de veau)
- l'antigène cerveau de souris.

VI.- TEST D'INHIBITION DE L'ETALEMENT DES MACROPHAGES.

Décrit par FAUVE et DEKARIS (23,31), ce test offre la possibilité d'explorer, *in vitro*, l'hypersensibilité de type retardé. Il est basé sur la constatation du fait que les macrophages d'animaux, présentant

(1) Méthode de l'Institut PASTEUR.

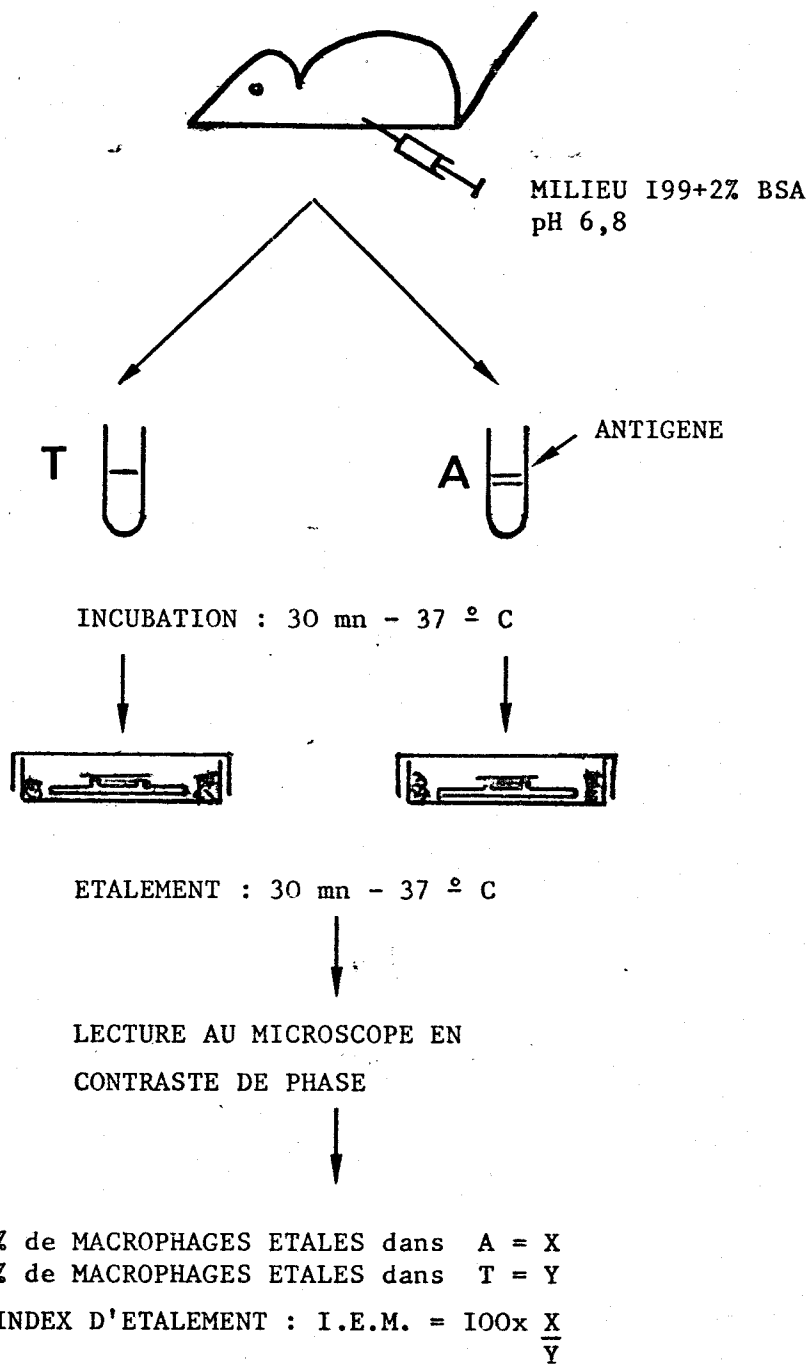


FIGURE 8

SCHEMA DU TEST D'INHIBITION DE L'ETALEMENT DES MACROPHAGES.



cette réaction, ne s'étalent plus *in vitro*, en présence de l'antigène l'ayant induite, comme cela peut être le cas pour la tuberculine (22).

Schématiquement, on le pratique en séparant en 2 lots les cellules péritonéales de l'animal immunisé. Le tube A sert de témoin, le tube B est additionné d'une dose adéquate d'antigène. Les tubes sont incubés 30 mn à 37°C, puis agités. Les cellules sont récupérées à la pipette et mises dans des hématrimètres de THOMA double et incubées une nouvelle fois 30 mn à 37°C. On procède alors à la lecture de la cellule témoin et de la cellule contenant de l'antigène.

Dans les 2 cas, on calcule le % de macrophages étalés. L'index d'étalement des macrophages (I.E.M.) représente le rapport des % d'étalement avec l'antigène sur celui sans antigène (figure 8).

Des souris non immunisées sont traitées de la même manière. Elles fournissent l'I.E.M. témoin qui est d'autant plus proche de 100 que la dose d'antigène utilisée n'a pas d'effet sur l'étalement normal des macrophages.

Nous discuterons de son intérêt et de sa sensibilité après la présentation de nos résultats.

RESULTATS.

Nous ferons d'abord le point de nos travaux antérieurs, puis nous exposerons les résultats de nos recherches actuelles.

I.- RAPPEL DES RESULTATS ANTERIEURS (33)

Ils concernent les relations de la dose d'épreuve avec la survie des animaux et le milieu de suspension d'une part, et d'autre part la prémunition, le transfert de l'immunité, et les hypothèses relatives à son manque d'efficacité.

A.- Relation survie - Dose d'épreuve.

Les souris Balb/c ont une survie en relation linéaire avec le logarithme de la dose d'épreuve (souche RH injectée par voie intrapéritonéale).

L'écart entre chaque dose est sensiblement d'un jour. Ceci peut donc également signifier qu'une augmentation d'un jour de la durée de survie correspond en fait à l'inoculation de 10 fois plus de toxoplasmes. Et si nous n'obtenons parfois qu'une augmentation de survie de 2 à 3 jours, ce qui paraît fort peu, ceci est en fait bien plus important au regard de la dose d'épreuve qui pourrait être 100 ou 1000 fois supérieure à celle des témoins, pour une durée de survie identique.

B.- Milieu de suspension - Dose d'épreuve.

Pour obtenir une bonne reproductibilité dans les résultats, il était nécessaire d'obtenir :

1°) Une suspension de toxoplasmes libres.

Le liquide obtenu par lavage péritonéal contient plus ou moins de toxoplasmes libres et de cellules contenant ou non des toxoplasmes

S'il y a beaucoup de trophozoïtes libres, une simple filtration sur papier permet de les séparer des cellules qui resteront en très grande partie sur le filtre.

Si, au contraire, il y en a peu, il est alors nécessaire de pratiquer d'abord une incubation à 37° pour favoriser la libération des toxoplasmes, qui peut d'ailleurs être augmentée par addition de quelques millilitres de milieu contenant 2,5 % de trypsine. En général, une demi-heure suffit, et après filtration comme précédemment, les toxoplasmes sont centrifugés et lavés.

La numération se fait à la cellule de THOMA (épaisseur 100 microns) ou à la cellule de PIETTE (épaisseur 20 microns).

2°) Un milieu de conservation adéquat.

L'ensemble de ces manipulations fait qu'il y a un délai plus ou moins long entre la récupération et l'inoculation ; il est donc nécessaire de conserver les toxoplasmes dans un bon milieu de suspension.

Nous avons vu que plusieurs auteurs avaient abordé ce sujet. Nous ne pouvions cependant pas ajouter de protéines étrangères dont les propriétés immunologiques auraient interféré avec notre modèle expérimental.

Aussi nous avons essayé divers milieux, certains simplement comme référence, et nous avons essentiellement comparé la valeur de la solution de HANKS et du MEM * de EAGLE. Ce dernier s'est avéré être le meilleur pour la survie des toxoplasmes ; nous avons utilisé également le 199 de PARKER et coll. qui contient en plus des éléments du MEM tous les autres acides aminés et toutes les vitamines (88).

Cette étude, entreprise sur 48 heures, nous permet donc de savoir, suivant le délai après la numération, quel est le nombre de toxoplasmes vivants dans la suspension à injecter.

* MEM : Milieu Essentiel Minimum (88).

C.- Prémunition.

Mise en évidence par plusieurs auteurs, il était nécessaire de la vérifier dans notre modèle tant pour les souches de toxoplasmes utilisés que pour la souche de souris.

Avec les souris Balb/c, nous avons pu montrer que la protection obtenue était statistiquement significative dès le 10^{ème} jour alors que les auteurs ne la considéraient réelle que vers la 3^{ème} semaine.

Ce fait est intéressant car il coïncide avec la phase de multiplication intrapéritonéale de la souche avirulente 76 K. Après celle-ci, les trophozoïtes disparaissent progressivement pour aller former des kystes viscéraux.

La prémunition s'avérant significative, il était donc possible d'envisager d'effectuer des transferts de cellules ou de sérum.

D.- Transferts.

Nous les avons pratiqués soit 10 jours après l'inoculation de la souche avirulente, soit 21 ou 30 jours après.

A 10 jours, seules les cellules péritonéales fournissaient une légère protection (proche de la signification à 95 %).

A 30 jours, les cellules spléniques s'avéraient plus efficaces, mais pas significativement, alors que pour certains transfert, nous obtenions au contraire, une diminution de survie.

D'autres critères nous apparaissaient nécessaires dans l'évaluation de l'immunité cellulaire. Nous avons alors chiffré l'augmentation pondérale du foie et de la rate et numéré les toxoplasmes que nous pouvions retrouver dans la cavité péritonéale. Ces critères se sont avérés significatifs ; nous avons alors envisagé diverses hypothèses quant à la faiblesse de la protection obtenue. Ces hypothèses relèvent soit du toxoplasme, soit de l'animal d'expérience.

1°) Toxoplasmes.

a) Nous employions deux souches différentes, leurs compositions antigéniques peuvent être différentes. Il semblait nécessaire d'utiliser la même souche, d'autant que la souris aurait, suivant FRENKEL, une mauvaise immunité croisée (37 b).

b) Les micro-organismes peuvent provoquer une auto-immunité (4). Le toxoplasme possède un tropisme particulier pour le tissu nerveux, or nous inoculons les kystes de la souche avirulente suspendus dans un broyat de cerveau. Il serait également nécessaire d'obtenir une suspension de kystes purifiés et de voir si une différence se fait jour.

c) Il peut exister enfin un phénomène de facilitation. C'est dans nos transferts de sérum que la survie est diminuée le plus fortement. Or, les cellules transférées peuvent, elles aussi, synthétiser des anticorps. Cette facilitation pourrait alors interférer avec la protection.

Nous avons, dans les résultats que nous exposerons, vérifié les deux premières hypothèses. La dernière est d'étude beaucoup plus longue.

2°) Animal d'expérience.

Nous avons en effet une protection meilleure chez le cobaye cependant, la souris est l'animal expérimental de choix ; or il était démontré que toutes les souches consanguines ne réagissent pas de la même façon au regard de divers stimuli immunologiques (16, 25, 115). Il nous fallait donc essayer diverses souches et nous avons testé les souches C57B1, DBA et CBA. Il s'est avéré que la souche CBA était la plus résistante et que ceci pouvait être en relation avec le nombre de kystes, plus important, retrouvé dans le cerveau de ces souris.

Nous étions donc en possession du matériel adéquat. Nous avons à affermir les bases de notre modèle expérimental et vérifier certaines hypothèses avant d'envisager l'étude plus précise de l'immunité cellulaire.

II.- EXPOSE DES RESULTATS ACTUELS.

Il sera divisé en quatre parties.

- L'analyse de la mosaïque antigénique de *T. gondii*.
- Les expériences complémentaires avec les souris Balb/c visant à vérifier les hypothèses émises.
- Les expériences avec les souris CBA indiquant l'influence des facteurs agissant sur l'immunité et en particulier l'étude cinétique de l'H.S.R.
- L'étude cinétique de l'H.S.R. chez le rat (hôte résistant) qui fournit la comparaison avec la souris (hôte sensible) du point de vue de l'Adaptation parasitaire.

A.- ANALYSE DE LA MOSAÏQUE ANTIGENIQUE DE *Toxoplasma gondii* ET ETUDE DES COMMUNAUTES EVENTUELLES AVEC LES ANTIGENES DE L'HOTE.

Les lapins nous ont fourni de bons hyperimmuns sérums; cependant l'analyse des résultats obtenus est extrêmement difficile.

1°) "L'antisérum toxoplasme" permet d'obtenir plus de 20 arcs avec l'antigène correspondant, mais il répond fortement avec les antigènes "cellules Hela" ou "milieu de culture". Et pour ce dernier essentiellement avec le sérum de veau bien que les toxoplasmes aient été cultivés sans ce sérum.

Il en est plus ou moins de même avec l'antigène toxoplasme et les antisérums "cellules Hela" ou "milieu de culture".

Ces résultats confirment donc les observations de CHORDI et coll. (18) qui utilisaient cependant un antigène toxoplasme préparé sur souris.

Néanmoins, nous retrouvons 4 à 6 arcs spécifiques comme WATTRE et coll. (121).

2°) Dès lors, la mise en évidence de déterminants antigéniques communs avec les tissus ou le sérum de souris s'avère délicate.

Nous avons mis en évidence des déterminants communs avec le cerveau de souris, mais ils paraissent en fait liés à des fractions sériques de souris présentes dans nos extraits (27). Ces fractions fournissent elles-mêmes des réactions croisées avec les extraits "cellules Hela" et "milieu de culture". Ces interférences semblent donc liées aux communautés antigéniques existantes entre mammifères (15).

