

50376
1984
78

50376
4984
78

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre 1139

THESE

Présentée à l'Université de Lille

Pour l'obtention du titre de Docteur de 3ème cycle en Biochimie

par

Celeste RODRIGUEZ-QUEVEDO

Contribution à l'étude des antigènes de
surface des tachyzoïtes de Toxoplasma gondii

Présentée le 3 février 1984 devant la Commission d'examen



Président : Mr J. MONTREUIL

Examineurs : Mr A. CAPRON

Melle G. SPIK

Mr J.F. DUBREMETZ

Rapporteur : Mr D. AFCHAIN

Ce travail a été réalisé dans le Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur de LILLE, sous la direction éclairée de Monsieur le Professeur A. CAPRON.

Monsieur A. CAPRON,

Monsieur J. MONTREUIL,

Melle G. SPIK

Je suis très honorée de votre présence dans ce jury et je vous prie de croire à mes sentiments les plus respectueux.

Monsieur D. AFCHAIN, Docteur es-Sciences,

Monsieur J.F. DUBREMETZ, Docteur es-Sciences,

Vous avez eu la patience de me faire partager vos connaissances et je voudrais que vous trouviez ici le témoignage de mon admiration et de ma gratitude.

Je tiens à remercier également,

Mme C. DISSOUS qui par son excellente compétence professionnelle et par ses grandes qualités humaines a apporté une aide inestimable à la réalisation du présent travail.

Mme C. VENDEVILLE et Mrs M. LOYENS, G. OVLAQUE envers lesquels j'ai une vive reconnaissance pour leur aide très efficace et amicale.

Mr Y. CARLIER qui m'a formé à l'immunologie ; qu'il trouve ici un témoignage de mon amitié.

Mme M.F. MASSARD qui a collaboré à la mise en page du présent travail.

Que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	1
Introduction.....	3
<u>CHAPITRE I</u> - Le Toxoplasme et la toxoplasmose.....	4
1.1. Historique.....	5
1.2. Morphologie de la forme proliférative du <u>Toxoplasma</u> (tachyzoïte).....	6
1.3. Cycle évolutif.....	6
1.3.1. Cycle sexué chez un félide hôte définitif.....	6
1.3.2. Cycle asexué chez l'hôte intermédiaire.....	7
1.4. La toxoplasmose.....	8
1.5. Réponse humorale.....	10
<u>CHAPITRE II</u> - Hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux.....	13
2.1. Définition.....	14
2.2. Historique.....	14
2.2.1. Sélection des hybrides.....	15
2.2.2. Agents fusogènes.....	16
2.2.3. Mécanisme de fusion cellulaire.....	16
2.2.4. Stabilité des hybrides.....	17
2.3. Application de la technique de fusion cellulaire : les anticorps monoclonaux.....	17
2.4. Les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux...	19
2.5. Applications en parasitologie.....	22
2.5.1. Caractérisation et purification d'antigènes parasitaires à l'aide d'anticorps monoclonaux.	24
2.6. Utilisation des anticorps monoclonaux en parasitologie.....	25

Table des matières (suite)

<u>CHAPITRE III</u> - Matériel et Méthodes.....	27
3.1. Animaux.....	28
3.2. Obtention et entretien des parasites.....	28
3.2.1. Isolement à partir de l'ascite.....	28
3.2.2. Isolement à partir de cellules en culture.....	29
3.3. Préparations de l'extrait antigénique soluble.....	29
3.4. Protocole d'infection.....	30
3.5. Hybridation cellulaire. Conditions de culture.....	30
3.5.1. Utilisation de cellules nourricières.....	31
3.5.2. Lignée cellulaire myélomateuse.....	31
3.5.3. Cellules immunes.....	32
3.5.4. La fusion cellulaire.....	32
3.5.4.1. Agent de fusion.....	32
3.5.4.2. Protocole de fusion.....	33
3.5.5. Sélection des hybrides.....	33
3.5.6. Clonage cellulaire.....	33
3.6. Identification des hybrides producteurs d'anticorps anti- <u>T. gondii</u>	34
3.6.1. Immunofluorescence indirecte (I.F.I.).....	34
3.6.2. Technique immunoenzymatique : Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.).....	36
3.7. Production massive d'anticorps monoclonaux.....	38
3.8. Activité biologique <u>in vitro</u> des anticorps monoclonaux.....	39
3.9. Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	40

3.10. Purification des anticorps monoclonaux.....	41
3.10.1. Purification d'immunoglobulines de la classe IgG.....	41
3.10.2. Purification d'immunoglobulines de la classe IgM.....	43
3.11. Marquage des anticorps monoclonaux.....	43
3.12. Caractérisation des antigènes cibles.....	45
3.12.1. Marquage de protéines de surface.....	45
3.12.2. Marquage de protéines natives.....	46
3.12.2.1. Marquage extra-cellulaire.....	46
3.12.2.2. Marquage intra-cellulaire.....	47
3.12.3. Immunoprécipitation.....	47
3.12.4. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-SDS.....	48
3.12.5. Technique d'immunoélectrotransfert.....	50
3.12.6. Détection immunoenzymatique en microscopie électronique.....	52
3.13. Test de compétition en SRIA.....	53
<u>Annexe</u>	55
<u>CHAPITRE IV</u> - Résultats et Discussion.....	61
4.1. Production d'anticorps monoclonaux anti- <u>T.gondii</u>	62
4.1.1. Infection.....	62
4.1.2. Hybridation.....	62
4.1.2.1. Première hybridation.....	63
4.1.2.2. Deuxième hybridation.....	63
4.1.2.3. Troisième hybridation.....	65
4.1.3. Caractérisation et purification des anticorps monoclonaux.....	65
4.1.4. Activité biologique <u>in vitro</u> des anticorps monoclonaux.....	67
4.1.5. Discussion.....	67

Table des matières (suite)

4.2. Détection et caractérisation des antigènes de tachyzoïtes par les anticorps monoclonaux produits...	71
4.2.1. Immunoprécipitation.....	71
4.2.1.1. Identification d'antigènes de surface	71
4.2.1.2. Marquage métabolique.....	73
4.2.2. Immunoélectrotransfert.....	75
4.2.3. Discussion.....	75
4.2.3.1. Marquage des protéines de surface....	75
4.2.3.2. Marquage des protéines cytoplasmiques	77
4.2.3.3. Immunoélectrotransfert.....	77
4.3. Utilisation de l'anticorps monoclonaux à des fins fondamentales et appliquées.....	78
4.3.1. Distribution de l'antigène 30 Kd de surface...	78
4.3.2. Interaction anticorps-tachyzoïte vivant.....	78
4.3.3. Essai d'analyse de la biosynthèse de la molécule 30 Kd.....	79
4.3.4. Cinétique de l'apparition des anticorps sériques dans la toxoplasmose humaine et expérimentale de la souris.....	81
4.3.4.1. Réponse immunologique humorale chez la souris.....	81
4.3.4.1.1. Vis-à-vis d'antigènes membranaires.....	81
4.3.4.1.2. Vis-à-vis d'antigènes cytoplasmiques.....	82
4.3.4.2. Réponse immunologique humorale chez l'homme.....	82
4.3.4.2.1. Vis-à-vis des antigènes membranaires	82
4.3.4.2.2. Vis-à-vis des antigènes cytoplasmiques.....	84

Table des matières (suite)

4.3.4.3. Test de compétition en SRIA.....	85
4.3.4.3.1. Inhibition par les sérums humains.....	85
4.3.4.3.2. Inhibition par d'autres anticorps monoclonaux.....	86
<u>CHAPITRE V</u> - Discussion générale et Conclusion.....	90
5.1. Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux.	91
5.2. Utilisation de la sonde monoclonale anti-30 Kd.....	95
5.2.1. Immunodétection.....	95
5.2.1.1. Localisation de la molécule 30 Kd....	95
5.2.1.2. Interaction entre l'anticorps monoclonal et l'antigène de membrane destachyzoïtes vivants.....	96
5.2.1.3. Elimination de l'anticorps monoclonal anti-30 Kd pendant l'invasion.....	96
5.2.2. Biosynthèse de la molécule 30 Kd.....	98
5.2.3. Cinétique de la réponse immune humorale.....	99
5.2.3.1. Réponse immune humorale vis-à-vis des antigènes cytoplasmiques.....	99
5.2.3.2. Immunoréponse vis-à-vis des antigènes de surface.....	101
CONCLUSION.....	103
REFERENCES.....	I

RESUME

Des anticorps monoclonaux ont été produits à partir des cellules spléniques de souris Balb/C femelles infectées depuis 14, 21 et 36 jours par voie intrapéritonéale avec 20 pseudokystes de Toxoplasma gondii de la souche chronique 76 K et ayant subi 3 jours auparavant une injection de rappel par voie intraveineuse de 100 µg d'extrait antigénique de la souche virulente RH de T. gondii. La fusion de cellules spléniques avec les cellules de myélome SP₂0 a permis d'obtenir des hybrides produisant des anticorps monoclonaux anti-T. gondii, mis en évidence par les techniques d'E.L.I.S.A. et immunofluorescence indirecte. Les clones sélectionnés par la technique de dilution limite ont été multipliés sur ascite de souris. L'identification des anticorps monoclonaux, dirigés contre des antigènes de surface, a été réalisée par immunoprécipitation d'un extrait détergent de tachyzoïtes préalablement marqués par l'¹²⁵I (technique utilisant la lactoperoxydase) et l'analyse des immunocomplexes par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et autoradiographié.

Cinq clones, dirigés contre un antigène de surface de 30 000 daltons (30 Kd) (l'une des 3 molécules majeures marquées par l'iode à la surface des tachyzoïtes), ont ainsi été caractérisés, dont 3 de classe IgG1 et 2 de classe IgG2b. Ces anticorps monoclonaux ont également permis d'isoler la molécule 30 Kd après marquage métabolique, par la méthionine ³⁵S, de tachyzoïtes intra- ou extracellulaires, ouvrant ainsi la voie vers l'étude de la biosynthèse de cette molécule et des modalités de son insertion dans la membrane du tachyzoïte.

La technique d'immunoélectrotransfert nous a permis de caractériser le poids moléculaire des antigènes reconnus par deux clones producteurs d'anticorps monoclonaux de classe IgM ; l'un dirigé contre la molécule de 22 000 daltons et l'autre contre celle de 94.000 daltons. Les clones sécrétant des immunoglobulines de classe IgG reconnaissent constamment l'antigène de 30.000 daltons.

Ainsi, des hybridomes, sécrétant des anticorps anti-T. gondii, ont été établis. 5 sont dirigés contre des antigènes associés à la membrane des tachyzoïtes, les 2 autres reconnaissent les antigènes cytoplasmiques solubles. Parmi les 5 premiers, 4 montrent une forte réactivité dans le test de SABIN-FELDMAN (cytotoxicité complément-dépendante).

Finalement, nous avons utilisé l'outil monoclonal à des fins fondamentales et appliquées. D'une part, l'analyse de la distribution de l'antigène de surface (30 Kd) au niveau des tachyzoïtes a été effectuée par immunoperoxydase indirecte en microscopie électronique ; une répartition uniforme de l'antigène a été observée à la surface des tachyzoïtes extra et intracellulaires, quelque soit le stade de génèse.

D'autre part, les résultats d'un test de compétition en S.R.I.A. et en I.F.I. ont permis de démontrer que le déterminant antigénique correspondant à la 30 Kd reconnu par nos anticorps monoclonaux, était aussi identifiés par les anticorps des sérums d'infection expérimentale chez la souris et dans les différents stades de la toxoplasmose humaine. Ainsi par immunoprécipitation, nous avons pu analyser chez la souris et les individus infestés par T. gondii la réponse immune humorale vis-à-vis des antigènes exprimés à la surface et des antigènes cytoplasmiques de T. gondii.

INTRODUCTION

La Toxoplasmose, due à Toxoplasma gondii, protozoaire cosmopolite fréquent, affecte l'homme et les animaux domestiques. Entraînant une maladie bénigne chez l'enfant et l'adulte, elle est redoutable chez le fœtus et le nouveau-né en raison de ses atteintes cérébrales et oculaires.

Les infections parasitaires, qui sont un des problèmes majeurs en Santé Publique, ont largement bénéficié des progrès théoriques et technologiques.

Dans les maladies où les parasites effectuent une partie de leur cycle dans les tissus, la mise en évidence des parasites est quelquefois délicate, voire souvent impossible. Ainsi, pour Toxoplasma gondii, pour accéder à une approche précise et fine des mécanismes immunitaires chez l'homme où nos connaissances sont limitées, il était absolument indispensable de disposer d'antigènes purifiés et bien caractérisés pour mettre en évidence des anticorps spécifiques.

L'objet de notre travail est la production d'anticorps monoclonaux anti-T. gondii et l'étude de leurs applications possibles pour l'identification, l'isolement et la caractérisation des antigènes cibles.

L'immunoprécipitation suivie d'une séparation en gel de polyacrylamide est la méthode de choix pour l'analyse des antigènes protéiques qui peuvent être radiomarqués métaboliquement ou en surface. Cette technique permet ainsi la quantification de la réponse immune humorale lors des infections.

CHAPITRE I

LE TOXOPLASME ET LA TOXOPLASMOSE

1.1. Historique

Le toxoplasme protozoaire intracellulaire a été découvert à l'Institut Pasteur de Tunis en 1908 par NICOLLE et MANCEAUX qui l'isolèrent à partir d'un rongeur sauvage, le gondi (Cténodactylus gondi).

Toxoplasma gondii est une coccidie du groupe Isospora dont l'hôte définitif est le chat. Ce protozoaire parasite l'homme mais atteint aussi les mammifères ainsi que les oiseaux. En 1937-1938, WOLF et COWEN décrivent le premier cas de toxoplasmose humaine.

En 1939, SABIN montre qu'il s'agit dans tous les cas d'une seule et même espèce, le Toxoplasma gondii.

En 1948, SABIN et FELDMAN mettent au point un test immunologique : le "Dye test" qui permet d'étudier la distribution du parasite chez l'homme et les autres vertébrés.

En 1965, HUTCHISON affirmait que les toxoplasmes étaient transmis par les oeufs d'un ascaris du chat (Toxocara cati).

En 1967, JACOBS notait que les selles de chat non parasité par Toxocara cati pouvaient être également infectieuses.

En 1969, WORK et HUTCHISON découvrent, dans les selles de chat infesté par T. gondii, une forme kystique infectieuse pour la souris et résistante dans le milieu extérieur ; KUHN et WEILAND en 1969 évoquent la ressemblance de cette forme avec l'oocyste des coccidies.

Les travaux de FRENKEL et coll. (1969-1970), de HUTCHISON et coll. (1969-1970) et de SHEFFIELD et MELTON (1970), apportaient ensuite la confirmation que la toxoplasmose est un stade asexué du cycle d'une coccidie hétéroxène dont la reproduction sexuée se déroule chez les félinés.

1.2. Morphologie de la forme proliférative du toxoplasme (tachyzoïte)

Le tachyzoïte ou forme proliférative qui est observé pendant la phase aiguë de l'infection, est un parasite intracellulaire qui se multiplie dans les cellules du système histiomonocytaire.

Le tachyzoïte, en forme de demi-lune asymétrique, mesure de 5 à 8 μm de long sur 2 à 5 μm de large ; il est dépourvu d'appareil locomoteur spécialisé, possède un noyau avec un volumineux caryosome central et un rostre antérieur qui contient le conoïde auquel est associé un système d'anneaux concentriques et de microtubules sous-pelliculaires. De cette région, naissent également des rhoptries qui se terminent en massue dans le cytoplasme ; celles-ci seraient sécrétoires et joueraient un rôle important lors de la pénétration du parasite dans les cellules hôtes (NORRBY, 1967 ; LYCKE et coll., 1968 ; JENSEN et EDGAR, 1976 ; PORCHET et TORPIER, 1977 ; DUBREMETZ, 1981 ; et NICHOLS et coll., 1983). Il existe également des micronèmes : petits organites ayant un rôle enzymatique. L'appareil de Golgi est logé dans une dépression du pôle antérieur du noyau.

1.3. Cycle évolutif (FRENKEL, 1975)

L'évolution de T. gondii se déroule en deux phases.

1.3.1. Cycle sexué chez un féliné : hôte définitif.

Une forme infestante (tachyzoïte, bradyzoïte ou sporozoïte) pénètre dans une cellule épithéliale du sommet des villosités iléales. Plusieurs multiplications schizogoniques interviennent alors, assurant la dissémination du parasite dans le tube digestif. Puis les mérozoïtes issus des schizontes évoluent en gamètes : les microgamétocytes (sphériques d'environ 10 μ) subissent des divisions nucléaires qui aboutissent à la formation de 12 à 32 microgamètes falciformes et qui sont mobiles grâce à 3 flagelles dont un rudimentaire.

CYCLE DE TOXOPLASMA GONDII

CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE

TOXOPLASMA.

CHAT - HOTE DEFINITIF

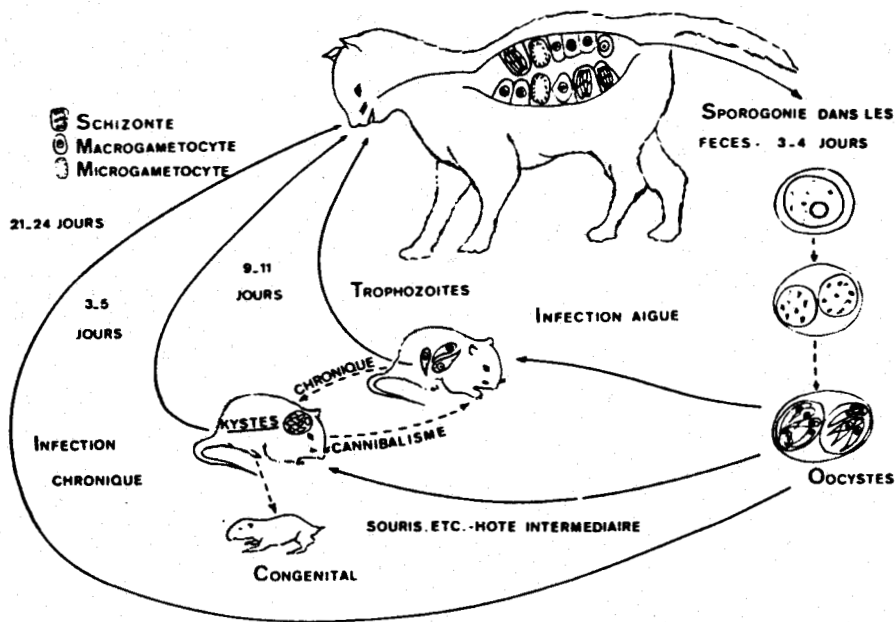


FIG. 9. — Schéma du cycle de développement de *Toxoplasma gondii* montrant les modes de transmission par les oocystes contenus dans les excréments du chat et par ingestion de trophozoïtes ou de kystes venant de l'hôte intermédiaire.

Les nombres de jours indiqués représentent les temps écoulés entre l'ingestion des toxoplasmes par le chat et l'excrétion des oocystes. Les souris représentent les nombreux mammifères et oiseaux qui peuvent servir d'hôtes intermédiaires et chez lesquels l'infection peut se développer par cannibalisme. La transmission congénitale peut prendre place durant l'infection chronique, chez la souris par exemple, ou durant une infection aiguë comme c'est le cas chez l'homme.

D'après FRENKEL, DUBEY et MILLER

Les macrogamétocytes de 5 à 7 μ de diamètre ne se divisent pas ; ils demeurent sous la couche de microvillosités de la cellule-hôte et deviennent des macrogamètes qui après fécondation donneront naissance chacun à un oocyste. PFEFFERKORN et coll. (1977) ont montré que le génome de chaque tachyzoïte, bien qu'haploïde, contient le potentiel génétique pour produire à la fois des microgamétocytes et des macrogamétocytes.

Les oocystes (FRENKEL, 1970 ; DUBEY et coll., 1970a ; HUTCHISON, 1971) sont éliminés dans le milieu extérieur où ils se sporulent pour former 2 sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes allongés, lesquels constituent la principale source d'infestation pour les vertébrés supérieurs qui les ingèrent mais également pour reproduire directement chez les félidés le cycle décrit ci-dessus.

1.3.2. Cycle asexué chez l'hôte intermédiaire

La phase asexuée dont certains stades sont probablement facultatifs se déroule chez l'hôte intermédiaire, vertébré supérieur. Le parasite se développe en se multipliant par endogénèse de façon indéfinie (tachyzoïtes) ou en formant des kystes (bradyzoïtes) dans la plupart des tissus. Les kystes tissulaires sont le résultat d'un grand nombre de multiplications par endodyogénèse. Les formes végétatives disparaissent de la circulation et les parasites restent accollés et s'entourent d'une membrane propre, sont sporoïdeaux, le volume en est variable de 15 à 100 μ m de diamètre pouvant contenir environ 3000 organismes (REMINGTON 1961a). Les kystes s'installent de préférence dans le tissu nerveux et musculaire ainsi que dans le cerveau (REMINGTON et CAVANAUGH, 1965 ; JACOBS et coll., 1960). Leur longévité est sans doute égale à celle de l'animal-hôte puisque les antigènes du toxoplasme ne sont pas exprimés à la surface de la membrane kystique provenant de l'hôte et qu'il n'existe aucune réaction du tissu qui l'entoure.

Le félidé s'infeste également en ingérant ces kystes.

1.4. La toxoplasmose

Le tractus gastrointestinal semble être la route principale d'une infection naturelle ; le toxoplasme se multiplie par voie intracellulaire au point d'infection puis il parasite toutes les cellules adjacentes, excepté les globules rouges (SCHUPP et coll., 1978). Les tachyzoïtes sont disséminés dans tout l'organisme par voie lymphatique et sanguine.

La barrière sang \longleftrightarrow cerveau empêche la diffusion d'anticorps et l'afflux de cellules immunocompétentes : les tachyzoïtes prolifèrent donc dans le cerveau et l'oeil tandis qu'ils disparaissent progressivement ailleurs, en même temps que se poursuit la mise en place de l'immunité (FRENKEL, 1961). Les tachyzoïtes extracellulaires sont lysés par anticorps en présence de complément ; les anticorps sont protecteurs vis-à-vis de la forme parasitaire extracellulaire mais ils peuvent aussi jouer un rôle en pathologie par la formation d'immuns complexes, produisant des lésions dans le cerveau et le rein. L'immunité protectrice dépend des facteurs intracellulaires et des anticorps. Les kystes se développent et persistent dans les tissus (REMYNGTON et CAVANAUGH, 1965). La rupture d'un kyste, par un mécanisme inconnu, induit une réponse inflammatoire dans la zone qui l'entoure, et produit une réaction d'hypersensibilité retardée, de type IV (FRENKEL, 1961). Le fait de trouver des petits kystes autour d'un grand kyste dans le cerveau chez la souris infestée, en phase chronique, suggère d'une façon indirecte, que la rupture d'un kyste pourrait se produire chez un hôte normal (LAINSON, 1958 ; VAN DER WAAIJ, 1959). HULDT, en 1971, par la technique d'immunofluorescence indirecte, montre la présence d'antigène hors des kystes.

Récemment, CONLEY et coll. (1981) emploient la technique de peroxydase-anti-peroxydase pour montrer l'existence de parasites intracellulaires et kystiques dans le cerveau humain de patients qui ont présenté une encéphalite toxoplasmique nécrosante. Chez la souris, en phase chronique de la maladie, CONLEY et JENKINS (1981) ont aussi détecté la présence d'antigène sous la forme de tachyzoïtes et de kystes tissulaires, ce qui suggère que le tachyzoïte peut persister chez l'homme et chez l'animal. D'autres exemples sont fournis par REMINGTON et coll. (1961a), HULDT (1963), BEVERLEY (1958), MILLER et coll. (1969), SIEGEL (1971) qui ont montré l'existence d'une parasitémie pendant la phase chronique de la maladie. D'autres arguments conduisent à penser qu'un stimulus antigénique constant est une condition nécessaire pour la persistance des anticorps et d'une réponse à médiation cellulaire (KRAHENBUHL et coll. 1972a) ; ANDERSON et coll., 1979). La persistance d'une infection active pendant la phase chronique est suggérée aussi par le fait de trouver des titres élevés d'anticorps lors de cette phase. Les animaux de laboratoire chroniquement infestés par Toxoplasma gondii peuvent, au cours de leur gestation transmettre le parasite à leur foetus (BEVERLEY, 1959 ; REMINGTON et coll., 1961b). Le passage transplacentaire des parasites a été discuté par REMINGTON et DESMONTS (1976) qui postulent deux possibilités d'infection prénatale : soit que les parasites traversent le placenta lorsqu'ils sont intracellulaires dans les globules blancs, soit que les tachyzoïtes sont libérés par rupture des kystes dans l'utérus. Ainsi, si la femme est infectée, au cours de la grossesse, le foetus peut s'infecter par passage transplacentaire de trophozoïtes provenant de foyers disséminés dans le tissu placentaire et non par passage direct du parasite de la circulation maternelle dans la circulation foetale. Cette phase d'infestation foetale doit être de courte durée puisque la mère développe rapidement une bonne immunité et que ses anticorps protecteurs passent chez l'enfant. Mais ici encore, le

toxoplasme peut survivre dans le tissu nerveux et la rétine du fœtus alors qu'il disparaît des sites extraneuraux.