Il nous paraît donc très difficile de mettre en évidence de telles communautés par ces méthodes, pour un parasite strictement intracellulaire.

Nous essaierons d'aborder ce problème par d'autres méthodes (telle l'immuno-peroxydase) qui pourront mettre en évidence les antigènes *in situ*. De toute façon, il sera également nécessaire, dans ce cas, de procéder à des purifications des antigènes.

TAB LEAU 1.

GR O U P E	N O M B R E	S U R V I E M O Y. e n J o u r s	V a r i a n c e
T E M O I N S	9	9,2	0,44
20K + C	10	11,5	5,16
40K + C	10	12,2	1,07
20K	10	11,8	1,07
40K	9	11,9	1,11

PREMUTION (76K): 30 j , EPREUVE : 10⁴ T. 76V

KYSTES + CERVEAU (K + C), KYSTES PURIFIES (K)

Souris / T. gondii



B.- ETUDE COMPLEMENTAIRE CHEZ LA SOURIS BALB/C.

Nous avons émis des hypothèses sur la moindre résistance des souris qui pouvait être due entre autres, soit à l'emploi des souches hétérologues de toxoplasmes (76 K et RH), soit à la présence de substance cérébrale souillant les kystes 76 K injectés.

Nous avons vérifié ces hypothèses :

1°) Utilisation de souches homologues (76 K/76 V).

En exacerbant la virulence de la souche 76 K, par passages rapides sur péritoine de souris, nous avons obtenu la souche 76 V, de virulence identique à la souche RH, et cela après 3 passages seulement.

L'augmentation de survie (tableau 1) obtenue par prémunition (76 K/76 V) est significative, mais pas supérieure à celle observée avec une infestation d'épreuve par la souche hétérologue RH.

2°) Obtention de kystes purifiés.

En utilisant la technique de centrifugation dans la gomme arabique (74), nous avons obtenu des kystes débarrassés au maximum de substance nerveuse.

Cette technique fait jouer à la fois la densité et la viscosité : nous préparons 2 solutions de gomme arabique à 16 et 24 %, de densités respectives 1,050 et 1,070. Ces couches sont superposées dans les tubes à centrifuger et l'on y ajoute une suspension à 1 % du broyat de cerveau. Après centrifugation à 1000 g pendant 15 minutes, la substance cérébrale est presque totalement arrêtée à la surface de la première couche (1,050) alors que les kystes sont récupérés dans le culot de la seconde (1,070). Ils sont alors lavés et comptés avant l'injection.

L'augmentation de survie (tableau 1) ne s'avère pas différente de celle obtenue en présence de souillures de tissu cérébral.

3°) Influence de la dose de prémunition.

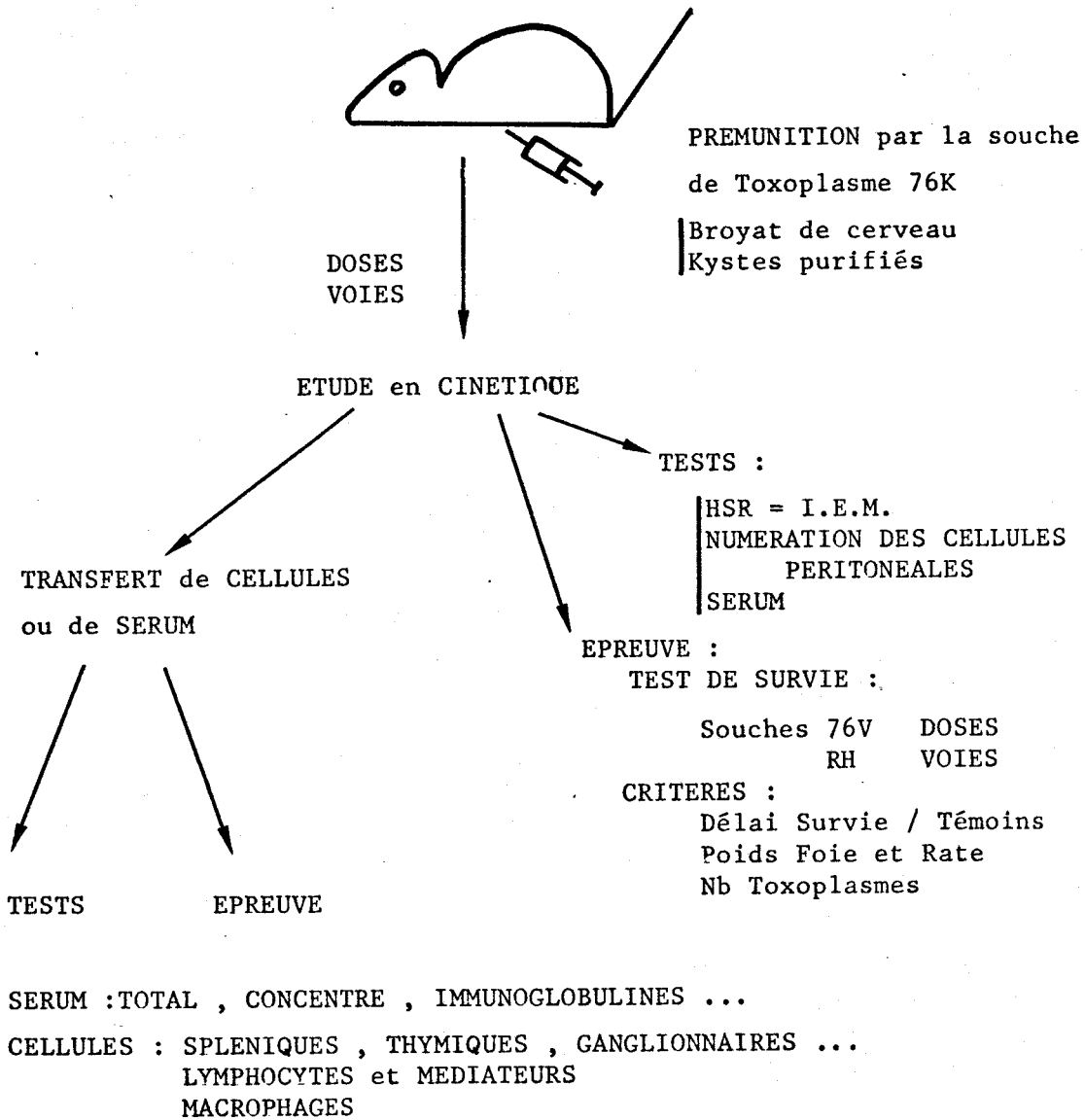
L'emploi de 2 doses de prémunition (20 et 40 kystes) n'entraîne pas de différence significative de survie (tableau 1).

Il est permis de penser qu'avec le délai de prémunition (1 mois), ces deux doses permettent d'atteindre le seuil de population qui, selon MACKANESS, déclenche l'immunité cellulaire.

Dans ces conditions, ne peuvent être encore valables que les hypothèses d'auto-immunité due au parasite ou de facilitation.

Nous pouvons également penser que les faits observés sont dus à une faible réactivité immunologique de la souche de souris utilisée (Balb/c). Réaction qui est en tout cas moindre que celle de la souche CBA avec laquelle nous avons poursuivi notre travail.

EVALUATION DE L'IMMUNITE CELLULAIRE (et HUMORALE)

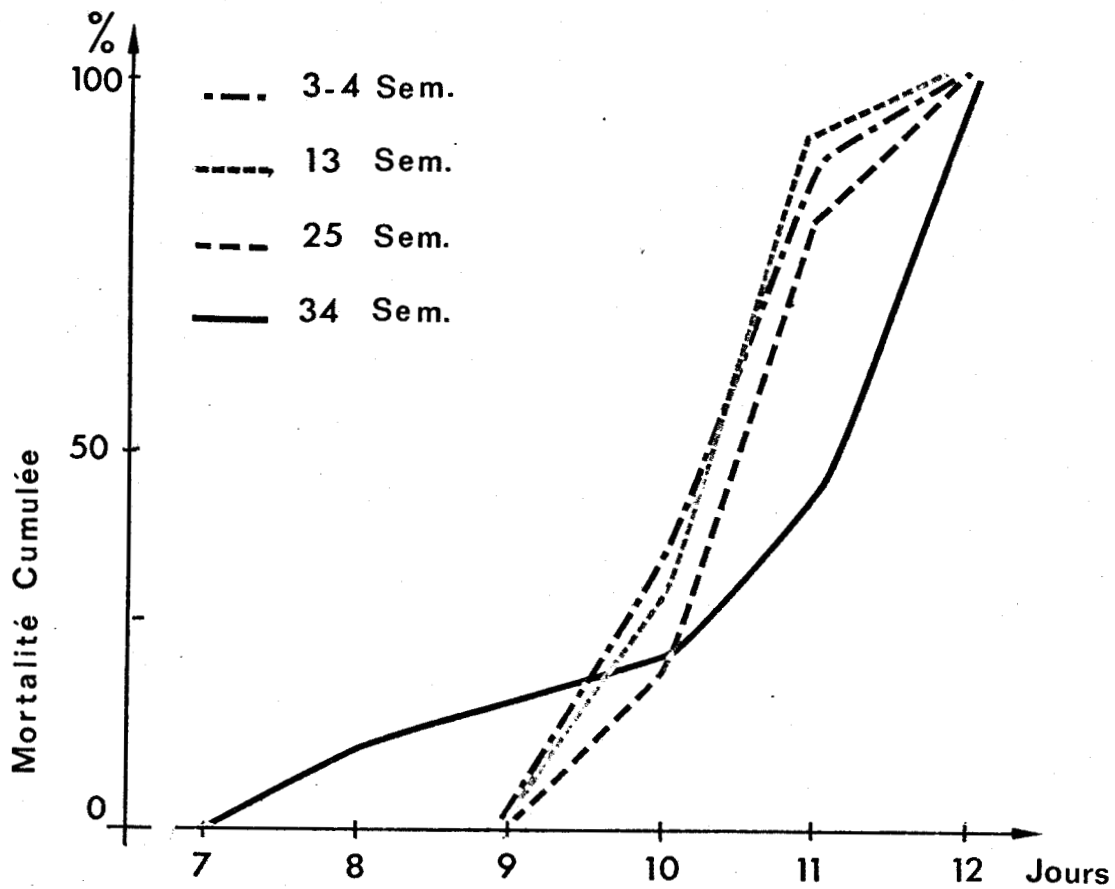


ROLE DE L'IMMUNITE / PROTECTION
/ ADAPTATION PARASITAIRE

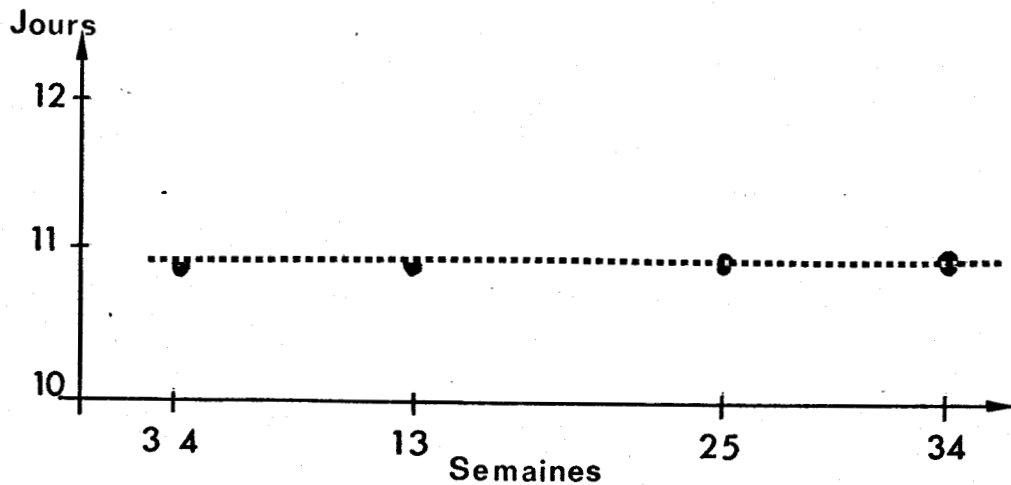
VACCINATION

FIGURE 9





SURVIE DES SOURIS CBA EN FONCTION DE L'AGE :
 PREMUNITION 30 KYSTES 76K , EPREUVE 10^3 RH



PAS DE CORRELATION SIGNIFICATIVE AGE / SURVIE .

FIGURE 10



C.- ETUDE DES PHENOMENES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LA SOURIS CBA.

La figure 9 ci-joint indique la manière dont nous voulons aborder cette étude. A chaque stade étudié, nous voulons déterminer s'il y a ou non une résistance et quels sont les phénomènes immunologiques correspondants (cellulaires ou humoraux).

Nous n'avons abordé dans ce travail que les phénomènes cellulaires par la biais de l'H.S.R. détectée *in vitro* par le test d'inhibition de l'étalement des macrophages.

Il était cependant nécessaire de parfaire la mise au point du modèle expérimental et de vérifier en particulier 2 facteurs influant sur l'immunité, facteurs auxquels les auteurs font fréquemment allusion sans que leur intervention ait été démontrée avec précision.

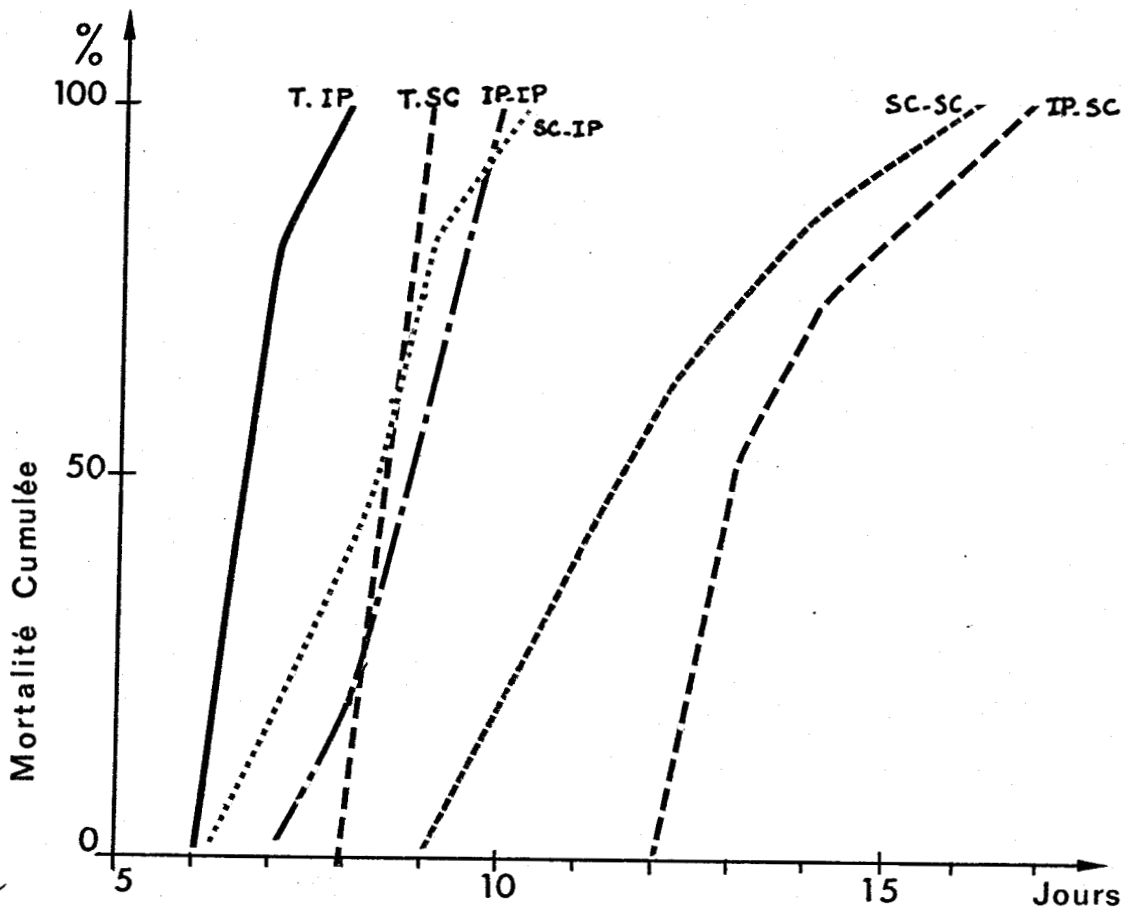
1*) Influence de l'âge des animaux.

Nous savons par l'expérience clinique (5) que le foetus ou le nouveau-né est plus sensible à l'infection que l'adulte. Ce fait pourrait être lié à l'apparition du facteur accessoire (de type "complément"). Comme nous étudions les réactions de façon cinétique, il est nécessaire de vérifier la résistance des animaux en fonction de l'âge. Nos souris ayant au moins 4 semaines au début des expériences, nous avons pris cet âge comme base et nous avons comparé la résistance de souris de 13, 25, et 34 semaines à l'épreuve de 1.000 toxoplasmes RH injectés par voie sous-cutanée (S.C.).

La figure 10 résume les résultats et indique qu'il n'existe pas de corrélation entre l'âge et la résistance puisque nous n'avons pu mettre en évidence de différence significative de survie entre ces divers lots de souris.

2*) Influence des voies d'immunisation et d'épreuve.

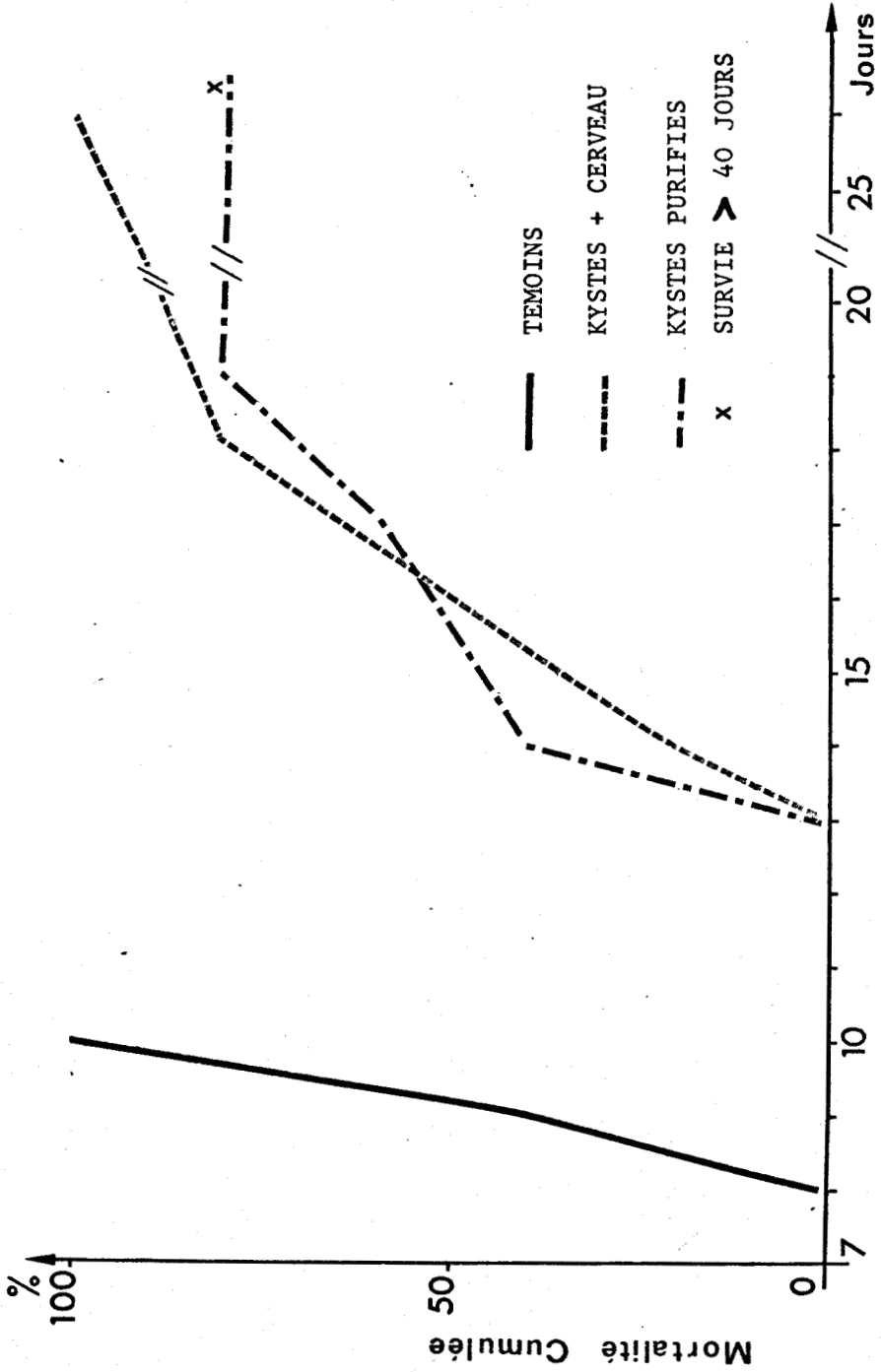
Nous avons utilisé les voies intrapéritonéales (I.P.) et sous-cutanées (S.C.) comme la plupart des auteurs. FRENKEL (37 b), pour sa part utilise la voie sous-cutanée, sans pour autant le justifier.



SURVIE DES SOURIS CBA APRES 28 JOURS DE PREMUNITION (30 K. 76K)
 ET EPREUVE ($25 \cdot 10^3$ RH) PAR LES VOIES : SOUS-CUTANEE (S.C.)
 OU INTRA-PERITONEALE (I.P.)

FIGURE 11





SURVIE DES SOURIS CBA APRES 23 JOURS DE PREMUNITION (30 K. 76K I.P.)

A L'EPREUVE DE 10^3 TOXOPLASMES RH (S.C.)

FIGURE 12



La figure 11 montre que la meilleure résistance est obtenue par le schéma IP - SC sans qu'il y ait pour autant de différence significative avec le schéma SC - SC de FRENKEL.

Nous avons en définitive opté pour ce dernier, car il nous évite de retrouver des toxoplasmes lors de la récolte des cellules péritonéales.

Nous avons par ailleurs utilisé la dose d'épreuve de 10^3 toxoplasmes RH (FRENKEL utilise pour sa part 10^3 , 10^2 et 10 toxoplasmes).

Cette dose (10^3) nous paraît être plus valable ; elle est sujette à moins d'erreurs puisqu'elle est obtenue par dilutions successives.

3°) Importance de la prémunition.

Une expérience comparable à celle faite chez les souris Balb/c a été entreprise. Nous avons prémuni les souris CBA soit avec des kystes purifiés, soit avec des kystes mélangés au broyat de cerveau (30 jours avant l'épreuve pour 10^3 RH).

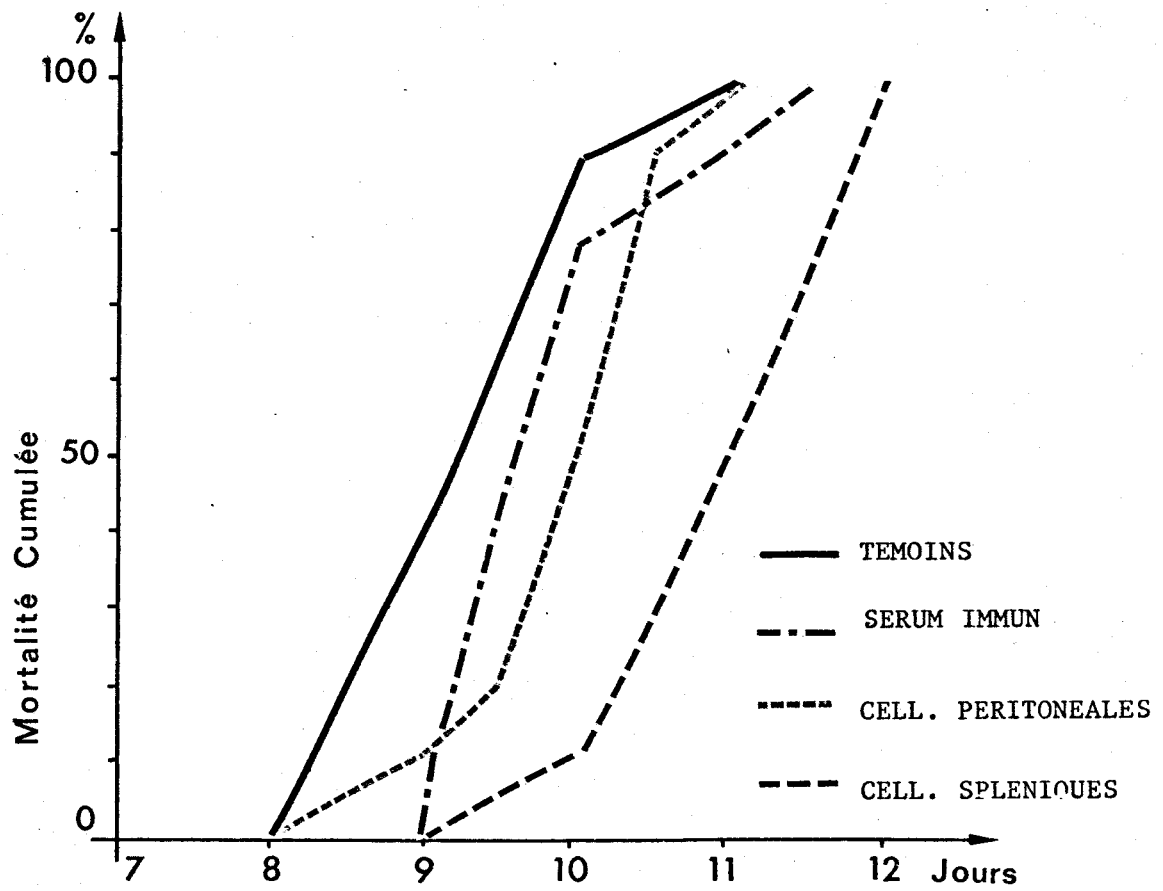
La prémunition s'avère significative ($P \leq 0,01$), nous obtenons les moyennes de survie suivantes (figure 12) :

- témoins	(n = 10)	m = 8,6 jours
- kystes purifiés	(n = 10)	m = 21 jours
- kystes non purifiés	(n = 10)	m = 18 jours

La différence n'est pas significative entre les 2 séries d'animaux prémunis, la résistance est cependant meilleure, dans ce cas, avec les kystes purifiés. Nous obtenons également une augmentation pondérale sensible du foie et de la rate comme chez les souris Balb/c.

4°) Possibilité de transfert de l'immunité par les cellules ou le sérum.

Les animaux sont prémunis depuis 4 semaines par 30 kystes 76 K. Les cellules spléniques ou péritonéales et le sérum sont transférées par voie intraveineuse (I.V.). Les témoins reçoivent seulement la solution de HANKS. L'épreuve est faite le même jour que le transfert.



SURVIE DES SOURIS CBA AYANT RECU DU SERUM OU DES CELLULES DE SOURIS PREMUNIES DEPUIS 28 JOURS (30 K. 76K I.P.)