1.5. Réponse humorale

La caractérisation et la purification des antigènes qui stimulent une réponse protectrice est importante pour le diagnostic et pour la réalisation d'un vaccin.

Peu de travaux ont été consacrés à la structure antigénique de T. gondii ; volontairement nous nous contenterons dans ce chapitre d'analyser les travaux les plus significatifs faisant appel aux technologies les plus récentes.

En 1980, HANDMAN et coll., analysant des tachyzoïtes purifiés marqués à 1^{125}I par la technique de la lactoperoxydase, ont décrit 4 protéines majeures de surface avec un poids moléculaire apparent de 43 Kd, 35 Kd, 27 Kd et 14 Kd avec les souches C₅₇, C₅₆ et RH présentant toutes les 3 un profil identique ; d'autre part, les tachyzoïtes de la souche RH marqués métaboliquement par la méthionine ^{35}S , à l'autoradiographie montrent environ 32 bandes, malheureusement les poids moléculaires de ces fractions antigéniques n'ont pas été donnés. Le même auteur a montré l'absence d'antigène carbohydraté dans la membrane des tachyzoïtes vivants ; en effet, aucun composant parasitaire n'a été retenu sur une colonne de Con A-Sépharose après passage d'un extrait détergent d'organismes radiomarqués.

Le travail de JOHNSON et coll. (1981) sur l'analyse en gel de polyacrylamide des polypeptides et des glycopeptides d'un extrait de tachyzoïtes montre que la fraction soluble contient 9 polypeptides avec un poids moléculaire de 20, 22, 23, 29, 66, 69, 90, 98 et 133 Kd par rapport à la fraction insoluble que présente 8 fractions antigéniques avec un poids moléculaire de 28, 41, 43, 49, 53, 61, 70 et 80 Kd ; ces fractions semblent être spécifiques du parasite. Ils ont aussi démontré que la

fraction soluble ne contient pas de glycopeptides majeurs ; par contre, la fraction insoluble présente 3 glycopeptides, les bandes sont détectées à 29, 53 et 123 Kd.

Plusieurs études sur l'antigène circulant ont été faites chez la souris; Mas BAKAL, en 1979, montre que l'infection par la souche RH de T. gondii entraîne l'apparition d'antigènes circulants et d'anticorps au même moment de l'infection. Par contre, chez la souris infestée avec des kystes, l'antigène circulant n'est pas présent et les anticorps apparaissent au bout de 10 jours d'infection. Ainsi, l'apparition d'antigènes circulants dans le sang dépendrait de la souche d'infection ; les auteurs ont aussi observé que l'antigène circulant n'est pas détecté dans une infection massive ni dans une infection latente. Pour eux, cette absence lors d'une infection massive serait due à la trop courte étape de circulation des parasites et pour les infections latentes en raison de la neutralisation de parasites par les anticorps. Par contre, dans tous les cas, ils ont mis en évidence la présence d'anticorps quelque soit le type d'infection.

Un test d'E.L.I.S.A. a été utilisé pour montrer la présence d'antigène chez l'homme en phase aiguë de l'infection (ARAUJO et REMINGTON, 1980 ; Van KNAPPEN et PANGGABEAN, 1977). L'antigène circulant a été aussi trouvé dans le liquide amniotique et dans le liquide céphalorachidien du nouveau-né ayant une toxoplasmose congénitale. ARAUJO et REMINGTON (1980) à l'aide d'anticorps monoclonaux montrent que les résultats du dosage des antigènes circulants par E.L.I.S.A. sont comparables en utilisant l'anticorps monoclonal ou le fragment F(ab)₂ des immunoglobulines de lapin anti-T. gondii ; néanmoins les résultats obtenus avec l'anticorps polyclonal semblent être plus satisfaisants pour ce dosage.

Les immunoglobulines qui participent à la réponse anticorps dans la toxoplasmose sont des IgG et des IgM ; ceci a été démontré en 1963 par EICHENWALD et SHINEFIELD dans le sérum du cordon ombilical de nouveau-né par le Dye-test ; ceci veut dire que les IgM spécifiques sont formés "in utero".

Ces résultats ont été confirmés par REMINGTON et coll. en 1966 et 1968. La formation d'anticorps de la classe IgM et IgG a aussi été démontrée chez le lapin par STRANNEGARD en 1967 qui a en plus observé une réponse IgA après l'administration orale d'antigène de T. gondii.

FUJITA et coll. (1970) réalisent une série d'études pour définir le rôle bivalent des anticorps et l'importance du fragment Fc dans les tests sérologiques comme le Dye-test, l'hémagglutination, l'immunofluorescence indirecte et la fixation du complément et plus récemment le test d'E.L.I.S.A.

L'E.L.I.S.A. et la S.R.I.A. permettent la détection des anticorps mais l'utilisation de ces tests dans la phase aiguë de la Toxoplasmose est critique.

CHAPITRE II

HYBRIDOMES PRODUCTEURS D'ANTICORPS MONOCLONAUX

2.1. Définition

La technique d'hybridation cellulaire permet la fusion de 2 types de cellules donnant lieu à la formation d'une troisième entité cellulaire possédant tout ou partie du matériel génétique des deux cellules d'origine ; cette cellule hybride exprime de façon codominante l'information génétique apportée par les cellules "parentales".

2.2. Historique

La découverte du phénomène d'hybridation remonte à 1960 avec les travaux de BARSKI et coll., lesquels étudient une culture mixte de deux souches fibroblastiques. Ils isolent un nouveau type cellulaire présentant un nombre de chromosomes égal à la somme des deux souches initiales et les marqueurs chromosomiques particuliers aux deux cellules "mères". Cette observation fût confirmée par les travaux de SORIEUL et EPHRUSSI (1961).

Plus tard, GERSHON et SACH (1963) ont identifié des hybrides provenant de la fusion de deux cellules possédant des antigènes d'histocompatibilité différents, exprimant les deux antigènes parentaux. Ces travaux ainsi que ceux de GANSHOW (1966) démontrent que dans la cellule hybride s'expriment, d'une façon codominante, les génomes des deux cellules présentant des potentialités génétiques différentes et utilisées pour la fusion. SCALETTA et EPHRUSSI (1965) isolent un hybride issu de la fusion d'une cellule maintenue en culture continue et de cellules prélevées chez un animal nouveau-né. L'information génétique de ces dernières cellules est immortalisée grâce à l'apparition d'hybrides qui expriment d'une part le génome de la cellule prélevée in vivo et d'autre part favorisent la croissance continue in vitro.

Cette même expérience a permis d'observer que la croissance de certains hybrides était favorisée par rapport aux cellules parentales si les cultures s'effectuent à 29°C et non à 37°C. Malheureusement, le système de thermosélection des hybrides n'est pas généralisable à tous les systèmes d'hybridation cellulaire.

2.2.1. Sélection des hybrides

Un système de sélection, basé sur la complémentarité des génomes parentaux, permet à l'hybride de se multiplier. LITTLEFIELD (1964) isole à partir d'une souche hétéropléide de souris, deux lignées cellulaires. Une, résistante à la 8 azaguanine, est déficiente en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) et l'autre, résistante à la 5 bromodéoxyuridine, est déficiente en thymidine kinase (TK). En fusionnant ces deux lignées cellulaires, seuls les hybrides possédant par complémentarité les deux génomes parentaux TK et HGPRT peuvent se développer dans un milieu sélectif HAT (hypoxanthine-aminoptérine-thymidine) inhibant la prolifération des cellules "parentales" qui ne possèdent qu'une seule enzyme. Le système de sélection de LITTLEFIELD (1964) repose sur le fait que les cellules de mammifères possèdent deux voies de synthèse de nucléotides : une synthèse de novo à partir de sucres et d'acides aminés, et une voie de synthèse utilisant des nucléotides préformés : l'hypoxanthine et la thymidine. La synthèse de novo est bloquée par la présence d'aminoptérine, l'autre voie de synthèse nécessite quant à elle la présence d'enzymes : HGPRT et TK.

2.2.2. Agents fusogènes

Le problème majeur qu'il restait à résoudre était le faible pourcentage de fusion cellulaire spontanée.

Les premiers hybrides viables induits par le virus de Sendai inactivé sont décrits par YERGANIAN et NELL (1966) puis COON et WEISS (1969) qui définissent les conditions optimales à l'obtention d'un rendement de fusion élevé. Cet agent viral multiplie d'un facteur 100 le taux d'hybridation par rapport au taux de fusion spontanée.

Cependant, l'utilisation du virus Sendai comme agent fusogène pose plusieurs inconvénients dus à sa nature biologique ; les recherches vers l'obtention d'un agent fusogène chimique sont arrivées plus tard.

PONTECORVO (1975) démontre que l'utilisation de polyéthylène glycol (PEG) permet l'obtention de nombreux hybrides cellulaires. DAVIDSON et coll (1976) définissent les paramètres de la fusion cellulaire en utilisant le PEG.

2.2.3. Mécanisme de fusion cellulaire

Le mécanisme de fusion cellulaire est encore mal connu. Les principales observations de ce processus ont été faites au niveau membranaire. Selon AKONG et coll. (1975) l'action fusogène de substances chimiques telles que le PEG entraînent une fluidification de deux couches lipidiques membranaires favorisant l'agglutination des protéines membranaires. Lorsque deux cellules voisines présentent ce même phénomène, la fusion s'effectue par un réarrangement intermembranaire des feuilletts lipidiques. La phase de généralisation de la fusion est essentiellement dépendante du gradient osmotique intracellulaire. Cette étape aboutit à la formation

de polycaryons (masse cytoplasmique possédant plusieurs noyaux). Après une hybridation, seulement 10 % de cellules hybrides sont viables (EPHRUSSI, 1972).

2.2.4. Stabilité des hybrides

Elle dépend principalement de l'homogénéité du système d'hybridation ; dans le cas des hybrides homologues souris x souris, une perte chromosomique lente de 10 à 20 % est observée après 100 générations puis le caryotype cellulaire se stabilise (EPHRUSSI, 1964). Par contre les hybrides hétérologues homme x souris sont particulièrement instables ; en effet WEISS et GREEN, (1967) ont établi qu'après 20 générations, il ne reste que 2 à 15 chromosomes humains et qu'à la suite de la stabilisation des hybrides, 100 générations plus tard, il ne reste dans l'hybride que de 1 à 3 chromosomes humains.

Les mécanismes de cette déstabilisation des hybrides sont encore mal connus ; ils doivent résulter d'un manque de coordination dans la transmission des deux génomes parentaux lors de la mitose.

2.3. Application de la technique de fusion cellulaire : les anticorps monoclonaux

Le système immunitaire contient plusieurs millions de lignées B lymphocytaires, précurseurs des plasmocytes qui synthétisent les immunoglobulines.

Lorsqu'un agent immunogène s'introduit dans un organisme, il induit une réponse immunitaire qui se traduit au niveau sérique par l'apparition d'un nombre élevé d'anticorps présentant un degré variable d'affinité et de spécificité vis-à-vis d'un déterminant antigénique unique.

Ces anticorps appartiennent à une famille de protéines appelées immunoglobulines, lesquelles montrent une hétérogénéité moléculaire considérable. Cette hétérogénéité fut l'obstacle important pour isoler un matériel compatible avec l'analyse structurale de ces molécules.

La structure biochimique des immunoglobulines a pu être approchée dans certaines tumeurs malignes du système immunitaire appelées myélomes ; en particulier le myélome multiple et la macroglobulinémie de Waldenström qui produisent des immunoglobulines appartenant à un type homogène.

La description de protéines myélomateuses possédant une activité anticorps (SELIGMAN et BROUET, 1973) a permis d'établir que la présence de ces protéines homogènes est liée à la capacité de fabrication excessive d'une seule entité d'immunoglobulines qui se trouvent chez un sujet sain dans des quantités minimales.

Ce concept a été confirmé par WEIGERT et coll. (1974) chez la souris ayant des plasmocytomes spontanés ou induits qui synthétisent des anticorps possédant une activité donnée.

Par ailleurs, chez le lapin, il est possible d'obtenir aussi par des immunisations prolongées des anticorps très homogènes, comparables aux immunoglobulines myélomateuses (NISONOFF et Coll., 1975). Dans l'organisme chaque anticorps est produit par une lignée unique de lymphocytes et par les plasmocytes qui en dérivent. Ces cellules peuvent être cultivées indéfiniment et elles sécrètent des immunoglobulines qui ont la même structure chimique. Ces immunoglobulines sont bien des anticorps monoclonaux.

Si les anticorps monoclonaux obtenus à partir de l'homme, de la souris et du lapin avaient permis l'étude de la structure des immunoglobulines (EDELMAN et coll., 1969) et l'analyse des bases de leur spécificité antigénique (LIEBERMAN et coll., 1974), le problème qui restait à résoudre était d'obtenir des anticorps monoclonaux d'une spécificité définie en quantité suffisante contre l'antigène immunisant. C'est pourquoi la technique des hybridomes représente un des progrès de l'immunologie les plus éclatants de ces dernières années.

2.4. Les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux

Les premières expériences conduisant à la production d'anticorps monoclonaux sont celles de KÖHLER et MILSTEIN (1975) sur le contrôle génétique de la synthèse des immunoglobulines. Ils hybrident deux souches myélomateuses, une de souris avec une de rat afin d'étudier si l'exclusion chromosomique allélique normalement observée dans les cellules parentales (FROLAND, 1972) était altérée dans les hybrides générés. L'étude des sécrétions immunoglobuliniques de ces hybrides montre une combinaison variée des chaînes synthétisées soit par des chromosomes de la souris, soit par des chromosomes de rat mais jamais d'association, dans une même chaîne, du fragment variable et d'un fragment constant des deux myélomes utilisés pour la fusion. Ces observations démontrent qu'il n'y a pas d'exclusion d'allèles parentaux et que l'information génétique propre aux cellules parentales est exprimée de façon codominante dans la cellule hybride obtenue. Ces résultats vont conduire KÖHLER et MILSTEIN (1975) à tenter la fusion de cellules myélomateuses avec des B lymphocytes de souris immunisées. Ils obtiennent après sélection par l'aminoptérine, des hybrides cellulaires dont certains synthétisent des anticorps spécifiques de

l'antigène utilisé pour l'immunisation. Ils démontraient ainsi que le génome B lymphocytaire s'exprime dans les cellules hybrides néoformées. De plus, ces cellules hybrides possèdent la capacité de se multiplier in vitro, les cellules myélomateuses représentant ainsi une source abondante d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un antigène donné.

- Cellules myélomateuses

Depuis les travaux de KÖHLER et MILSTEIN (1975) de nombreuses souches myélomateuses ont été exploitées pour leur capacité de fusion.

Une souche en particulier, la SP₂/0 mutante dérivée d'un myélome de souris Balb/C (SHULMAN et coll., 1978) présente deux caractéristiques importantes : d'une part elle est déficiente en HGPRT, et elle peut donc être soumise au système de sélection de LITTLEFIELD (1964) ; d'autre part, cette lignée cellulaire n'exprime aucune immunoglobuline. Les hybrides générés à partir de cette souche, vont sécréter des immunoglobulines codées par le génome des cellules spléniques (Tableau 1).

- Cellules B lymphocytaires

La préparation et le choix de cellules qui vont être utilisées pour la fusion cellulaire sont d'une importance capitale, en particulier l'état immun déterminant la source lymphocytaire (rate, ganglions, sang) puisque les lymphocytes B ont une spécificité vis-à-vis de l'antigène utilisé. La fusion cellulaire est favorisée lorsque la population lymphocytaire stimulée par le lipopolysaccharide est riche en cellules blastiques.

ANDERSON et MELCHERS (1978) : montrent que les cellules blastiques sont plus sensibles à l'hybridation que les lymphocytes au terme de leur évolution

TABLEAU 1 : Principales souches myélomateuses utilisées par la fusion

Lignée cellulaire	Origine	Production immunoglobulinique		Référence
		Chaîne lourde	Chaîne légère	
P3-X63-Ag 8	Souris	+	+	KOHLER et coll. (1975)
MSI/1-1g. 4.1	Souris	-	+ *	KOHLER et coll. (1976)
SP2/0-1g. 1.4	Souris	-	-	SHULMAN et coll. (1978)
Y3 Ag. 1.2.3.	Rat	-	+	GALFRE et coll. (1979)
IR 983 F	Rat	-	-	BAZIN et coll. (1980a)
U 266 AR ₁	Homme	+	+	OLSSON et coll. (1980)

* Produite mais non sécrétée.

- Sélection

Un autre aspect important du protocole est l'établissement d'un véritable clone d'hybride cellulaire; les populations cellulaires hybrides obtenues après sélection en milieu HAT sont issues de plusieurs hybrides initiaux possédant des potentialités synthétiques diverses.

- Clonage

Pour assurer l'homogénéité des anticorps produits, il est nécessaire d'effectuer un clonage de façon à obtenir une population homogène provenant d'une seule cellule initiale et ne sécrétant qu'un seul type d'anticorps.

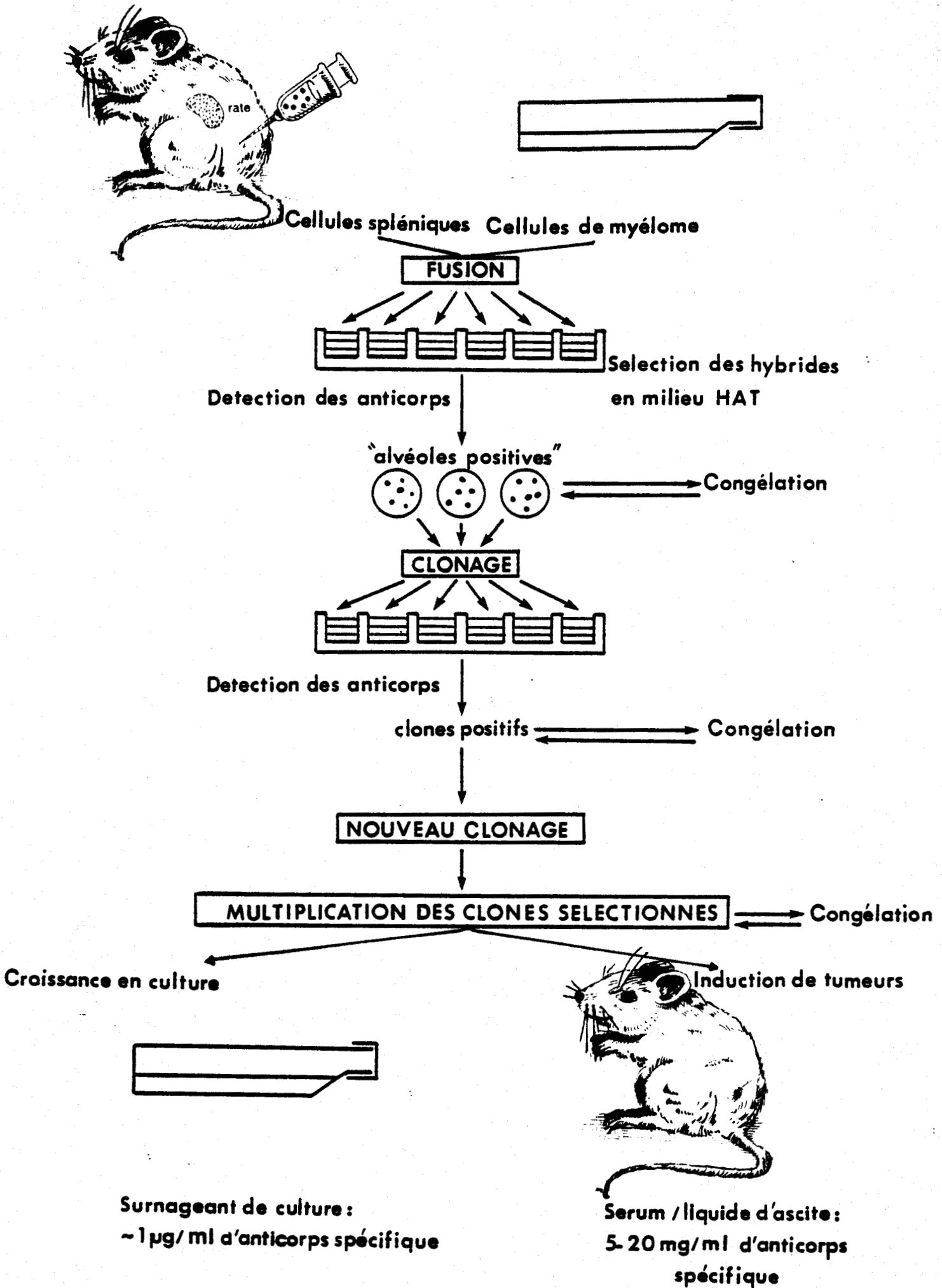
Avant d'aborder les multiples domaines d'application des anticorps monoclonaux en parasitologie nous résumerons schématiquement dans la figure 1 différentes étapes conduisant à la production d'un anticorps monoclonal.

2.5. Applications en parasitologie

Les anticorps monoclonaux représentent un outil d'une puissance remarquable. L'obtention de ces anticorps purifiés en quantité "illimitée" a ouvert la voie à de nombreuses études qui jusqu'alors étaient difficilement envisageables.

En parasitologie, l'analyse de composants antigéniques pose d'importantes difficultés en raison de la complexité des structures parasitaires. Par ailleurs, il existe une variation de l'expression antigénique au cours

FIGURE 1 PROTOCOLE DE PRODUCTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX



du cycle de vie du parasite et d'autre part, l'obtention de matériel parasitaire est souvent limitée à certains stades évolutifs. Les anticorps monoclonaux, associés à d'autres techniques chimiques et immunochimiques, permettent un approche dans l'identification, l'isolement et la caractérisation de ces antigènes parasitaires.

2.5.1. Caractérisation et purification d'antigènes parasitaires à l'aide d'anticorps monoclonaux

Les pionniers de ces travaux sont YOSHIDA et coll. (1981) qui ont permis l'identification d'un antigène de différenciation de sporozoïtes de Plasmodium berghei (Pb44). Chez Trypanosoma cruzi, il faut citer la purification d'une glycoprotéine de surface des épimastigotes par SNARY et coll. (1981) et l'isolement et la caractérisation d'un composant antigénique majeur de 72 Kd correspondant au composant 5 spécifique de T. cruzi (OROZCO et coll., 1982 et 1983). Le travail de DISSOUS et coll. (1982) a porté sur l'isolement et la caractérisation d'un antigène de surface (38 Kd) de Schistosoma mansoni. Pour Toxoplasma gondii, les travaux de KASPER et coll. (1982) utilisent un anticorps monoclonal pour sélectionner un mutant ; les mêmes auteurs en 1983 purifie un antigène membranaire (30 Kd) par immunoabsorption avec un anticorps monoclonal HANDMAN et coll. (1980) détectent et caractérisent l'ensemble des antigènes de surface du tachyzoïte de T. gondii.

2.6. Utilisation des anticorps monoclonaux en parasitologie

- Utilisation taxonomique et épidémiologique

Les travaux d'ANTHONY et coll. (1981) ont permis la production d'un anticorps monoclonal qui reconnaît un déterminant antigénique présent chez Trypanosoma cruzi et absent chez Trypanosoma rangeli ; cet anticorps permettant ainsi de différencier deux espèces très apparentées.

- Détection d'antigènes circulants

Les exemples de cette application sont les travaux de Des MOUTIS et coll. (1982), sur la détection par une méthode de radioimmunoprécipitation (RIPEGA) des antigènes circulants dans le sérum de patients atteints d'onchocercose et celui d'ARAUJO et coll. (1980) qui utilise un anticorps monoclonal pour la détection d'antigène circulant de T. gondii par la technique d'E.L.I.S.A.