FIGURE 13



Les résultats obtenus sont les suivants (figure 13) :

- témoins (n = 15) m = 9,6 jours
- cellules spléniques (n = 12) m = 11,3 jours ($p \leq 10^{-9}$)
- cellules péritonéales (n = 12) m = 10,2 jours ($p \leq 0,05$)
- sérum immun (n = 12) m = 10,7 jours ($p \leq 10^{-3}$)

Les transferts s'avèrent tous significatifs chez les souris CBA et il faut tenir compte avec celles-ci d'une influence de l'immunité humorale : c'est à cette époque que les anticorps réagissant dans le test de lyse sont à leur maximum (52).

Ce modèle (souris CBA) apparaît donc meilleur que le premier utilisé (souris Balb/c). Il est maintenant nécessaire pour l'étudier plus en détail de faire une étude cinétique de l'hypersensibilité retardée (H.S.R.) et de contrôler son influence par des tests de survie des animaux aux mêmes phases.

TABLEAU 2

GRUPE	DÉLAI	LYMPHO. M. x 10 ⁶	MACROPH. M. x 10 ⁶	I.E.M. *	t/Temoins STAT.
1-10 41-45 X ₁ -X ₅	0	1,16 ± 0,22	1,23 ± 0,23	96,2 ± 2,4	-
11-20 46-48	7j	3,06 ± 0,52	1,51 ± 0,15	92,1 ± 5,6	N.S.
21-30	14j	2,75 ± 0,20	1,24 ± 0,19	60,5 ± 5,2	S: ≤ 10 ⁻⁹
51-59	21j	1,90 ± 0,15	0,56 ± 0,04	64,1 ± 4,8	S: ≤ 10 ⁻⁹
31-40	28j	2,55 ± 0,21	0,64 ± 0,13	66,9 ± 14,7	S: ≤ 0,05
60-69	42j	2,76 ± 0,39	0,53 ± 0,06	74,7 ± 6,6	S: ≤ 0,01
71-80	84j	1,30 ± 0,13	0,57 ± 0,09	77,6 ± 6,7	S: ≤ 0,02
X ₆ -X ₂₀	151j	1,80 ± 0,22	0,70 ± 0,13	91,5 ± 4,0	N.S.

Souris CBA : 30 KYSTES T.gondii 76K S.C.

* 10 µg N₂ Antigène / ml.



Souris CBA : Cinétique H.S.R. / *Toxoplasma gondii*.

Test d'Inhibition de l'Étalement des Macrophages : 10µg N₂Ag/ml

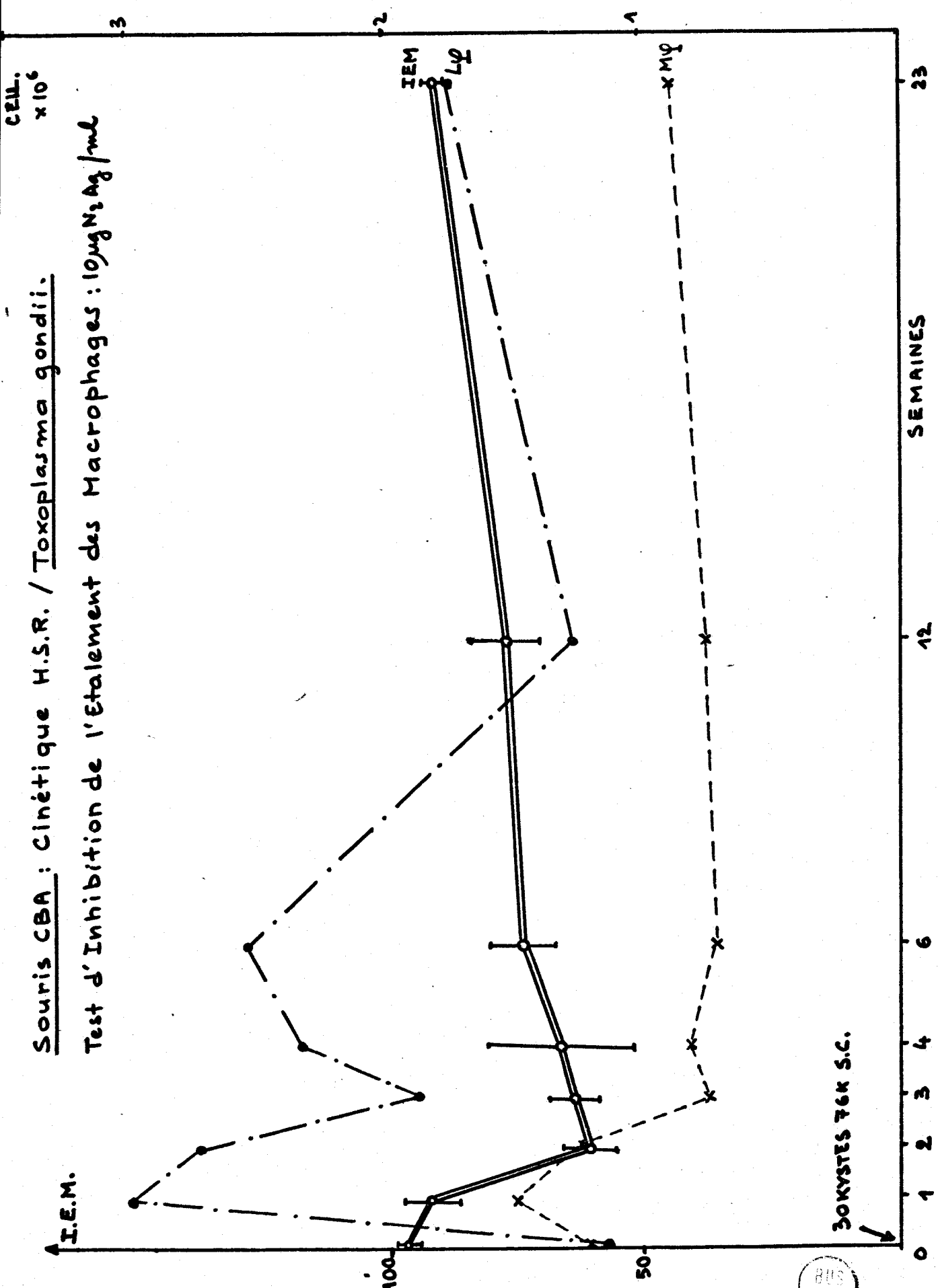


FIGURE 14

D.- ETUDE CINÉTIQUE DE L'H.S.R. CHEZ LA SOURIS CBA.

Le seul travail concernant l'H.S.R. dans la Toxoplasmose est celui de TREMONTI et WALTON (113). Il a été effectué sur un petit nombre de cobayes par des tests cutanés et le test d'inhibition de la migration des macrophages (T.I.M.M.) et n'avait d'autre intention que de démontrer la réalité du phénomène.

En ce qui nous concerne, nous avons entrepris une étude cinétique dans l'espoir qu'elle nous apporte des informations plus précises sur le rôle de l'immunité cellulaire.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 2 et la figure 14. Ils indiquent :

1°) L'H.S.R.

Elle n'est détectable qu'après la phase de multiplication des toxoplasmes qui se situe au 10ème jour. Son maximum se situe au 14ème jour, après quoi l'index d'étalement (I.E.M.) fera une remontée très lente pour ne plus être significatif par rapport aux témoins au 151ème jour. La durée de cette H.S.R. peut être due à la présence continuelle du parasite qui va former des kystes.

2°) Les cellules péritonéales.

Nous avons entrepris leur numération en pensant que leur nombre peut refléter ce qui se passe dans l'organisme.

- Nous constatons une rapide stimulation des lymphocytes comme dans toute réaction immunologique. Leur nombre a triplé dès la première semaine ; il est ensuite sujet à des variations qui peuvent être liées à des migrations vers les foyers d'infection et à l'apparition de cellules synthétisant des anticorps.

- Il en est de même des macrophages dont le nombre augmente la première semaine, mais diminue ensuite de façon sensible. A cela 3 raisons possibles :

- . . lyse due aux toxoplasmes,
- . réaction d'H.S.R. *in vivo* (77). Il y a une augmentation d'adhésivité des macrophages. Nous retrouvons en effet

TABLEAU 3

DELAI	TEST DIRECT		TEST INDIRECT	
	0,3 mg	3 mg	3 mg	10 mg
4 Jours	87,9 (5)	86,8 (5)	85,4 (10)	-
7 Jours	108,4 (5)	102,8 (5)	88,2 (10)	87,0 (10)
14 Jours	104,5 (5)	107,0 (5)	99,8 (5)	52,7 (5)

INDEX D'ETALEMENT DES MACROPHAGES EN FONCTION
DU TEMPS ET DE LA DOSE D'ANTIGÈNE T. GONDÍ.

(n): nombre de souris , mg d'AZOTE ANTIGÈNE/ml .



une infiltration plus grande des anses mésentériques et l'antigène est présent dans l'organisme.

. migration vers les foyers d'infection : le toxoplasme se répand dans tout l'organisme.

Ces trois raisons peuvent d'ailleurs se compléter.

3°) Expérience de survie.

Elle est en corrélation avec nos résultats d'H.S.R. puisque les témoins ou les animaux prémunis depuis 7 jours meurent rapidement alors que les animaux prémunis depuis 14, 21 ou 28 jours survivent.

4°) La détection relativement tardive de l'H.S.R. au 14^{ème} jour alors qu'elle est possible au 4^{ème} jour dans les modèles expérimentaux bactériens de MACKANESS pouvait s'expliquer soit par la dose d'antigène utilisée dans le test (10 µg azote/ml) soit par un manque de sensibilité de la méthode.

Aussi avons-nous pratiqué des tests avec des doses de 0,3 - 3 et 10 µg d'antigène à 4, 7 et 14 jours. Nous avons également fait des tests comparatifs par la technique indirecte de DEKARIS et coll. (24) qui est plus sensible.

Cette technique consiste à incuber les cellules spléniques des animaux immunisés pendant 18 heures avec ou sans antigène. Les cellules péritonéales d'un animal sain sont alors mises en présence du surnageant de la culture et incubées dans une cellule de THOMA comme dans le test direct.

Nous n'avons pas obtenu de résultats différents de l'étude cinétique précédente. Il s'avère donc que les conditions de notre expérimentation étaient bien appropriées et que l'H.S.R. n'est effectivement décelable qu'au 14^{ème} jour (tableau 3).

Ces résultats pour intéressants qu'ils soient ne nous paraissent pas suffisants. Le toxoplasme est un parasite ubiquiste, nous pouvons établir également des comparaisons avec un hôte différent, tel le rat.

TABLEAU 4

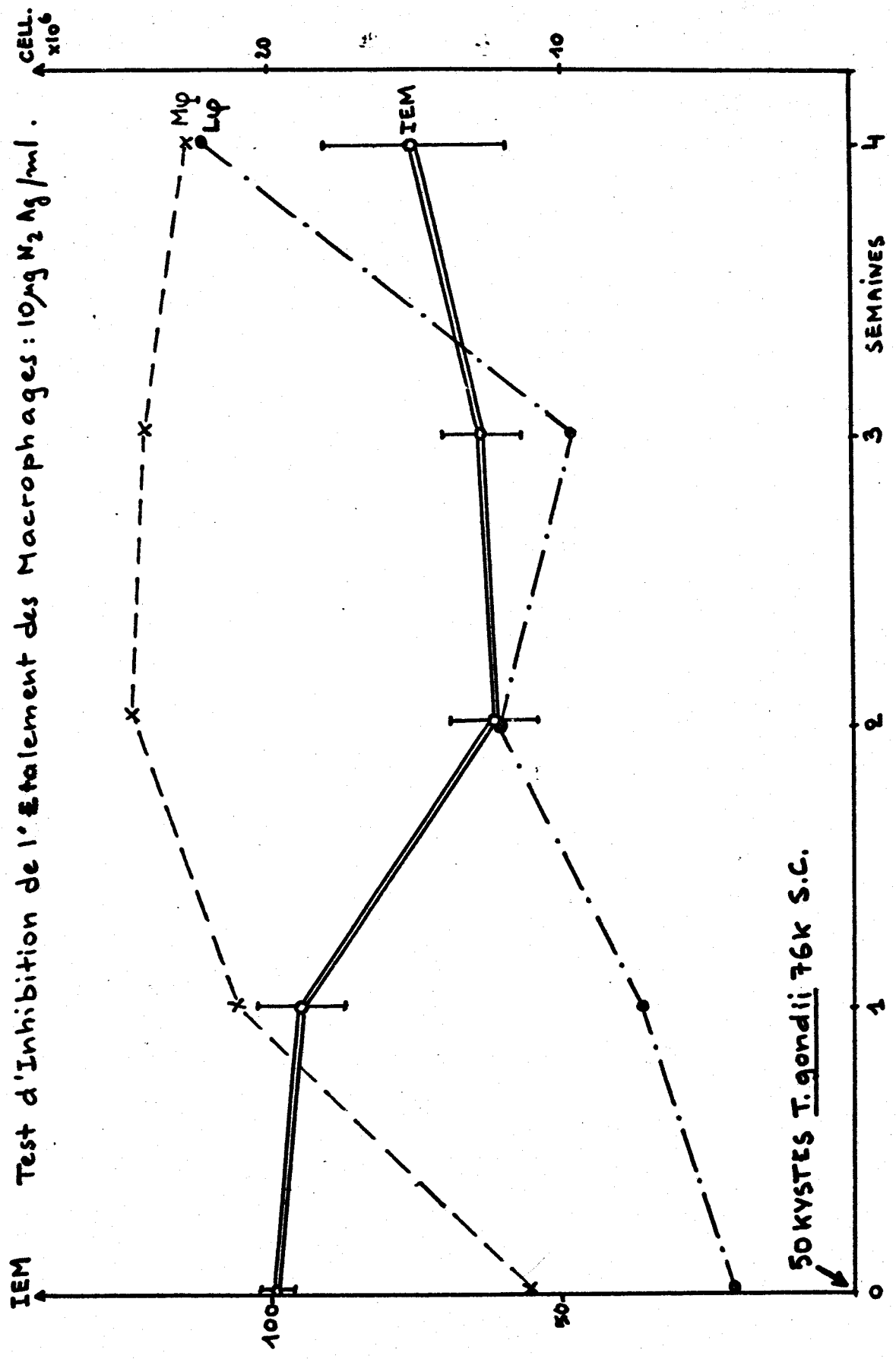
GRouPE	DÉLAI	LYMPHO. x 10 ⁶	MACROPH. x 10 ⁶	10 ¹⁰ g N ₂ O ₃ /ml I.E.M.	STAT. t/TEMOINS
1-5	0	4,03 ± 0,48	11,3 ± 2,96	99,6 ± 2,7	-
16-20	7j	7,12 ± 1,81	21,4 ± 1,97	95,7 ± 7,5	N.S.
6-10	14j	12,4 ± 3,35	24,9 ± 8,6	63,4 ± 6,4	S: ≤ 10 ⁻⁹
21-25	21j	9,31 ± 2,01	24,1 ± 3,2	65,5 ± 6,7	S: ≤ 0,01
11-15	28j	23,0 ± 5,71	20,5 ± 2,93	78,6 ± 14,5	N.S.