- Développement des techniques diagnostiques

La pureté, la spécificité, la stabilité et la possibilité d'obtenir d'importantes quantités, permettant une standardisation, font des anticorps monoclonaux un outil de choix pour le diagnostic.

Les travaux effectués sur la détection des anticorps anti-Schistosoma japonicum dans les sérums de malades, utilisent un dosage radioimmunologique sur support solide (SRIA) ; le test est basé sur une compétition entre l'anticorps monoclonal marqué à ^{125}I et les anticorps polyclonaux présents dans le sérum de patients (MITCHEL et coll., 1981).

Ce même test a été appliqué chez Trypanosoma cruzi par OROZCO et coll. (1982).

- Etude de l'immunité anti-parasitaire

Des anticorps monoclonaux ont été produits afin d'étudier leurs activités biologiques in vivo et in vitro; ainsi YOSHIDA et coll. (1981), POTOCNJAK et coll. (1980) ont protégé la souris avec un anticorps monoclonal anti-Plasmodium berghei contre une infection à l'aide des sporozoïtes. FREEMAN et coll. (1980) ont provoqué avec un anticorps monoclonal une réduction de la parasitémie chez des souris infestées avec Plasmodium yoelii. EPSTEIN et coll. (1981) ont démontré que des anticorps monoclonaux anti-Plasmodium knowlesi inhibent, chez le singe, l'invasion érythrocytaire par des merozoïtes. Les travaux de PERRIN et coll. (1981) sur les anticorps monoclonaux anti-Plasmodium falciparum ont permis d'obtenir des anticorps capables d'inhiber in vitro la réinvasion et le développement intra-érythrocytaire du parasite. Une batterie d'anticorps monoclonaux anti-Schistosoma mansoni ont une activité cytotoxique vis-à-vis des schistosomules soit en présence de complément, soit par l'intermédiaire des cellules effectrices ("ADCC" cytotoxicité dépendante d'anticorps) (VERWAERDE et coll., 1979). Ces études permettront l'analyse fine des mécanismes effecteurs anti-parasitaires dépendants d'anticorps (GRZYCH et coll., 1982) et probablement aussi l'identification des antigènes protecteurs de l'hôte.

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1. Animaux

La majeure partie des expériences ont été réalisées sur des souris consanguines Balb/C mâles et femelles âgées de 8 à 12 semaines provenant de l'élevage de l'Institut Pasteur de Lille.

La souche virulente RH de T. gondii est entretenue chez des souris Swiss (Groseck ; Lewarde).

3.2. Obtention et entretien des parasites

Le matériel parasitaire utilisé dans le présent travail provient de la souche RH virulente, cette souche est entretenue par passage bihebdomadaire chez la souris porteuse d'une tumeur d'ascite induite par des cellules T.G. 180.

3.2.1. Isolement à partir de l'ascite

Les tachyzoïtes sont prélevés par lavage intrapéritonéal avec 8 ml de milieu de culture (MEM-EAGLE, 1959) (cf annexe 2), la suspension ainsi obtenue peut contenir de 10^8 à 10^9 tachyzoïtes/ml. Elle est souvent contaminée par des cellules d'ascite et par des hématies. Sont retenus pour nos expériences, les lavages renfermant moins d'une cellule pour 100 zoïtes. La suspension finale est ajustée à 2×10^8 zoïtes. Elle est lavée 3 fois par centrifugation à 600 g pendant 10 min. dans le tampon PBS-IF (cf annexe 1) et purifiée par filtration sur membrane de polycarbonate de 3 μ m (Nucleopore Corp., Pleasanton, Calif.), selon HANDMAN et coll. (1980).

3.2.2. Isolement à partir de cellules en culture

Pour certaines expériences, nous avons isolé les tachyzoïtes développés in vitro sur cellules Hela infestées.

Un flacon de 75 cm³ (de type FALCON ou CORNING 25110 Flask HA 30) de cellules Hela confluentes est infesté par 10⁸ tachyzoïtes isolés d'ascite de souris.

Après 24 à 30 heures, le tapis est remis en suspension dans le milieu de culture, les cellules sont éclatées par action mécanique avec un homogénéisateur type Dounce, libérant ainsi les parasites ; la suspension obtenue renferme de 3 à 4 x 10⁸ zoïtes et est filtrée sur fibres de verre selon la technique de GRINWOOD et coll. (1979). L'éluat est centrifugé à 600 g pendant 10 min. et lavé 2 fois en PBS. Nous obtenons ainsi environ 2 x 10⁸ tachyzoïtes exempts de tout contaminant cellulaire à l'observation en microscopie à contraste de phase.

3.3. Préparation de l'extrait antigénique soluble

Cette préparation est réalisée à partir de la souche RH de T. gondii. Après 3 jours d'infection des souris, 4 à 6 x 10⁸ tachyzoïtes sont recueillis par 2 lavages intrapéritonéaux avec environ 15 ml de milieu Hanks Wallace pour chaque souris. Les parasites sont lavés 7 fois avec du Hanks Wallace par centrifugation à 800 g et remis en suspension dans de l'eau distillée à raison de 5 x 10⁶ parasites/ml puis congelés à -20°C et décongelés à 37°C. Ensuite, une ultrasonication est effectuée 3 min. à 50 W.-20 KHz dans un appareil (A. Post Type 20-200 sv, sonotrope T.10T). L'homogénat est recongelé et ajusté à la moitié du volume initial par une solution de NaCl 1 ‰. Cette suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 1 h à 4°C. Le surnageant est dialysé contre de l'eau distillée puis lyophilisé. L'extrait antigénique

soluble contient environ 1.9 mg/ml de protéine déterminée par la technique BIO-RAD (protein-assay).

3.4. Protocole d'infection

Les cerveaux de souris contenant environ 400 pseudokystes/ml de la souche chronique 76 K de T. gondii sont prélevés, lavés et broyés doucement dans un homogénéisateur type Potter. Chaque souris est inoculée par voie intrapéritonéale avec une suspension correspondant à 20 pseudokystes. Dix groupes de souris Balb/C femelles ont été infestés afin d'étudier la cinétique d'apparition des anticorps spécifiques. Une injection de rappel par voie intraveineuse est réalisée 3 jours avant la manipulation d'hybridation avec 100 µg d'extrait antigénique soluble de T. gondii chez les souris présentant des titres d'anticorps les plus élevés en immunofluorescence indirecte.

3.5. Hybridation cellulaire. Conditions de culture

Le choix et la qualité des milieux de culture sont des facteurs déterminants pour l'hybridation cellulaire et la production d'anticorps monoclonaux. Ces conditions de culture cellulaire doivent permettre le maintien de différentes lignées cellulaires dans un état physiologique le plus favorable à l'obtention d'un pourcentage d'hybridation important et à la sécrétion optimale d'immunoglobulines. La nature, la composition et l'utilisation des différents milieux de culture employés dans notre travail sont réunies dans l'annexe 2.

3.5.1. Utilisation de cellules nourricières

Certaines étapes délicates de la production d'anticorps monoclonaux, notamment la phase de sélection des hybrides et la phase de clonage, requièrent la présence d'un tapis de cellules nourricières issues du lavage de la cavité péritonéale de souris Balb/C. Les cellules nourricières sont composées essentiellement d'une monocouche de fibroblastes et de macrophages. Ces cellules nourricières présentent deux avantages : d'une part, elles libèrent dans le milieu de nombreux métabolites, favorisant la croissance des hybrides et participant également au maintien d'un pH physiologique favorable au développement cellulaire ; d'autre part, la présence de macrophages dans le tapis cellulaire, permet l'élimination rapide des débris cellulaires.

Les cellules obtenues à partir d'une souris sont mises en suspension dans 12 ml de milieu A puis sont réparties soit dans les 24 alvéoles d'une plaque de culture cellulaire de type Nunc-Denmark (Ref 143982), soit dans deux plaques de 96 alvéoles de type Limbro-Chemical Co., Hamden, Conn. (Ref. 76-00305). Après une incubation de 48 heures à 37°C en atmosphère humide à 5 % de CO₂, les cellules non adhérentes sont éliminées par aspiration du surnageant de culture.

3.5.2. Lignée cellulaire myéломateuse

Pour nos expériences de fusion cellulaire, nous avons utilisé la lignée myéломateuse Sp2/0 dérivée d'un myélome de souris Balb/C (SHULMAN et coll., 1978). Ces cellules non sécrétantes sont résistantes à 20 µg/ml de 8 azaguanine et présentent une déficience en hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT) ; elles sont donc sensibles au système de sélection de LITTLEFIELD (cf chapitre 2.2.1.).

Les cellules prises en phase exponentielle de croissance, sont lavées 2 fois par le milieu B pour éliminer le sérum de veau foetal qui inhibe la fusion cellulaire.

3.5.3. Cellules immunes

Elles proviennent du broyage de la rate de 2 souris infectées par T. gondii depuis 14, 21 et 36 jours respectivement.

Le culot de cellules spléniques obtenu après 2 lavages par centrifugation avec le milieu B est repris par 8 ml du même milieu. Cette suspension est déposée à la surface d'un gradient de Ficoll/métrizoate de sodium composé d'une couche de 8 ml d'une solution à 9,6 % (p/v) de métrizoate et à 5,6 % (p/v) de Ficoll et d'une couche de 2 ml d'une solution à 7,7 % (p/v) de métrizoate et à 4.5 % (p/v) de Ficoll.

Après 10 min. de centrifugation à 800 g, les hématies et débris tissulaires sédimentent au fond du tube. Les lymphocytes sont récupérés dans la couche intermédiaire du gradient et sont lavés deux fois par 50 ml de milieu B.

3.5.4. La fusion cellulaire

La technique de fusion cellulaire utilisée s'inspire des travaux de HOWARD et coll. (1978), Mc KEARN et coll. (1978) et CLEVINGER et coll. (1978).

3.5.4.1. Agent de fusion

L'agent de fusion utilisé est le polyéthylène glycol (PEG) diméthylsulfoxyde (DMSO). Trente grammes de PEG 1500 sont dissous dans 42 ml de tampon phosphate 10 mM, NaCl 15 mM pH 7,2 et 0,2 ml de DMSO. La solution est stérilisée à l'autoclave 15 min. à 120°C

3.5.4.2. Protocole de fusion

Les cellules myélomateuses sont ajoutées aux cellules spléniques dans un rapport de 1 pour 5. Le culot cellulaire mixte obtenu après centrifugation à 400 g pendant 5 min. est traité par 1 ml de la solution de PEG/DMSO ajoutée en une minute sous agitation douce puis 1 ml et 20 ml de milieu B ajouté en une minute et 4 minutes respectivement. Les cellules sont ensuite lavées en milieu B pour éliminer l'excès de PEG/DMSO. A partir du culot cellulaire final, une suspension contenant 5×10^5 cellules/ml est réalisée en milieu A. Des fractions aliquotes d'un ml de cette suspension sont réparties par alvéole de plaque de culture cellulaire de type Nunc (24 alvéoles) contenant des cellules nourricières. Les plaques sont incubées en atmosphère humide à 5 % de CO₂ et à 37°C.

3.5.5. Sélection des hybrides

Cette sélection commence 24 heures après l'étape de fusion cellulaire. Dans chaque alvéole, 1 ml de milieu A est remplacé par le milieu HAT. Cette opération est répétée les deux jours suivants puis tous les cinq jours. Au bout de 15 à 21 jours, le milieu HAT peut être progressivement remplacé par le milieu HT puis par le milieu A.

3.5.6. Clonage cellulaire

Nous avons choisi pour le clonage, la technique de dilution limite qui consiste à répartir 50 µl d'une suspension cellulaire contenant 20 cellules/ml dans chaque alvéole d'une plaque de clonage Type Limbro (96 alvéoles) contenant des cellules nourricières. Après 24 heures de culture à 37°C, 5 % de CO₂, 100 µl de milieu sont ajoutés dans chaque alvéole. Le milieu est

renouvelé tous les 5 jours. Les plaques sont observées au microscope inversé de manière à vérifier la monoclonalité des cultures. Les premiers clones apparaissent 8 à 15 jours plus tard, la sélection des clones s'opère sur le surnageant des alvéoles présentant un clone unique. Les clones producteurs d'anticorps spécifiques sont sélectionnés et multipliés par transfert progressif dans des alvéoles plus grandes. Le clonage est répété plusieurs fois pour assurer la monoclonalité des cellules et afin d'éliminer les éventuels mutants pouvant survenir au cours de la multiplication cellulaire.