Rat Wistar : 50 kystes T. gondii 76k s.c.



RAT WISTAR: Cinétique H.S.R. / Toxoplasma gondii.

Test d'Inhibition de l'Étalement des Macrophages: 10 µg M₂ Ag/ml.



50 KYSTES T. gondii 76k S.C.

FIGURE 15



E.- ETUDE DES PHENOMENES IMMUNOLOGIQUES CHEZ LE RAT WISTAR.

Le rat est résistant à la souche RH (95). Après inoculation intrapéritonéale, les toxoplasmes sont retrouvés dans le sang pendant 72 heures. Ils sont détectés dans les viscères 4 heures après l'inoculation ; on les met en évidence dans le foie, la rate et les poumons après une semaine et occasionnellement jusqu'à 10 semaines dans le foie et les poumons.

Si le rat est résistant, il ne se débarrasse pas cependant de cette souche virulente.

1°) Résistance à la souche RH.

Les rats utilisés ont résisté aussi bien à 10^3 ou 10^6 toxoplasmes RH injectés par voie intrapéritonéale.

Ils peuvent même résister à 6.10^6 trophozoïtes (6).

2°) Etude cinétique de l'H.S.R.

Cette étude a été entreprise en comparaison avec la souris. Les rats ont reçu 50 kystes par voie sous-cutanée et les tests ont été effectués avec la même dose d'antigène (10 µg azote/ml). Les résultats sont les suivants :

a) H.S.R.

Dans ces conditions, nous obtenons une apparition de l'H.S.R. au 14ème jour comme chez la souris. Cependant, cette réactivité devient rapidement non significative (28ème jour). Ceci pourrait s'expliquer par la disparition du stimulus antigénique. En effet, nous n'avons pu mettre de kystes en évidence dans le cerveau des rats à l'inverse de ce que nous observons chez la souris (tableau 4, figure 15).

Nous avons également contrôlé l'influence de la dose sur le délai d'apparition de l'H.S.R. Il est encore une fois prouvé que la dose utilisée fournit la meilleure inhibition. Il est cependant possible, par inoculation intrapéritonéale, d'obtenir une réponse plus précoce vers le 7ème jour (I.E.M. = 80,9 au lieu de 95,7 par voie sous-cutanée), ce qui n'est pas le cas chez la souris.

b) Cellules péritonéales.

Les lymphocytes sont stimulés rapidement et nous retrouvons là les deux pics correspondant à ceux mis en évidence chez la souris.

Par contre, en ce qui concerne les macrophages recueillis, leur nombre est maximum au 14ème jour, et il diminue ensuite lentement. Rappelons que chez la souris, ce maximum était atteint en 7 jours et la chute était rapidement sensible.

Cette différence de comportement essentielle est très vraisemblablement liée aux modalités différentes de l'adaptation hôte-parasite, le rat étant un hôte beaucoup plus résistant que la souris à la Toxoplasmose.

Si, d'autre part, on se réfère aux résultats de VISCHER et SUTER (117), les macrophages péritonéaux de rats détruisent, *in vitro*, les toxoplasmes bien mieux que ne le font ceux de souris immunisées.

La différence de résistance des hôtes aux toxoplasmes pourrait donc être liée aux différences de capacité de destruction de leurs macrophages vis-à-vis des toxoplasmes.

DISCUSSION.

Les expériences entreprises dans ce travail nous ont permis d'aborder plusieurs problèmes :

- la production d'antigène et les relations éventuelles de cet antigène avec les protéines de l'hôte.
- la mise au point du modèle expérimental.
- le rôle de l'hypersensibilité retardée dans la résistance à l'infection dont il faut distinguer les points suivants :
 - . le choix du test,
 - . le choix de la dose,
 - . la liaison H.S.R.-résistance,
 - . les relations de l'immunité cellulaire et de l'adaptation parasitaire.
 - . rôle du macrophage dans la résistance spécifique de l'hôte.

I.- L'ANTIGÈNE.

Il semble évident que l'antigène, tel que nous l'avons préparé, ne se prête guère à l'étude des communautés antigéniques hôte-parasite. Ceci est dû à la contamination des toxoplasmes par des protéines du milieu ou des cellules Hela. Il aurait été préférable de récolter les toxoplasmes purifiés et de pratiquer des lavages pour éliminer ces contaminations comme pour les Trypanosomes (1).

Cependant, nous avons affaire à un parasite strict, ne se prêtant pas à une culture massive sur milieu synthétique comme ces derniers. La filtration fait perdre 50 % des toxoplasmes et le rendement de l'extraction ne dépasse guère 1 %. Nous n'aurions pu, dans ces conditions,

obtenir une quantité suffisante d'antigène pour mener à bien l'ensemble de nos expériences.

D'autre part, s'il se prête mal à l'analyse immunoélectrophorétique, cet antigène s'est révélé de bonne qualité pour d'autres expériences.

En définitive, il paraît nécessaire de préparer l'antigène comme nous venons de l'indiquer, mais ceci représente un travail très long.

Ce travail est d'autant plus nécessaire que les fractions sériques sont très immunogènes pour le lapin et empêchent peut-être l'apparition des anticorps spécifiques des fractions antigéniques du toxoplasme, qui doivent être bien supérieures aux 6 fractions révélées jusqu'ici.

La technique bidimensionnelle de LAURELL (53) pourrait également permettre d'en révéler plus.

II.- LE MODELE EXPERIMENTAL.

L'utilisation des souris isogéniques CBA nous a permis d'obtenir une prémunition plus efficace.

A.- INFLUENCE DE L'AGE ET DES VOIES D'INTRODUCTION DU PARASITE.

L'étude des voies d'immunisation et d'épreuve, et celle de l'influence de l'âge ont précisé d'une part, le meilleur schéma à utiliser et d'autre part, ont permis d'éliminer l'éventualité d'une résistance supérieure due à l'âge qui aurait été fortement embarrassante pour les expériences entreprises en cinétique.

En ce qui concerne les voies, il semble nécessaire d'explorer encore la voie intra-veineuse (nous savons déjà que la mortalité est plus rapide) et surtout la voie orale qui est la voie d'infestation naturelle. Mais dans ces conditions, le choix des souches de toxoplasmes se pose de façon réelle.

B.- INFLUENCE DES SOUCHES DE TOXOPLASMES UTILISEES.

1°) Faut-il, comme le suggère REMINGTON (94), utiliser une souche d'épreuve moins virulente et surtout moins "artificielle" que la souche RH. Il est, dans ces conditions, possible de protéger des souris, en utilisant des toxoplasmes tués au formol (50) et mélangés à de l'adjuvant de FREUND.

Il est cependant impossible d'obtenir une certaine virulence intermédiaire constante. Les auteurs utilisent alors une souche avirulente récupérée 6 jours après passage sur péritoine de souris.

Si la protection est évidente par rapport aux témoins, la mortalité de ces derniers est fort variable d'une expérience à l'autre et supprime, par là même, la reproductibilité des résultats.

2°) Faut-il, comme FRENKEL (37 b), utiliser la souche RH pour l'immunisation en l'associant à la prise de médicaments. Ce schéma présente 2 avantages :

- utilisation de la même souche de toxoplasme,
- résistance possible à la toxine qui ne serait présente que dans les souches virulentes.

et peut-être un inconvénient :

- la dynamique de l'infestation peut se trouver bouleversée par l'utilisation de la thérapeutique.

Ce schéma a fourni de bons résultats puisqu'il a permis à l'auteur d'obtenir une protection efficace après transfert de cellules spléniques et ganglionnaires chez le hamster.

Cependant, les séries d'animaux (2 par dose) sont très faibles et les résultats favorables obtenus peuvent avoir une autre explication :

Dans ses travaux de 1962, MACKANESS (63) a montré qu'une souche sauvage de *Listeria* s'adaptait à l'hôte lors de passages répétés : la dose létale 50 % (DL 50) passe de 6.10^7 pour la souche sauvage à $2,8.10^5$ lors du 4ème passage sur souris, soit 200 fois moins. Ces *Listeria*

"adaptés" sont phagocytées sensiblement de la même façon que celle de la souche sauvage mais ne sont détruites ni dans les mêmes proportions ni à la même vitesse ; ce qui explique la grande diminution de la DL 50.

Or, FRENKEL (37 b) entretenait ses toxoplasmes sur souris et les injectait ensuite aux hamsters. Ceci explique peut-être les meilleurs résultats qu'il a ainsi pu obtenir, et semble devoir se confirmer dans les premiers essais que nous avons pu entreprendre.

Nous essaierons de tester ces deux modèles. Il reste cependant un fait important depuis la découverte du cycle et de l'hôte définitif du toxoplasme ; le passage des souches de toxoplasmes par le chat, et l'utilisation de cet animal pourrait éclairer d'un jour nouveau l'étude de l'immunité.

III.- LE ROLE DE L'HYPERSENSIBILITE RETARDEE.

Les problèmes évoqués à propos du modèle expérimental ne sont pas sans influence sur l'hypersensibilité retardée, dont nous distinguerons les divers aspects :

A.- CHOIX DU TEST.

Nous avons le choix entre le test d'inhibition de la migration des macrophages (T.I.M.M.) mis au point par DAVID et coll. (21, 22) et le test d'inhibition de l'étalement des macrophages (T.I.E.M., FAUVE et DEKARIS, 31).

Nous avons choisi ce dernier pour deux raisons principales :

1°) Il nécessite peu de cellules d'où sa facilité d'emploi en particulier pour la souris. Il nous faudrait, avec le T.I.M.M., utiliser plusieurs animaux pour un seul test, ce qui correspondrait soit à perdre toute possibilité d'analyse statistique soit à augmenter considérablement le nombre d'animaux utilisés.

2°) L'erreur est moins grande dans un tel test (T.I.E.M.) puisqu'il suffit de dénombrer les cellules alors que pour le T.I.M.M., il faut d'abord dessiner le contour de la surface puis la mesurer au planimètre : soit deux possibilités d'erreur.

Nous vérifions d'ailleurs, à l'heure actuelle, sur les rats, la sensibilité respective des 2 tests. Il semble bien que le T.I.E.M. soit plus sensible et plus reproductible pour une dose d'antigène donnée.

B.- CHOIX DE LA DOSE D'ANTIGENE.

L'antigène utilisé contient 11 % d'azote ; il est donc très riche en protéine, nous avons fixé notre choix pour la concentration de 10 µg d'azote/ml qui nous fournissait la meilleure inhibition tout en n'agissant pas sur les témoins.

Les modèles fongiques que nous étudions également réagissent à des doses moindres. Or, lors de nos essais, nous n'avons testé que les doses de 3, 10 et 30 µg. Nous avons également remarqué avec ces champignons (*Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*) que ce n'est pas toujours la même dose qui fournit la meilleure inhibition à un temps donné de la cinétique.

Il est donc nécessaire, pour tirer des conclusions valables quant à l'apparition de l'H.S.R., de vérifier que la dose employée est bien celle qui permet la meilleure détection et en particulier aux stades non significatifs par rapport aux témoins.

C.- LIAISON AVEC LA RESISTANCE.

Nous avons montré que la résistance se développe de façon concomitante à l'apparition de l'H.S.R. Ceci n'est pas étonnant si les deux phénomènes relèvent du même mécanisme comme le suggèrent les travaux de MACKANESS. Dans les deux cas, c'est le lymphocyte sensibilisé qui est responsable de la réaction.

1°) Nous avons mis en évidence une augmentation significative du nombre de lymphocytes péritonéaux chez le rat comme chez la souris.

2°) L'H.S.R., comme la résistance, ne se développe qu'après la phase de multiplication des toxoplasmes qui se situe au 10ème jour. C'est à ce même délai que nous avons obtenu les premiers résultats significatifs de prémunition.

Il faut donc également penser que les processus de défense cellulaire se déclenchent réellement lorsque la population a atteint une densité critique.

Nous pouvons encore une fois faire référence aux modèles bactériens décrits précédemment ou aux modèles fongiques que nous étudions également et qui se prêtent à des rétrocultures :

1°) *Histoplasma capsulatum* est un champignon parasite sous une forme levure, intracellulaire comme *Toxoplasma gondii*. L'H.S.R. est significativement abaissée après que les levures aient atteint leur nombre maximum, dans le foie, la rate et les poumons, au 14ème jour. La destruction des levures se fait alors de manière très importante.