3.6. Identification des hybrides producteurs d'anticorps anti-T. gondii

Cette étude a été réalisée sur les surnageants de culture, testés simultanément par une technique d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) et par une technique d'Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A.).

3.6.1. Immunofluorescence indirecte (I.F.I.)

La fixation spécifique des anticorps, synthétisés par les populations cellulaires hybrides, sur des motifs antigéniques présents au niveau des tachyzoïtes est révélée par un antiserum spécifique des immunoglobulines de souris préparé chez le mouton, ou chez la chèvre marquées à la fluorescéine.

- Préparation des lames

Les tachyzoïtes provenant de l'ascite de souris sont filtrés sur papier (Folded-Filter 595 1/2 : 125 mm Schleicher-Schüll GmbH RFA) et lavés 7 fois en tampon phosphate isotonique (PBS-IF) (cf annexe 1). 3×10^6 tachyzoïtes/ml sont fixés pendant 10 min dans une solution de formol 2 % en PBS.

Après 2 lavages en PBS, 25 μ l d'une suspension contenant 5×10^6 parasites/ml de PBS sont déposés sur des lames porte-objet (Bioservice, IPL). Les lames sont séchées à 28°C et conservées à température ambiante en présence d'un dessiccateur (CaCl_2) jusqu'à leur utilisation (maximum : un mois).

- Réaction d'immunofluorescence

Vingt μ l de surnageant de culture (concentré 5 fois par lyophilisation) sont déposés sur les lames. Après 30 min. de contact à température ambiante, les lames sont lavées 3 fois pendant 10 min. en PBS.

La révélation de la réaction s'effectue respectivement avec 20 μ l d'un antisérum spécifique d'immunoglobulines de souris préparé chez la chèvre (fraction IgG anti-IgM μ spécifique de souris, CAPPEL) marqué à la fluorescéine et/ou par un anti-sérum spécifique des immunoglobulines de souris préparé chez le mouton (New England) marqué à la fluorescéine dilué au 1/40ème dans une solution de Bleu d'Evans au 1/10 000ème. Après 30 min. d'incubation à l'obscurité l'excès d'antisérum fluorescent est éliminé par 3 lavages de 10 min. dans du tampon PBS. Les préparations sont recouvertes avec une goutte de glycérol 50 % (v/v) en PBS et observées au microscope doté d'une source de lumière U.V.

L'expression des résultats s'effectue en croix de 0 à 5, selon l'intensité de la fluorescence observée. Les témoins utilisés sont traités dans les mêmes conditions. Dans chaque lecture, nous avons inclus un sérum de souris saine dilué au 1/50ème, du surnageant de culture de cellules myélo-mateuses concentré 5 fois par lyophilisation, et comme témoin positif un sérum de souris infestée dilué au 1/50ème et 1/150ème.

- La réaction d'I.F.I. a été aussi réalisée en phase liquide avec des tachyzoïte vivants provenant d'ascites après purification par filtration (cf 3.2.1.). Après lavages par centrifugation à 800 g pendant 10 min. dans du tampon PBS contenant 1 % de sérum de mouton, une suspension de 10^7 parasites en 500 μ l est répartie dans chaque tube et incubée pendant 30 min. à température ambiante avec 40 μ l de surnageant de culture concentré 5 fois par lyophilisation ou 25 μ l de liquide d'ascite ; nous avons utilisé comme témoin négatif un surnageant de cellules myélomateuses, un liquide d'ascite sans activité anti-T. gondii, ainsi que du sérum de souris saine dilué au 1/50ème, 1/150ème et 1/450ème. Le témoin positif est un sérum de souris d'infection dans les mêmes dilutions. Après 2 lavages en PBS, 80 μ l de conjugué dilué au 1/10ème sont incubés pendant 30 min. à température ambiante puis lavés 2 fois. Le culot parasitaire est repris dans le volume initial puis observé au microscope de fluorescence.

3.6.2. Technique immunoenzymatique : Enzyme Linked Immunosorbent Assay E.L.I.S.A.

Le principe de cette technique consiste à détecter des anticorps qui se fixent spécifiquement aux antigènes adsorbés sur un support solide. La réaction est révélée par un antisérum spécifique d'immunoglobulines de souris, marqué à la peroxydase.

Le support utilisé dans notre travail sont des plaques rigides en polystyrène (Dynatechlab., Inc., réf M-129B).

- Préparation des plaques

Cent μl par alvéole d'une solution d'extrait antigénique soluble à 30 $\mu\text{g/ml}$ (p/v) sont incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont lavées 3 fois en PBS-Tween 20 (0,05 % ; v/v) ; les sites d'adsorption restant sur la paroi des alvéoles sont saturés par 200 μl d'albumine sérique bovine à 2 % (p/v) pendant 2 heures à température ambiante. Les plaques sont lavées 2 fois en PBS-Tween et une fois en PBS puis séchées et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

- Révélation enzymatique

Cent μl de chaque surnageant à tester sont incubés 3 h à 37°C dans les alvéoles. Après 3 lavages en PBS-Tween, chaque alvéole reçoit 100 μl d'antisérum spécifique des immunoglobulines de souris marquées à la peroxydase (Institut Pasteur-Production) et/ou l'anticorps de chèvre anti-IgM, Fc (Nordic) dilué au 1/2500^{ème} et 1/5000^{ème} respectivement en PBS-Tween. Après 3 h de contact à 37°C, les plaques sont lavées avec du PBS-Tween ; la réaction est révélée par 100 μl de substrat (9 mg O-Phenyl diamine O.P.D. + 0,2 ml d' H_2O_2 0,3 % pour 25 ml de tampon phosphate-citrate (cf annexe 3), solution préparée extemporanément. L'incubation est réalisée pendant 30 min. à l'abri de la lumière, la réaction est arrêtée par 100 μl d'une solution 2 N d' H_2SO_4 .

La lecture de la densité optique est réalisée à 492 nm dans un appareil type Titertek Multiskan (Flow-Lab). Les résultats exprimés correspondent à la moyenne arithmétique de 2 essais.

Dans le cas particulier des hybrides producteurs des immunoglobulines de la classe IgM, les surnageants de culture ont été traités par 100 μl d'une solution de 2-mercaptoéthanol 0,1 M. Ces surnageants sont testés dans les conditions décrites précédemment. Dans ce cas, un conjugué

d'antisérum spécifique d'immunoglobulines de souris fraction IgG, ou IgM ou Ig totales marqués à la peroxydase est utilisé.

Dans chacune de nos expériences, nous avons inclus comme témoins négatifs le surnageant de culture des cellules myélomateuses pur et le sérum de souris saine dilué en PBS au 1/50^{ème}, 1/150^{ème}, 1/450^{ème} et 1/1350^{ème}. Le témoin positif est un sérum de souris d'infection utilisé aux mêmes dilutions.

3.7. Production massive d'anticorps monoclonaux

L'étude des activités biologiques des anticorps monoclonaux exigent la production massive de ces anticorps. Ne disposant pas d'une unité de culture cellulaire continue, nous avons choisi de produire ces anticorps in vivo par induction de tumeurs intrapéritonéales. 5×10^6 cellules hybrides sont injectées par voie intrapéritonéale chez des souris Balb/c ayant reçu une semaine auparavant par voie intrapéritonéale 0,5 ml de pristane (2, 6, 10, 14 tetraméthyl pentadecane) ; le pristane favorise le développement des tumeurs intrapéritonéales (POTTER et coll., 1973). Huit à 15 jours après l'injection des cellules hybrides dans la cavité abdominale, 3 à 5 ml de liquide d'ascite contenant l'anticorps à une concentration d'environ 5 mg/ml sont obtenus. Cette opération peut être répétée 2 à 3 fois au maximum chez le même animal. Cependant les cellules hybrides obtenues après centrifugation du liquide d'ascite peuvent être réinjectées directement par voie intrapéritonéale de façon à maintenir la production d'anticorps monoclonaux. Les liquides d'ascites centrifugés à 800 g sont répartis en fractions aliquotes, conservées à -20°C et à -70°C jusqu'à leur utilisation.

3.8. Activité biologique in vitro des anticorps monoclonaux

L'épreuve diagnostique en bleu de méthylène "Dye test", développée par SABIN et FELDMAN (1948), est considérée comme la plus valable en raison de sa spécificité et de sa sensibilité ; elle est acceptée comme test de référence dans la toxoplasmose.

Ce test met en évidence le pouvoir lytique d'un sérum immun vis-à-vis du parasite.

L'antigène est constitué de toxoplasmes vivants provenant d'un exudat péritonéal de souris ; les anticorps spécifiques (recherchés dans le sérum de malade) après inactivation à 56°C pendant 30 min, se fixent sur le parasite et le sensibilise à l'action lytique du complément qui est apporté par le sérum d'individus dépourvus d'anticorps spécifiques ; ce sérum est appelé facteur accessoire.

Les résultats sont déterminés par comptage des tachyzoïtes ; les parasites intacts sont colorés par le bleu de méthylène, tandis que les parasites lysés perdent leur affinité par le colorant.

Pour notre travail, un facteur accessoire provenant de sérum humain a été obtenu chez des individus n'ayant pas d'anticorps anti-T. gondii.

Le dye-test de SABIN et FELDMAN (1948) sur microplaque selon FELDMAN et LAMB (1966) est réalisé sur plaques Microtiter-U-Form. A partir de 25 µl de sérum ou de liquide d'ascites pour les anticorps monoclonaux, une série de dilutions est réalisée dans du tampon phosphate physiologique à pH 7 (Fixanal, Riedel-De Haën).

Un sérum positif confirmé est inclus comme contrôle de titre afin d'évaluer les conditions du test.

L'exudat péritonéal a été obtenu chez des souris après 3 jours d'infection par la souche R.H. de T. gondii. Soixante quinze μl d'un mélange contenant 10 % d'ascites de souris et 35 % de facteur accessoire humain en tampon phosphate physiologique sont ajoutés à chaque alvéole. Après agitation, les plaques sont incubées pendant une heure à 37°C; ensuite 50 μl d'une solution alcaline fraîche de bleu de méthylène à pH 11 sont ajoutés et le mélange est incubé une nuit à température ambiante.

Le comptage de parasites vivants ou lysés est effectué dans un mélange bien homogène entre lame et lamelle à un grossissement de 500 X.

Le titre final correspond à la dernière dilution montrant un pourcentage égal ou supérieur à 50 % de parasites vivants.

3.9. Caractérisation des anticorps monoclonaux

La technique de double diffusion en gel décrite par OUCHTERLONY (1958) a permis l'identification de l'isotype des anticorps monoclonaux montrant une spécificité anti-T. gondii. La réaction de double diffusion est effectuée en gel d'agarose (INDUBIOSE A 37 - Industrie Biologique Française) préparé à 1 % en tampon barbital sodique pH 8,2. On découpe à l'emporte-pièce un puits central dans lequel sont déposés 200 μl de surnageant de culture (concentré 10 fois par lyophilisation). Les puits périphériques reçoivent 20 μl des antisérums (anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) de souris (Nordic Tilburg-Neederlands). Après une diffusion de 48 heures à température ambiante et en chambre humide, les lames sont lavées 24 h dans une solution de citrate de sodium à 5 % (p/v), puis 48 h dans une solution de NaCl 9 ‰. Le gel est finalement recouvert d'un papier Whatman N°1 humidifié pour sa déminéralisation, séché et coloré par l'amidoschwarz.

3.10. Purification des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux obtenus appartiennent aux sous-classes IgG1, IgG2b et IgM ; nous avons utilisé deux méthodes de purification.

3.10.1. Purification d'immunoglobulines de la classe IgG

Les immunoglobulines ont été purifiées à partir d'ascites de souris contenant les anticorps monoclonaux selon le protocole suivant :

1ère étape : Précipitation par le sulfate d'ammonium

L'ascite est diluée au demi par une solution d'eau physiologique. Les anticorps de classe IgG sont précipités à 50 % de saturation finale en sulfate d'ammonium.