2°) *Candida albicans* est, au contraire, une levure qui, à l'état parasitaire, se développe essentiellement dans les tissus sous forme de pseudo-filaments. Une injection sous-cutanée de 10^4 levures ne permet pas de mettre en évidence d'H.S.R. significative et dans ce cas, les rétrocultures de broyat de rein s'avèrent positives. Par contre, si l'on injecte 10^6 levures qui induisent une hypersensibilité nette, il n'est plus possible de mettre en évidence le champignon dans les rétrocultures de rein.

Ces deux exemples viennent à l'appui du modèle Toxoplasme qui ne se prête guère à de telles numérations. Il semble bien, cependant, dans les tentatives de protection passive que nous entreprenons, qu'il existe une liaison entre le degré de l'hypersensibilité retardée détectée chez les animaux ainsi immunisés et le nombre de kystes que nous pouvons numérer dans les broyats de cerveau.

Nous avons vu cependant que les résultats de la résistance sont différents chez le rat et la souris ; ces faits semblent liés à la seconde cellule en cause : le macrophage.

D.- ROLE DU MACROPHAGE ET ADAPTATION PARASITAIRE.

Il existe, *in vitro*, des différences de comportement des macrophages de divers animaux vis-à-vis des toxoplasmes (117). En particulier les macrophages du rat, hôte résistant, détruisent plus rapidement les toxoplasmes que ceux de la souris, hôte sensible. Ce fait, en lui seul, peut expliquer la différence d'adaptation du toxoplasme pour les deux hôtes cités.

A cela, nous devons ajouter qu'il existe une grande différence également dans la multiplication des macrophages péritonéaux qui est importante chez le rat, alors qu'elle est faible chez la souris et suivie d'une diminution sensible du nombre de ces cellules par la suite.

Cette différence semble être un point essentiel des relations hôte-parasite. Il serait alors possible de penser que l'H.S.R., si elle se développe de façon concomitante à la résistance cellulaire à l'infection, ne représente cependant pas totalement cette résistance puisque l'hôte sensible développe une H.S.R. comparable à l'hôte résistant. Cette hypothèse doit cependant être tempérée par 2 ordres de faits :

1*) L'infection continue à se développer chez la souris et nous avons envisagé les causes possibles de la disparition des macrophages (lyse, réaction d'H.S.R. *in vivo*, migrations).

2*) Le modèle est entièrement basé sur la souris et nous connaissons l'effet de l'adaptation à un hôte pour *Listeria* (63).

Il est néanmoins possible d'envisager que la différence réside dans une multiplication plus grande des macrophages chez l'hôte résistant et que ces macrophages ont également une capacité de destruction supérieure

à ceux d'un hôte sensible. Ceci est vrai pour les micro-organismes, mais pour les organismes pluricellulaires ce phénomène semble également réel : c'est ainsi que pour *Schistosoma mansoni* (116), trématode parasite intravasculaire, l'augmentation du nombre de macrophages est non significative chez le hamster (hôte sensible), significative après la ponte des oeufs chez la souris (hôte partiellement sensible) et très rapidement significative chez le rat (hôte résistant). Les capacités de digestion des macrophages restent dans ce cas plus difficilement envisageables.

Il nous semble bien en définitive, que l'hypersensibilité est un bon témoin de la résistance cellulaire à l'infection et qu'elle peut être également en relation avec le degré d'adaptation du parasite à un hôte considéré.

CONCLUSIONS ET PRESPECTIVES.

Nous résumerons l'ensemble des résultats en envisageant le rôle des différents facteurs de la réaction immunologique et leur relation avec l'adaptation parasitaire.

I.- ROLE DES DIFFERENTS FACTEURS.

Il nous semble bien que l'immunité cellulaire joue un rôle prépondérant dans l'immunité anti-toxoplasmique. Il ne faut cependant pas négliger le rôle de l'immunité humorale qui peut compléter les effets de la résistance cellulaire.

A.- IMMUNITE CELLULAIRE.

Nous avons pu montrer que la prémunition était effective dès le 10^{ème} jour de l'inoculation. Ce jour correspond à la phase de multiplication des toxoplasmes. Différentes preuves indiquent que cette immunité correspond bien à la résistance cellulaire décrite par MACKANESS et coll. dans des modèles bactériens :

- la résistance est concomitante à l'H.S.R. qui ne se développe également qu'après la phase de multiplication des toxoplasmes.

- cette immunité est accompagnée d'une hyperplasie de la rate et du foie qui correspond, semble-t-il, à l'augmentation du nombre de lymphocytes et de macrophages dénombrés dans la cavité péritonéale.

- la résistance est accompagnée d'une diminution sensible du nombre de toxoplasmes que l'on peut récolter par lavage péritonéal.

- l'immunité s'est avérée partiellement transférable par les cellules. Les cellules s'avèrent plus efficaces que le sérum dans ces transferts.

SCHEMA DES REACTIONS IMMUNOLOGIQUES DE L'HOTE

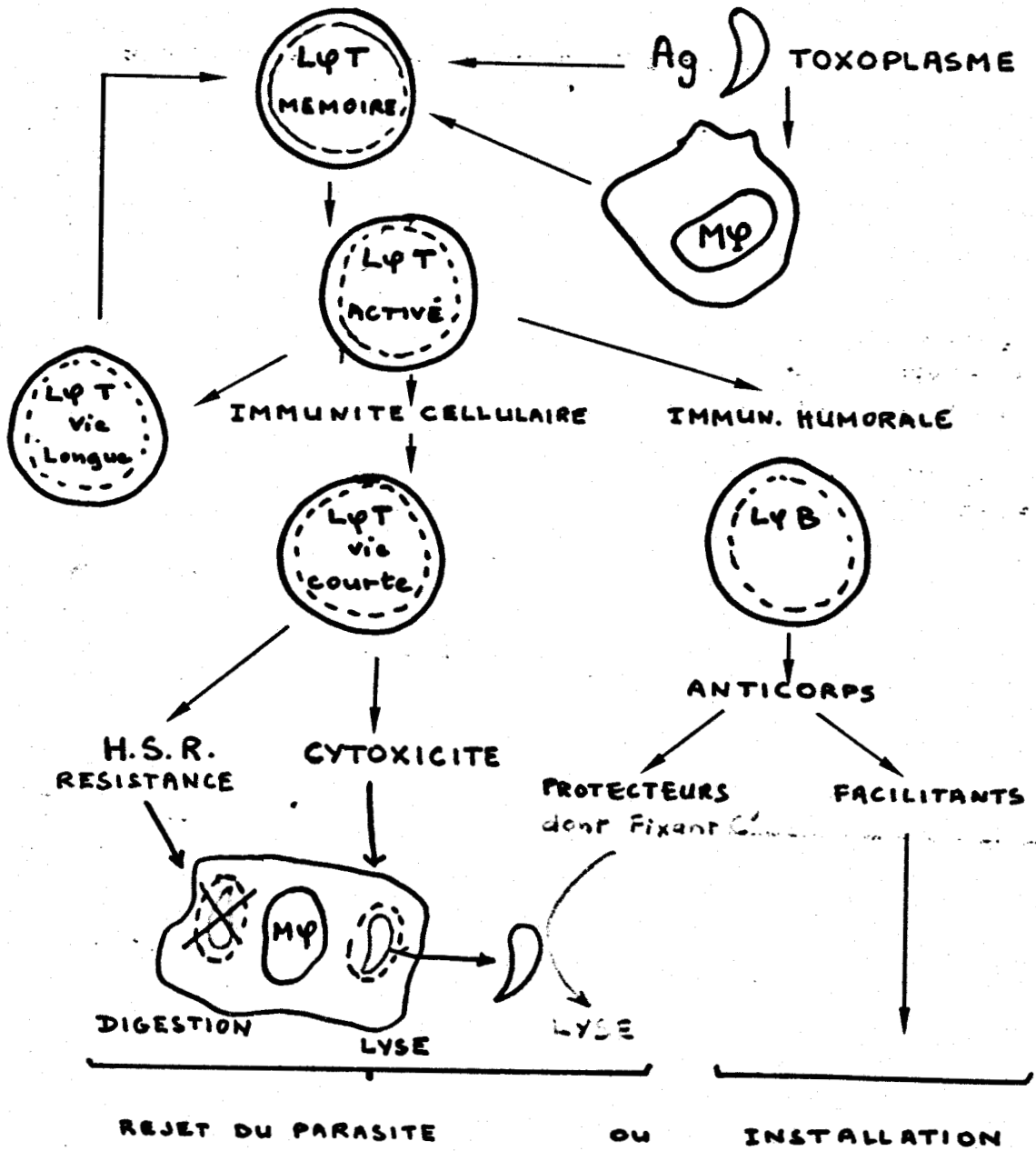


FIGURE 16

Lφ T = LYMPHOCYTE THYMO.DEPENDANT
 Lφ B = " " NON " "
 Mφ = MACROPHAGE
 Ag = ANTIGENE
 C' = COMPLEMENT

B.- IMMUNITE HUMORALE.

L'inefficacité partielle des anticorps est due au fait que le toxoplasme est un parasite intracellulaire. Les anticorps sont cependant très actifs sur les toxoplasmes libres et peuvent ainsi limiter leur dissémination.

Il est également possible d'envisager une coopération entre les 2 types de défense comme cela a pu être mis en évidence dans la Leishmaniose cutanée du cobaye à *L. enriettii* (12) :

Dans ce modèle, les lymphocytes sensibilisés détruisent les macrophages parasités. Si tel peut être le cas dans la Toxoplasmose, les anticorps peuvent alors agir sur les organismes ainsi libérés. Le phénomène doit être cependant très rapide car le toxoplasme pénètre très vite dans les cellules de l'hôte.

L'ensemble de ces faits nous permet d'envisager un schéma des phénomènes immunologiques. Différentes voies de résistance sont possibles : l'efficacité de chacune d'entre-elles peut être variable selon le modèle et l'hôte considérés (figure 16).

Ces considérations nous amènent tout naturellement à envisager également le rôle de l'adaptation parasitaire.

II.- ADAPTATION PARASITAIRE.

En comparant les résultats obtenus chez la souris et le rat, nous avons pu mettre en évidence la liaison qui existe entre l'H.S.R., l'immunité et la résistance spécifique de l'hôte.

A.- IMMUNITE CHEZ LA SOURIS.

De nombreux auteurs ont décrit les réactions immunologiques de différentes lignées de souris isogéniques à divers antigènes. Ces aspects étaient le plus souvent liés à la détection des anticorps (91), et parfois à celle de l'activité phagocytaire (107).

SHINZATO (103) a pu montrer que des lignées consanguines de souris répondaient de façons différentes à l'infection toxoplasmique et nous avons confirmé ses résultats.

SCHEMA DE L'EQUILIBRE HOTE-PARASITE

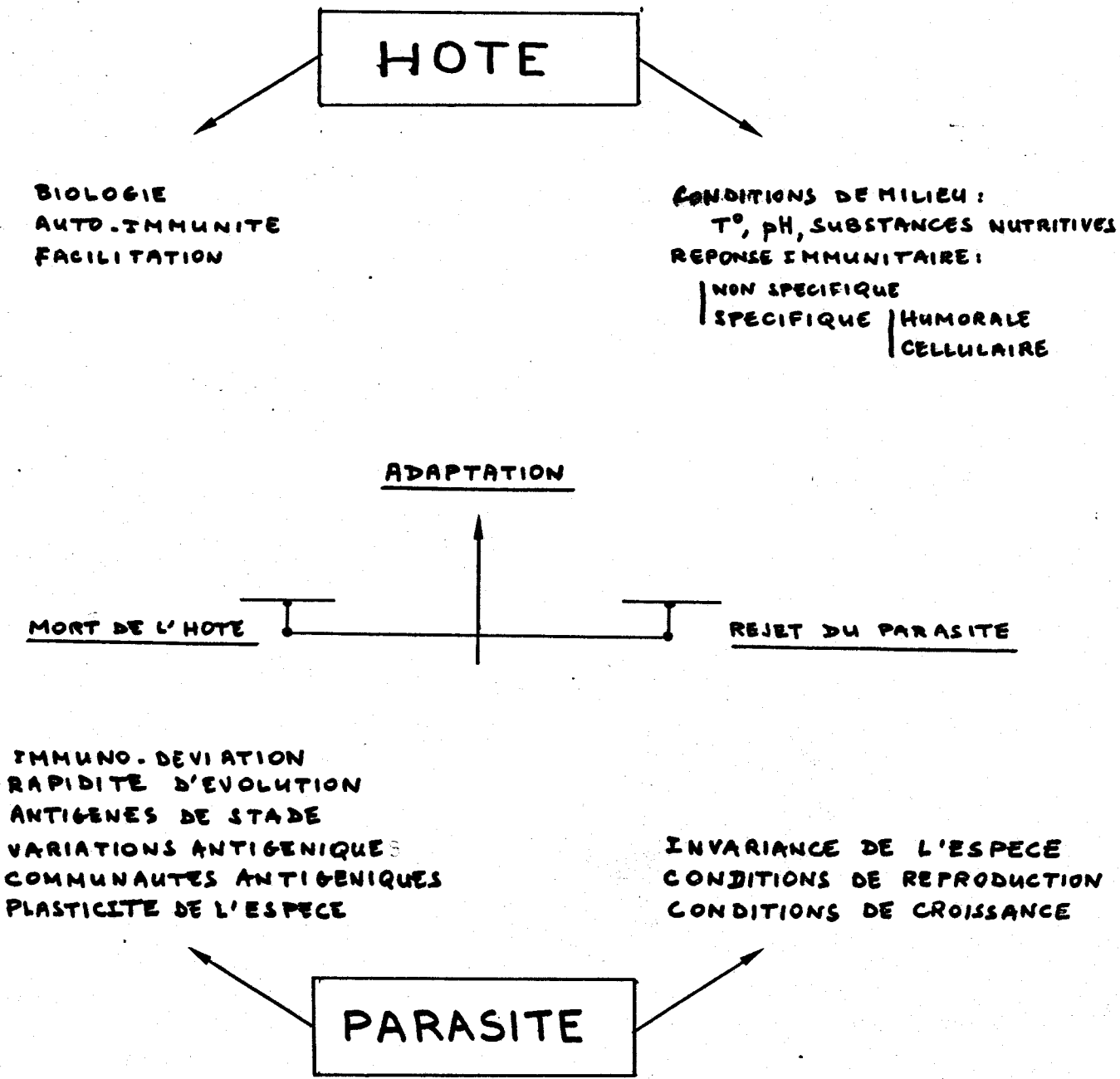


FIGURE 17



La capacité de défense moindre de la souris semble liée à une moins grande résistance à l'infection de ses macrophages, mais nous avons noté qu'il fallait peut-être tenir compte de l'adaptation des souches entretenues sur cet animal.