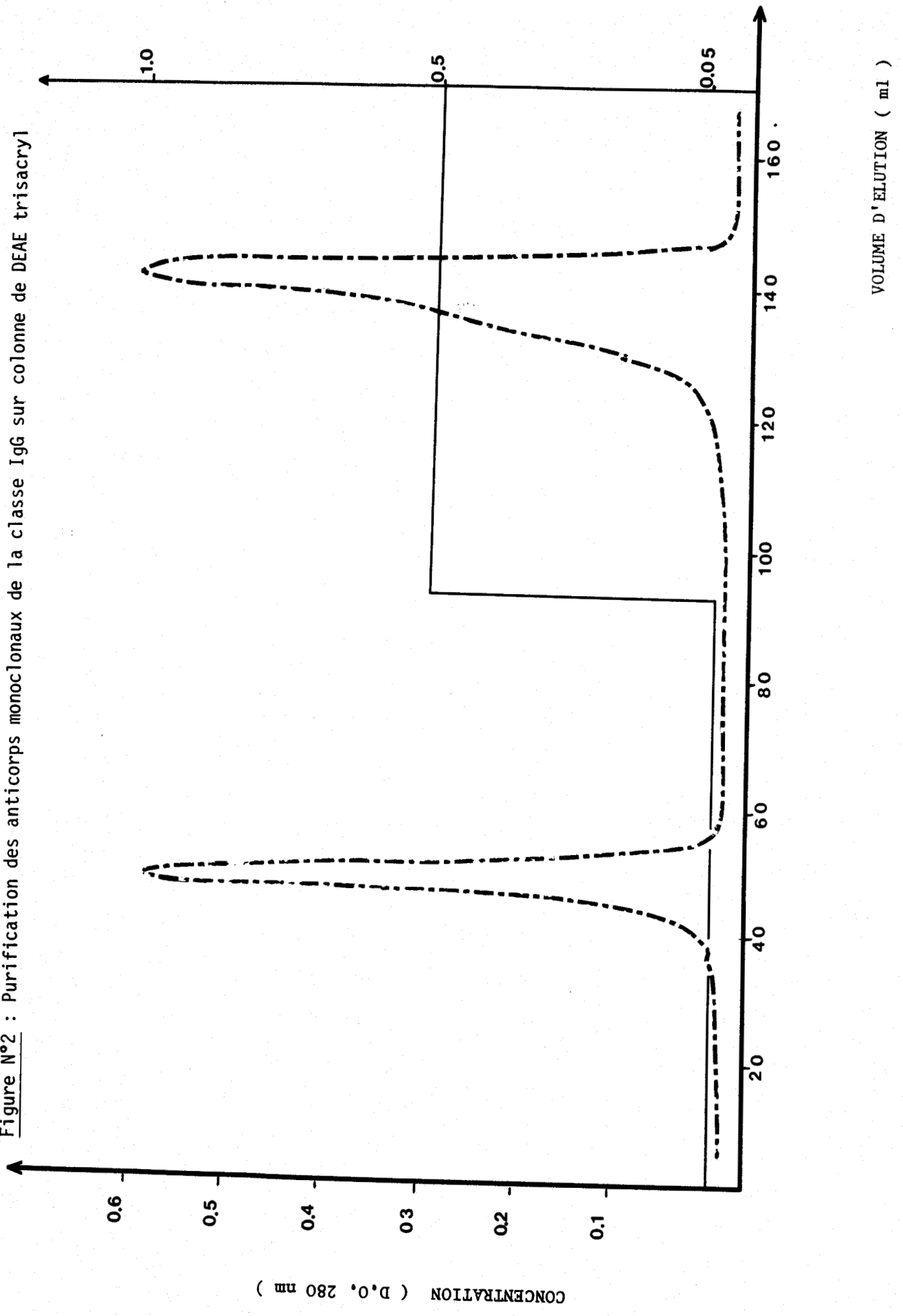
La précipitation dure 30 min et le culot sédimenté par centrifugation à 2200 g pendant 15 min, est repris dans le volume initial en eau physiologique.

Une deuxième précipitation par le sulfate d'ammonium est conduite comme précédemment, le culot final est dissous dans un volume d'eau physiologique égal à la moitié du volume initial de l'ascite traitée.

Cette solution est dialysée pendant 24 h contre une solution de NaCl 9 ‰, et 48 h contre du tampon Tris-HCl (0,05 M-pH 7,4).

2ème étape : La solution dialysée est passée sur une colonne échangeuse d'ions type DEAE trisacryl (I.B.F.) de C 16x20 mm. Les protéines sont éluées par du NaCl variant de 0,05 M à 0,5 M dans du tampon Tris-HCl (0,05 M-pH 7.4) (figure 2). Le premier pic de densité optique contient la plupart des IgG présentes dans le liquide d'ascite de départ ; cette fraction est collectée

Figure N°2 : Purification des anticorps monoclonaux de la classe IgG sur colonne de DEAE trisacryl



CONCENTRATION (D.O. 280 nm)

VOLUME D'ELUTION (ml)

MOLARITE Na Cl.

et concentrée dans une cellule Amicon (Model 52 ; à 75 PSI Max) munie d'une membrane PM10.

3.10.2. Purification d'immunoglobulines de la classe IgM

La technique décrite par BAZIN et coll. (1974) a été appliquée à la purification des anticorps de la classe IgM. Ces anticorps sont précipités à partir d'ascites diluées au demi en eau physiologique, à deux reprises, à 40 % de saturation en sulfate d'ammonium.

Le précipité final est dissous en tampon Tris-HCl 0,005 M pH 8, NaCl 2 % (p/v) NaN_3 1 % (p/v) et dialysé 48 h dans le même tampon. La solution dialysée est déposée sur une colonne de gel filtration de type ACA 44 C 26 x 100 mm. Les protéines sont éluées par le tampon epsilon (cf annexe 6) Le premier pic obtenu correspond aux IgM (Figure 3).

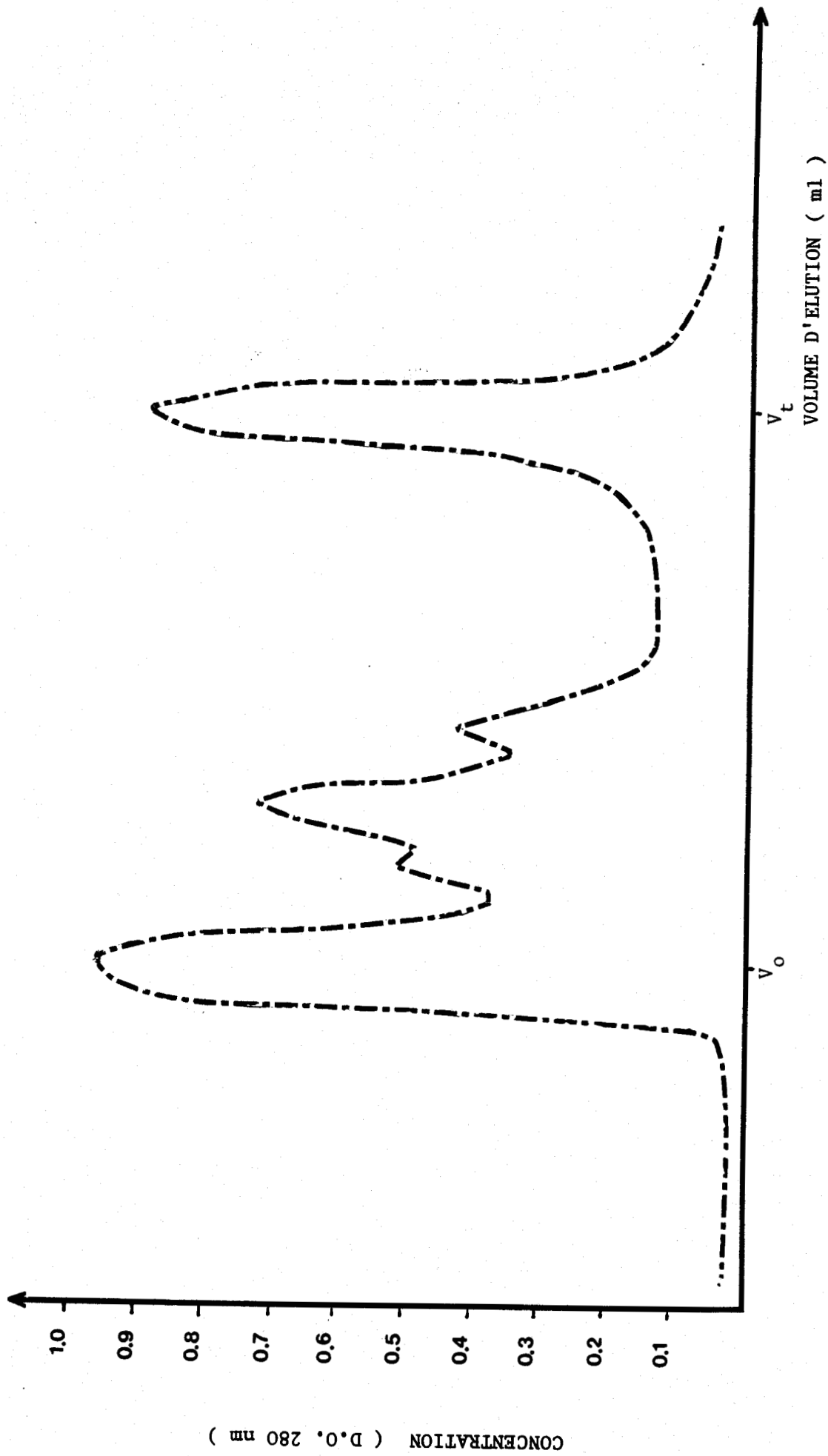
3.11. Marquage des anticorps monoclonaux

Les anticorps purifiés sont marqués à l' ^{125}I par la technique de la Chloramine T selon Mc CONAHEY et DIXON (1966).

Cent μg d'une solution de protéines solubilisées dans 100 μl de tampon PBS (0,05 M pH 7,4) sont mélangés à 200 μCi de ^{125}I (Amersham-Buckinghamshire, France). Le marquage est effectué par addition de 50 μl de chloramine T (1 mg/ml en PBS 0,05 M pH 7,4). Après 2 à 3 min d'agitation douce, la réaction est arrêtée par addition de 100 μl de métabisulfite de sodium (1 mg/ml en PBS 0,05M) puis 50 μl d'Iodure de sodium (1 mg/ml en PBS-0,05M).

Les molécules d' ^{125}I non couplées sont éliminées par gel filtration sur une colonne de Séphadex G-25 (PD 10, PHARMACIA) équilibrée dans du PBS 0,05 M contenant 2 % d'albumine bovine et de l'azoture de sodium 0,01 %

Figure N°3 : Purification d'anticorps monoclonaux de la classe IgM sur colonne de ACA-44 (C26 x 100)



(p/v). L'élution est effectuée avec le même tampon et des fractions aliquotes de 0,5 ml sont recueillies à la sortie de la colonne. Les fractions contenant les anticorps marqués sont répartis en fraction aliquotes et conservées à - 70°C.

3.12. Caractérisation des antigènes cibles

L'isolement et la caractérisation de(s) molécule(s) portant les déterminants antigéniques reconnus par nos anticorps monoclonaux ont été envisagés par les techniques d'immunoprécipitation et de transfert sur nitrocellulose. L'analyse de produits antigéniques purifiés selon ces deux techniques a été réalisée en gel de polyacrylamide SDS.

Matériel antigénique

Le matériel antigénique utilisé pour la formation d'immun complexes provient de tachyzoïtes de culture préalablement marqués à l' ^{125}I ou à l' ^{35}S . methionine.

3.12.1. Marquage de protéines de surface

Les protéines de surface de T. gondii sont marquées par l' ^{125}I selon la technique de la lactopéroxydase décrite par MARCHALONIS et coll. (1971). Les tachyzoïtes d'ascite et les tachyzoïtes issus de cellules Hela en culture sont mis en suspension à la concentration de 10^7 /ml et sont lavés 3 fois en PBS 0,01 M pH 7,4 par centrifugation à 600 g. Le culot parasite est repris dans 200 μl de PBS auxquels sont additionnés successivement 10 μl de NaI (6,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 μl de ^{125}I (0,2 mCi), 10 μl d' H_2O_2 à 1/10 000ème en eau distillée et 10 μl (1mg/ml) lactopéroxydase (Calbiochem Agrade). Le

marquage est réalisé à 0°C pendant 15 min sous agitation constante. La réaction est arrêtée par addition de 100 µl de NaI (6.6 mg/ml). Les tachyzoïtes ainsi traités sont lavés 3 fois par centrifugation à 600 g pendant 15 min dans 30 ml de PBS, le dernier culot est repris dans 200 µl de tampon de lyse (cf annexe 4). Après une incubation d'une heure à 4°C, la suspension est centrifugée 15 min à 10 000g. Le surnageant contient les antigènes de surface marqués qui vont être utilisés dans le test d'immunoprécipitation.