B.- IMMUNITE CHEZ LE RAT.

Comparativement à la souris, le rat s'avère être un hôte résistant même à la souche RH. Cette défense semble liée à une multiplication importante du nombre de ses macrophages qui, par ailleurs, ont des facultés de résistance à l'infection plus importantes.

Cette résistance spécifique représente-t-elle une immunité naturelle ou bien correspond-elle à une réponse immunologique active plus importante et plus rapide ?

Ces problèmes nous amènent à envisager également un schéma de l'adaptation parasitaire. Nous ne justifierons cependant pas tous les facteurs qui peuvent prendre part à l'équilibre hôte-parasite. La figure 17 tient compte de l'ensemble des résultats du laboratoire et de la littérature.

III.- PERSPECTIVES.

Nous essayons pour notre part, d'envisager le rôle de l'immunité cellulaire.

Or, pour que le parasite s'installe chez son hôte, il est nécessaire que cette immunité, tout comme l'immunité humorale, ne présente qu'une efficacité relative.

L'étude des phénomènes immunologiques offre ainsi deux intérêts :

1°) Le premier est de mettre en évidence les relations qui peuvent exister avec l'adaptation parasitaire et d'envisager par quels mécanismes le parasite peut endiguer la réaction immunitaire.

2°) Le second est d'essayer de favoriser tel ou tel type de réponse immunologique en vue d'obtenir une protection efficace. Il faut alors tenir compte de l'aspect dynamique de la réponse ainsi que des phénomènes d'adaptation parasitaire. Si nous pouvons savoir comment réagit un hôte résistant, c'est ce type de réaction qu'il faut essayer d'induire chez l'hôte sensible.

En précisant encore le modèle expérimental, en tenant compte des remarques formulées au cours de la discussion, il doit être possible d'obtenir une protection réelle contre la Toxoplasmose et en particulier sa forme congénitale qui représente son aspect le plus nocif.

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) AFCHAIN (D.) -1970.- Analyse immunoélectrophorétique des antigènes solubles de *Trypanosoma cruzi*.
Thèse 3ème Cycle, Fac. Sci. LILLE.
- (2) AKAO (S.) -1971.- *Toxoplasma gondii* : Aspartate aminotransférase in cell membrane.
Exp. Parasitol., 29, 26.
- (3) APARICIO-GARRIDO (J.), DE LA FUENTE-CRESPO (M.), SALINAS (V.M.) -1968.- Contribucion al estudio de los acidos nucleicos del *Toxoplasma gondii* con ayuda de la microscopia de fluorescencia.
Revta Diagn. Biol., 17, n° 4-5, 191-204.
- (4) ASHERSON (G.L.) -1968.- The role of micro-organisms in auto-immune responses.
Progress in Allergy, 12, 192-245.
- (5) BEATTIE (C.P.) -1963.- Immunity to *Toxoplasma*.
Immunity to Protozoa, Blackwell Sci. Publ. Oxford, p. 253.
- (6) BETZ (A.) -1968.- Diagnostic sérologique de la Toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires.
Bull. O.M.S. (W.H.O.), 39, 367-374.
- (7) BEVERLEY (J.K.A.) -1958.- A rational approach to the treatment of toxoplasmic uveitis.
Trans. Ophth. Soc., 78, 109-121.
- (8) BIGUET (J.), DEBLOCK (S.) -1971.- Morphologie et Biologie des toxoplasmes.
Rev. Med., 8, 413-420.
- (9) BLANDEN (R.V.), MACKANESS (G.B.), COLLINS (F.M.) -1966.- Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid.
J. Exp. Med., 124, 585-600.
- (10) BLANDEN (R.V.) -1968.- Modifications of Macrophages functions.
J. Reticuloendoth. Soc., 5, 179.
- (11) BOSMAN (C.), FELDMAN (J.D.) -1970.- Composition, morphology and source of cells in delayed skin reactions.
Amer. J. Pathol., 58, 201-218.

- (12) BRYCESON (A.D.M.), BRAY (R.S.), WOLSTENCROFT (R.A.), DUMONDE (D.C.) - 1970.- Immunity in cutaneous Leishmaniasis of the Guinea-pig. Clin. Exp. Immunol., 7, 301-341.
- (13) BRZOSKO (W.J.), DYMOWSKA (Z.), URBANEK-SZUFNARA (K.) -1970.- Immunomorphologia elektronoskopowa *Toxoplasma gondii*. Med. Dosw. Mikrobiol. Polska, 22, 277-289.
- (14) CAPELLA (J.A.), KAUFMAN (H.E.) -1964.- Enzymatic histochemistry of *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 13, 664-666.
- (15) CAPRON (A.), BIGUET (J.), VERNES (A.), AFCHAIN (D.) -1968.- Structure antigénique des Helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Path. Biol., 16, n° 3-4, 121-138.
- (16) CEROTTINI (J.Ch.), UNANUE (E.R.) -1971.- Genetic control of the immune response of mice to hemocyanin. I. The role of macrophages. J. Immunol., 106, 732.
- (17) CHERNIN (E.), WELLER (T.H.) -1954.- Serial propagation of *Toxoplasma gondii* in roller tube cultures of mouse and human tissues. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 85, 68.
- (18) CHORDI (A.), WALLS (K.), KAGAN (I.G.) -1964.- Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by agar diffusion methods. J. Immunol., 93, 1034-1044.
- (19) COE (J.E.), FELDMAN (J.D.), LEE (S.) -1966.- Immunologic competence of thoracic duct cells. I. Delayed hypersensitivity. J. Exp. Med., 123, 207.
- (20) DAVID (J.R.), AL ASKARI (S.), LAWRENCE (H.S.), THOMAS (L.) -1964.- Delayed hypersensitivity *in vitro*. I. The specificity of inhibitional cell migration by antigens. J. Immunol., 93, 264-273.
- (21) DAVID (J.R.) -1968.- Macrophage migration. Fed. Proc., 27, 6.

- (22) DEKARIS (D.), FAUVE (R.M.), RAYNAUD (M.) -1969.- Delayed hypersensitivity and inhibition of macrophage spreading : *in vivo* and *in vitro* studies of tuberculin and streptococcal hypersensitivities in Guinea-pigs.
J. Immunol., 103, n° 1, 1.
- (23) DEKARIS (D.), FAUVE (R.M.), ALOUF (J.E.), RAYNAUD (M.) -1969.- L'hypersensibilité streptococcique expérimentale chez le cobaye.
Ann. Inst. Pasteur, 116, n° 5, 602.
- (24) DEKARIS (D.), SMERDEL (S.), VESELIC (B.) -1971.- Inhibition of macrophage spreading by supernatants of antigen-stimulated lymphocytes.
Europ. J. Immunol., 1, 404-405.
- (25) DINEEN (J.K.) -1964.- Sources of Immunological variation.
Nature, 202, 101.
- (26) DUMAS (N.) -1970;- La respiration des Toxoplasmes étudiée par l'oxygraphe G.M.E. Etude préliminaire.
Bull. Soc. Path. Exot., 63, 208.
- (27) DYMOWSKA (Z.), ALEKSANDROWICZ (J.) -1962.- Badanie elektro i immunoelektroforetyczne nad anty-genami szczepow *Toxoplazmowych* czese. II. Analiza wlasiwosci surowic krolikow wodjarnianych szejew.
Med. Doswiak. i Mikrobiol., 14, 159-166.
- (28) EYLES (D.E.), COLEMAN (N.) -1956.- Relationship of size of inoculum to time to death in mice infected with *Toxoplasma gondii*.
J. Parasitol., 42, 272.
- (29) FAUVE (R.M.) -1964.- Résistance cellulaire à l'infection. II. Comportement des macrophages de souris entretenus, *in vitro*, dans un milieu sans sérum en présence de *S. typhimurium* d'inégale virulence.
Ann. Inst. Pasteur, 107, 472.
- (30) FAUVE (R.M.), DELAUNAY (A.) -1967.- Résistance cellulaire à l'infection bactérienne. VI. Influence exercée *in vitro* par l'injection de bactéries vivantes ou tuées sur le pouvoir bactéricide des macrophages à l'égard de *Listeria monocytogenes*.
Ann. Inst. Pasteur, 112, 458.

- (31) FAUVE (R.M.), DEKARIS (D.) -1968.- Macrophage spreading : inhibition in delayed hypersensitivity.
Science, 160, 795-796.
- (32) FELDMAN (H.A.) -1956.- The relationship of *Toxoplasma* antibody activator to the serum-properdin system.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 66, 263-267.
- (33) FLOC'H (F.) -1970.- Contribution à l'étude des phénomènes immunologiques dans la *Toxoplasmose* expérimentale.
D.E.A., Fac. Sci. LILLE.
- (34) FOSTER (B.G.), MAC CULLOCH (W.F.) -1968.- Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*.
Can. J. Microbiol., 14, n° 2, 103-110.
- (35) FRANCHI (P.), HAHN (E.E.A.) -1968.- *Toxoplasma gondii* in tissue culture and maintenance at low temperatures.
Zbl. Parasitenkunde, 30, 360-367.
- (36) FRANCOIS (J.) -1963.- La *Toxoplasmose* et ses manifestations oculaires.
MASSON Editeurs.
- (37a) FRENKEL (J.K.) -1952.- Effect of vaccination and sulfamide therapy on experimental *Toxoplasmosis*.
Fed. Proc., 11, 468-469.
- (37b) FRENKEL (J.K.) -1967.- Adoptive immunity to intracellular infection.
J. Immunol., 98, n° 6, 1309-1319.
- (38) FRENKEL (J.K.), DUBEY (J.P.), MILLER (N.L.) -1970.- *Toxoplasma gondii* in cats : fecal stages identified as coccidian oocysts.
Science, 167, n° 3919, 893.
- (39) FRESHAM (M.M.), MERIGAN (T.C.), REMINGTON (J.S.), BROWNLEE (I.E.) - 1966.- *In vivo* and *in vitro* antiviral action of an interferon-like substance induced by *Toxoplasma gondii*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123, n° 3, 862-866.
- (40) FUJITA (K.), KAMEI (K.), FUJITA (T.), SHIOIRI-NAKANO (K.), TSUNEMATJU (Y.) -1969.- Purification of *Toxoplasma* antigen for hemagglutination tests.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 18, n° 6 part 1, 892.
- (41) FULTON (J.D.), SPOONER (D.F.) -1960.- Metabolic studies on *Toxoplasma gondii*.
Exper. Parasitol., 9, 293-301.

- (42) HONIGBERG (B.M.), LIVINGSTON (M.C.) -1968.- Effects of native DNA and RNA from a virulent strain on pathogenicity of a mild strain of *Trichomonas gallinae*.
J. Protozool., 15 supp., 19.
- (43) HULDT (G.) -1966.- Experimental Toxoplasmosis. Studies of multiplication and spread of *Toxoplasma* in experimentally infected rabbits.
Acta path. Microb. Scand., 67, 401-423.
- (44) HULDT (G.) -1967.- *In vitro* studies of some immunological phenomena in experimental rabbit Toxoplasmosis.
Acta Path. Microb. Scand., 70, 129.
- (45) HUTCHISON (W.M.), DUNACHIE (J.F.), SIIM (J.Ch.), WORK (K.) -1970.- Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*.
Brit. Med., p. 142-144.
- (46) JACOBS (L.), JONES (F.E.), MELTON (M.L.) -1952.- The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media.
J. Parasitol., 38, 293-297.
- (47) KORTING (H.J.) -1958.- Immunoelktrophoretische Untersuchungen bei der Toxoplasmose.
Zbl. Bakt. Orig., 172, 621-629.
- (48) KOSTER (F.T.), MAC GREGOR (D.D.), MACKANESS (G.B.) -1971.- The mediator of cellular immunity. II. Migration of immunologically committed lymphocytes into inflammatory exsudate.
J. Exp. Med., 133, 400.
- (49) KOSTER (F.T.), MAC GREGOR (D.D.) -1971.- The mediator of cellular immunity. III. Lymphocyte traffic from the blood into the inflamed peritoneal cavity.
J. Exp. Med., 133, 864.
- (50) KRAHENBUHL (J.L.), RUSKIN (J.), REMINGTON (J.S.) -1972.- The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite : *Toxoplasma gondii*.
J. Immunol., 108, 425.
- (51) KULASARI (C.), DASGUPTA (B.) -1959.- A cytochemical investigation of the SABIN-FELDMAN phenomenon in *Toxoplasma gondii* and an explanation of its mechanism on this basis.
Parasitology, 49, 586-593.

- (52) LAUGIER (M.), QUILICI (M.) -1970.- Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour le souris.
Ann. Parasitol. Hum. Comp., 45, 389.
- (53) LAURELL (C.B.) -1965.- Antigen-antibody crossed electrophoresis.
Ann. Biochem., 10, 358-361.
- (54) LEVATIDI (C.), SANCHIS-BAYARRI (V.), LEPINE (P.), SCHOEN (R.) -1929.- Etude sur l'encéphalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma curiculi*.
Ann. Inst. Pasteur, 43, 1063.
- (55) LUBAROFF (D.M.), WAKSMAN (B.H.) -1968.- Bone marrow as source of cells in reaction of cellular hypersensitivity. I. Passive transfer of tuberculin sensitivity in syngeneic systems.
J. Exp. Med., 128, 1425-1435.
- (56) LUND (E.), LYCKE (E.), HAHN (E.) -1960.- Stability of *Toxoplasma gondii* in liquid media.
Acta Path. Microb. Scand., 48, 99-104.
- (57) LUNDE (M.N.), JACOBS (L.) -1964.- Properties of *Toxoplasma* lysates toxic to rabbits on intravenous injection.
J. Parasitol., 50, 49-51.
- (58) LYCKE (E.), LUND (E.), STRANNEGARD (O), FALSEN (E.) -1965.- The effect of immune serum and activator on the infectivity of *Toxoplasma gondii* for cell culture.
Acta Path. Microb. Scand., 63, 206-220.
- (59) LYCKE (E.), LUND (E.), STRANNEGARD (O) -1965.- Enhancement by lysozyme and hyaluronidase of the penetration by *Toxoplasma gondii* into cultured host cells.
Brit. J. Exp. Path., 46, 189-199.
- (60) MAC GREGOR (D.D.), KOSTER (F.T.), MACKANESS (G.B.) -1970.- The short lived small lymphocyte as a mediator of cellular immunity.
Nature, 228, 855.
- (61) MAC GREGOR (D.D.), KOSTER (F.T.), MACKANESS (G.B.) -1971.- The mediator of cellular immunity. I. The life-span and circulation dynamics of the immunologically committed lymphocyte.
J. Exp. Med., 133, n° 2, 389.

- (62) MAC GREGOR (D.D.), KOSTER (F.T.) -1972.- The mediator of cellular immunity. IV. Cooperation between lymphocytes and mononuclear phagocytes.
J. Exp. Med., sous presse.
- (63) MACKANESS (G.B.) -1962.- Cellular resistance to infection.
J. Exp. Med., 116, 381-406.
- (64) MACKANESS (G.B.) -1964.- The immunological basis of acquired cellular resistance, *Listeria monocytogenes*, *Brucella abortus*.
J. Exp. Med., 120, 105-120.
- (65) MACKANESS (G.B.) -1967.- The relationship of delayed hypersensitivity to acquired cellular resistance.
Brit. Med. Bull., 23, 52-54.
- (66) MACKANESS (G.B.) -1969.- The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*.
J. Exp. Med., 129, 973-992.
- (67a) MACKANESS (G.B.) -1970.- Cellular immunology in "Monocytes and Macrophages".
Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- (67b) MACKANESS (G.B.) -1970.- The monocyte in cellular immunity.
Seminars Hematol., 7, 172.
- (68) MACKANESS (G.B.) -1971.- Cellular immunity.
Ann. Inst. Pasteur, 120, 428-437.
- (69) MACKANESS (G.B.) -1971.- Resistance to intracellular infection.
J. Infect. Dis., 123, 439.
- (70) MACKANESS (G.B.), BLANDEN (R.V.) -1967.- Cellular immunity.
Progr. Allergy, 11, 89.
- (71) MACKANESS (G.B.), HILL (W.C.) -1969.- The effect of antilymphocyte globulin on cell-mediated resistance to infection.
J. Exp. Med., 129, 993-1012.
- (72) MATSUBAYASHI (H.), AKAO (S.) -1966.- Immuno-electron microscopic studies on *Toxoplasma gondii*.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 15, 486-491.

- (73) METCHNIKOFF (E.) -1905.- Resistance to infective diseases.
Cambridge Univ. Press, England, p. 558.
- (74) NAKABAYASHI (T.), MOTOMURA (I.) -1968.- A method for separating cyst of *Toxoplasma* from infected mouse brain.
Trop. Med., 10, n° 2, 72-80.
- (75) NAKAYAMA (I.) -1964.- Persistence of the virulence RH strain of *Toxoplasma gondii* in the brains of immune mice.
Keio J. Med., Tokyo, 13, n° 1, 7-12.
- (76) NEIMARK (H., BLAKER (R.G.) -1967.- DNA base composition of *Toxoplasma gondii* grown *in vitro*.
Nature, 216, 600.
- (77) NELSON (D.S.), BOYDEN (S.V.) -1963.- The loss of macrophages from peritoneal exsudates following the injection of antigens into guinea-pigs with delayed hypersensitivity.
Immunol., 6, 264-275.
- (78) NICOLLE (C.), MANCEAUX (L.) -1909.- Sur un protozoaire nouveau du gondi : *Toxoplasma*.
Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 2, 97-103.
- (79) NOORBY (R.) -1970.- Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*.
Infect. Immunity, 2, n° 3, 250.
- (80) NORTH (R.J.) -1969.- Cellular kinetics associated with development of acquired cellular resistance.
J. Exp. Med., 130, 299-314.
- (81) NORTH (R.J.) -1970.- The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infection.
J. Exp. Med., 132, 521-534.
- (82) NORTH (R.J.) -1970.- Suppression of cell-mediated immunity by an anti-mitotic drug : further evidence that migrant macrophages express immunity.
J. Exp. Med., 132, 535-545.
- (83) NOZIK (R.A.), O'CONNOR (G.R.) -1969.- The so-called toxin of *Toxoplasma*.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 18, n° 4, 511.

- (84) OKA (Y.), ITO (Y.), FURUYA (M.), OKUGI (M.), OSAKI (H.) -1969.- Acquisition of specific resistance to *Toxoplasma* reinfection in mice.
Jap. J. Parasitol., 18, n° 3, 226-231.
- (85) O.M.S. -1969.- La Toxoplasmose.
O.M.S. série des Rapports techniques, n° 431.
- (86) OVERDULVE (J.P.) -1970.- The identity of *Toxoplasma* (NICOLLE et MANCEAUX, 1909) with *Isospora* (SCHNEIDER, 1881).
Proc. K. Ned. Akad. Wet., (série C.), 73, n° 1, 129-151.
- (87) PANDE (P.G.), SHUKLA (R.R.), SEKARIAH (P.C.) -1961.- A heteroglycan from *Toxoplasma gondii*.
Nature, 190, 644-645.
- (88) PAUL (J.) -1965.- Cell and tissue culture.
Livingston Ltd, 3ème Edition.
- (89) PETERSEN (E.K.) -1970.- Isolation of toxotoxin as a large molecule or particle by a method called "ice filtration".
Acta Path. Microb. Scand., 78, 669.
- (90) PETERSEN (E.K.) -1971.- An explanation of the biological action of toxotoxin based on some *in vitro* experiments.
Acta Path. Microb. Scand. (B.), 79, 33.
- (91) PLAYFAIR (J.H.L.) -1968.- Strain differences in the immune response of mice. I. The neonatal response to sheep red cells.
Immunol., 15, 35.
- (92) REMINGTON (J.S.), MERIGAN (T.C.) -1968.- Interferon : protection of cells infected with an intracellular protozoan (*Toxoplasma gondii*).
Sic. U.S.A., 161, n° 3843, 804-806.
- (93) REMINGTON (J.S.), BLOOMFIELD (M.M.), RUSSEL (E.), ROBINSON (W.S.) - 1970.- The RNA of *Toxoplasma gondii*.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133, 623-626.
- (94) REMINGTON (J.S.) -1970.- Toxoplasmosis : recent developments.
Annual Rev. Med., 21, 201-218.

- (95) RUCHMAN (I.), FOWLER (J.C.) -1951.- Localization and persistence of *Toxoplasma* in tissues of experimentally infected white rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 76, 793-796.
- (96) RUSKIN (J.), REMINGTON (J.S.) -1968.- Immunity and intracellular infection : resistance to bacteria in mice infected with a protozoan. Science, 160, 72.
- (97) RUSKIN (J.), MAC INTOSH (J.), REMINGTON (J.S.) -1969.- Studies on the mechanisms of resistance to phylogenetically diverse intracellular organisms. J. Immunol., 103, 252.
- (98) RYTEL (M.W.), JONES (T.C.) -1966.- Induction of interferon in mice infected with *Toxoplasma gondii*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123, n° 3, 859-862.
- (99) SABIN (A.B.), FELDMAN (H.A.) -1948.- Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). Science, 108, 660-663.
- (100) SENAUD (J.) -1972.- Le cycle de développement des toxoplasmes : *Toxoplasma gondii* (NICOLLE et MANCEAUX, 1908). Bull. Inst. Pasteur, 70, 3-27.
- (101) SHEAGREN (J.N.), MONACO (A.P.) -1969.- Protective effect of antilymphocyte serum on mice infected with *Plasmodium berghei*. Science, 164, n° 3886, 1423-1425.
- (102) SHEFFIELD (H.G.), MELTON (M.L.) -1968.- The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 54, 209.
- (103) SHINZATO (J.) -1968.- Immunological study on *Toxoplasma*. Pathogenicity and protective immunity of Beverley strain in different mouse strain. Jap. J. Parasit., 17, n° 5, 429.
- (104) STAHL (W.), AKAO (S.) -1964.- Immunity in experimental Toxoplasmosis. Keio J. Med., Tokyo, 13, n° 1, 1-6.

- (105) STAHL (W.), MATSUBAYASHI (H.), AKAO (S.) -1966.- Experimental Toxoplasmosis. Effects of suppression on the immune response of mice by cortisone and splenectomy.
Keio J. Med., Tokyo, 15, n° 1, 1-12.
- (106) STAIB (F.), SEELIGER (H.P.R.), CURA (J.) -1966.- Preliminary investigations on the formation of antibodies sensitive and resistant to 2 Mercaptoethanol in experimental Toxoplasmosis.
Ztschr. Med. Mikrob. Immunol., 153, n° 1, 20-30.
- (107) STIFFEL (C.), MOUTON (D.), BOUTHILLIER (Y.), DECREUSEFOND (G.), BIOZZI (G.) -1970.- Réponse du SRE au BCG et *Corynebacterium parvum* chez des souris de différentes lignées.
J. Reticuloendoth. Soc., 7, 280.
- (108) STRANNEGARD (O.) -1967.- I. The formation of Toxoplasma antibodies in rabbits.
Acta Path. Microb. Scand., 71, n° 3, 439.
- (109) STRANNEGARD (O.) -1967.- II. Kinetics of *in vitro* immuno-inactivation of Toxoplasma.
Acta Path. Microb. Scand., 71, 450.
- (110) STRANNEGARD (O.) -1967.- III. An electron microscopy study on immuno-inactivation.
Acta Path. Microb. Scand., 71, 463.
- (111) SUGGS (M.), WALLS (K.W.), KAGAN (I.G.) -1968.- Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamenis* and five *Toxoplasma gondii* isolates.
J. Immunol., 101, n° 1, 166.
- (112) TONJUM (A.M.) -1962.- Soluble antigens produced by *Toxoplasma gondii*.
Acta Path. Microb. Scand., 54, 96-98.
- (113) TREMONTI (L.), WALTON (B.C.) -1970.- Blast transformation and migratio inhibition in Toxoplasmosis and Leishmaniasis.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 19, 49.
- (114) TRIPATHY (S.P.), MACKANESS (G.B.) -1969.- The effect of cytotoxic agents on the passive transfer of cell-mediated immunity.
J. Exp. Med., 130, 17-30.

- (115) VAZ (E.M.), VAZ (N.M.), LEVINE (B.B.) -1971.- Persistent formation of reagins in mice injected with low doses of ovalbumin.
Immunol., 21, 11.
- (116) VERNES (A.), BIGUET (J.), FLOCH (F.) -1972.- L'hypersensibilité retardée au cours de la Bilharziose expérimentale à *Schistosoma mansoni*. II. Etude *in vitro* chez le rat et le hamster doré. Comparaison avec la souris et résultats en fonction de l'adaptation parasitaire.
Ann. Inst. Pasteur, 123, sous presse.
- (117) VISCHER (W.A.), SUTER (E.) -1954.- Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult mammalian macrophages cultivated *in vitro*.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 86, 413-419.
- (118) VIVIER (E.) -1970.- Observations nouvelles sur la reproduction asexuée de *Toxoplasma gondii* et considérations sur la notion d'endogénèse.
C.R. Acad. Sci., 271, 2123-2126.
- (119) VIVIER (E.) -1970.- Criteria of fine structure to be considered for taxonomy of sporozoa.
J. Parasitol., 56, 354.
- (120) VIVIER (E.), PETITPREZ (A.) -1969.- Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus - fils chez *Toxoplasma gondii*.
J. Cell Biol., 43, n° 2, 329-342.
- (121) WATTRE (P.), BRULE (R.), CAPRON (A.), SAMAILLE (J.), FRUIT (J.) -1969.- Analyse antigénique de *Toxoplasma gondii* et diagnostic immunologique de la Toxoplasmose.
Ann. Inst. Pasteur, LILLE, 20, 167-182.
- (122) WIENMAN (D.) -1943.- Chronic Toxoplasmosis.
J. Infect. Dis., 73, 86-92.
- (123) WORK (K.), HUTCHINSON (W.M.) -1969.- The new cyst of *Toxoplasma gondii*
Acta Path. Microb. Scand., 77, 414.
- (124) YOELI (M.), UPMANIS (R.S.), MOST (H.) -1969.- Drug resistance transfer among rodent plasmodia. I. Acquisition of resistance to pyrimethamine by a drug-sensitive strain of *Plasmodium berghei* in the course of concomitant development with pyrimethamine-resistant *P. vinckei* strain.
Parasitol., 59, 429.