3.12.2. Marquage de protéines natives

Les protéines de T. gondii ont été marqués in vitro par incorporation de méthionine marquée à 1, ³⁵S (Amersham) L- [³⁵S] méthionine, activité spécifique (1500 Ci/mmol, 11.9 mCi/ml). Nous avons réalisé deux types de marquage.

3.12.2.1. Marquage extra-cellulaire

Vingt cinq ml d'une suspension contenant 150×10^6 tachyzoïtes sont lavés 2 fois dans du PBS et une fois dans du milieu MEM dépourvu de méthionine et additionné de 10 % de sérum de veau dialysé (SVD) contre le milieu MEM. Après centrifugation, les parasites sont repris dans 2 ml de milieu MEM additionnés de 7,5 µl de méthionine ³⁵S (75 µCi) et incubés pendant 1 heure à 37°C. Les tachyzoïtes ainsi traités sont lavés 1 fois en milieu MEM-SVD, les protéines sont solubilisées 1 h à 4°C dans le tampon de lyse. Le surnageant contenant les protéines natives est utilisé pour l'immunoprécipitation.

3.12.2.2. Marquage intra-cellulaire

Un flacon de 75 cm³ (FALCON) contenant un tapis de cellules Hela confluentes à 80 % est infestée par 10⁸ Tachyzoïtes provenant d'ascite de souris ; ceci pendant 5 h et/ou 20 heures. Après l'infestation, le milieu est remplacé par 10 ml de milieu MEM dépourvu de méthionine, contenant 10 % de sérum de veau dialysé (SVD). Après 30 min, le milieu est remplacé par 10 ml du même milieu contenant 200 µCi de méthionine ³⁵S. Après 1 h d'incubation à 37°C, du MEM contenant de la méthionine froide à une concentration de 1.5 mg/ml est ajouté pour différent temps d'incubation et les parasites sont lavés une fois dans du MEM-SVD.

L'incorporation de L-³⁵S méthionine, est mesuré par scintillation en phase liquide après précipitation par l'acide trichloracétique (TCA) à une concentration finale de 20 %. Le précipité est filtré sur filtre de verre (GF/C₂₋₅ mm Whatman), lavé avec 15 ml de TCA et après par 15 ml d'ether acetone 3:1 (v/v), le filtre est ensuite déposé dans un tube contenant 5 ml de lipofluor (J.T. Baker Chemicals B.V. Deventer, Hollande).

3.12.3. Immunoprécipitation

- Formation d'immuncomplexes

Les immuncomplexes sont obtenus, après une incubation d'une nuit à 4°C, de 40 µl de protéines solubilisées de chacun des antigènes marqués (environ 100 000 cpm) auxquels est additionné l'anticorps monoclonal à étudier à raison de 20 µl de liquide d'ascite dilué au 1/10ème dans 1 ml de tampon d'adsorption (cf annexe 4).

Les différents témoins de la réaction sont traités dans les mêmes conditions ; ces contrôles incluent un liquide d'ascite sans activité T. gondii et des sérums de souris infectées et saines.

- Isolement des immuncomplexes

Le principe de cette réaction est basé sur la propriété de la protéine A de se lier d'une façon spécifique et réversible à la partie constante des immunoglobulines (KRONVALL et coll., 1970).

Les immuncomplexes sont mélangés avec 10 mg (poids sec) de protéine A sépharose (CL-HB, PHARMACIA, Uppsala-Suède) incubée préalablement avec 10 μ l d'antisérum spécifique des immunoglobulines de souris (NORDIC). Après 3 heures de contact à 4°C sous agitation rotative, la suspension est centrifugée 10 min à 200 g et le culot est lavé à plusieurs reprises avec 1 ml de tampon d'adsorption, jusqu'à ce que le surnageant soit dépourvu de radioactivité.

L'élution des immuncomplexes est effectuée par traitement du gel avec 40 μ l de tampon d'échantillon (cf annexe 5) et par chauffage pendant 3 min à 100°C. Une centrifugation de 5 min à 200 g permet de récupérer le surnageant qui est ensuite analysé en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

3.12.4. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide-SDS

Cette technique permet la caractérisation du poids moléculaire des fractions antigéniques étudiées ; cette technique est basée sur la propriété du sodium dodecyl sulfate SDS de dénaturer les protéines de façon à ce que la distance parcourue par les protéines soit fonction de leur poids moléculaire (LAEMMLI, 1971).

La séparation est effectuée dans un gel homogène de polyacrylamide 13 % contenant 0,1 % de SDS dans du tampon Tris-HCl 0,75 M à pH 8,8. Les dimensions du gel sont de 14 x 16 cm et 0,75 mm d'épaisseur. Le gel de concentration à 5 % de polyacrylamide dans du tampon Tris HCl 0,5 M à pH 6,8 contenant 0,1 % de SDS.

La teneur en protéines de chaque échantillon est préalablement déterminée par la technique de BIO-RAD (protein-Assay).

Les échantillons sont solubilisés dans 40 μ l de tampon Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 3 % SDS, glycerol 10 %, bleu de bromophenol 0,5 % et chauffés 3 min à 100°C, afin de dénaturer les protéines.

Les échantillons et les marqueurs de poids moléculaire (PHARMACIA) sont traités en même temps pour permettre une mesure de poids moléculaire dans ce système.

La migration dure 18 h à 6 mA dans le tampon Tris glycine pH 8,3 contenant du SDS à 1%.

Le gel est ensuite coloré dans une solution à 0,04 % de bleu de coomassie R-250 (Merck). La décoloration est faite dans une solution d'acide acétique à 8 % ; le gel est déposé sur papier Whatman n°1 (Whatman Ltd, UK) puis séché par évaporation sous vide dans un appareil de séchage type Pharmacia GSD-4.

- Autoradiographie

Le gel séché est exposé sur un film X-OMAT RP KODAK (Eastman Kodak Co, Rochester, NY) entre deux écrans renforçateurs (Dupont de Nemours), le temps d'exposition varie d'un à 8 jours à - 70°C.

- Fluorographie

Cette technique est utilisée pour augmenter la sensibilité de détection d'antigènes marqués par la methionine ³⁵S. Après coloration au bleu de Coomassie et décoloration par l'acide acétique, le gel est lavé dans l'eau distillée. Le gel est ensuite déshydraté par immersion dans deux bains successifs de 30 min de diméthylsulfoxyde (DMSO) et incubé pendant 3 h dans un bain de 2,5 diphenyloxasole (P.P.O.) à 10 % dans le DMSO.

Le PPO est ensuite précipité par lavage du gel à l'eau distillée, le gel ainsi traité est séché.

Pour la révélation des protéines marquées, le gel est exposé de 1 à 15 jours à - 70°C (LASKEY et MILLS, 1975) contre un film Kodak X-AR5 préalablement sensibilisé par un flash de lumière.

3.12.5. Technique d'immunoélectrotransfert

L'immunoélectrotransfert est une méthode qui permet d'analyser les différents composants d'un complexe antigénique reconnu directement par des anticorps monoclonaux marqués à l'¹²⁵I ou identifiés indirectement avec des antisérums spécifiques des immunoglobulines de souris marquées à la peroxydase.

L'antigène utilisé dans notre travail provient d'un extrait-détergent préparé à partir de parasites cultivés sur un tapis de cellules Hela. Les protéines de ce complexe antigénique préalablement séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (comme décrit dans le paragraphe 3.12.4.).

sont transférées électrophorétiquement suivant la méthode décrite par TOWBIN et Coll. (1979) sur une feuille de nitrocellulose (14 x 16 cm) (Schleicher A. Schüll, Dassel, RFA); cette dernière est laissée en contact quelques minutes avec le tampon de transfert (Tris 20mM, glycine 150 mM et méthanol 20 %). Le gel est aussitôt placé sur un morceau (14 x 18 cm) de papier Whatman N° 3 (Whatman Ltd, UK) préalablement immergé dans le même tampon et mis en contact direct avec la feuille de nitrocellulose sur laquelle une deuxième feuille de papier Whatman N°3 est placée. Ces différents éléments sont déposés entre 2 "scotchbrite" et placés dans un support plastique. L'ensemble est maintenu à l'aide d'une bande élastique et mis dans le Trans Blot Cell (Bio Rad, Richmond, CA, USA) de manière à ce que la feuille de nitrocellulose soit vers l'électrode positive ; le transfert est réalisé pendant 2 heures à 24 V et 0,5 A à 4°C.

La feuille de nitrocellulose est lavée 3 fois 15 min en tampon phosphate de sodium 0,01 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 à 0,3 % (PBS-Tween) et les sites restants sont saturés pendant 10 min en PBS contenant 4 % de sérum albumine bovine (BSA, Sigma, U.S.A.) puis 4 lavages de 10 min sont effectués en PBS-Tween.

La révélation directe consiste à incuber la feuille de nitrocellulose dans 30 ml de PBS-Tween contenant 5×10^5 cpm d'anticorps monoclonal préalablement purifié et marqué à ^{125}I suivant le protocole décrit dans le paragraphe 3.10.1 pendant une nuit à température ambiante sous agitation.

Après 4 lavages, la feuille de nitrocellulose est séchée et autoradiographiée sur un film Kodak X-OMAT X-AR 5 (Eastman Kodak Co Rochester NY USA) entre deux écrans renforceurs (Dupont de Nemours) de 24 à 72 h à - 70°C.

La révélation indirecte est effectuée suivant la méthode de TSANG et coll. (1983). Après 3 h d'incubation de la feuille de nitrocellulose avec les sérums dilués au 1/100ème ou avec les anticorps monoclonaux (liquide d'ascite) dilués au 1/500ème, elles sont lavées 3 fois en PBS-Tween et incubées 1h en présence d'antisérum spécifique d'immunoglobulines de souris préparés chez la chèvre et marqués à la peroxydase (GAM/Ig Fab/PO NORDIC) dilués au 1/1000ème. Après 3 lavages en PBS-Tween, les feuilles sont révélées en quelques min par la solution contenant le substrat enzymatique, 100 mg de 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma) dans 100 ml de PBS + 100 μ l d' H_2O_2 à 30 % (Merck, Darmstadt, RFA).

Lors des réactions positives apparaît une ou des bandes de couleur marron correspondant à l'antigène reconnu.

Les feuilles de nitrocellulose sont rincés à l'eau distillée et photographiées tant qu'elles sont mouillées.

Les marqueurs de poids moléculaire sont directement colorés sur la feuille de nitrocellulose pendant 5 min avec le bleu de Coomassie à 0,025 % en méthanol, acide acétique, eau (5 : 1 : 5 v/v) et décolorée dans le solvant.

3.12.6. Détection immunoenzymatique en microscopie électronique

Un tapis de cellules Hela développé sur lamelle plastique (Termanox, 9 x 35 mm) en tube de Leighton est infecté avec 2×10^6 tachyzoïtes d'ascite pendant 6 h à 37°C en milieu MEM.

La lamelle est ensuite fixée par une solution contenant 2 % de paraformaldehyde, et 15 % d'acide picrique en tampon phosphate 0.1 M à pH 7.4 pendant 1 h. Après un rinçage pendant 16 h dans le même tampon et

à 4°C, la lamelle est imprégnée par le glycérol à 10 % en PBS et congelée dans l'azote liquide. Elle est ensuite incubée 1h avec l'anticorps monoclonal dilué au 1/25ème en PBS, puis rincée extensivement en PBS pendant 30 min. La lamelle est alors incubée pendant 1 h avec un antisérum spécifique des Ig de souris (fraction Fab) préparé chez la chèvre et marqué à la peroxydase (NORDIC), dilué au 1/40ème en PBS ; après lavage en PBS, la lamelle est fixée par la glutaraldéhyde à 2.5 % (v/v) dans le PBS.

L'activité peroxydasique est révélée par la diaminobenzidine à 0,5 mg/ml en tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7.4 additionné de 2 µl/ml d'H₂O₂ (110 volumes) pendant 3 min. La lamelle est ensuite post-fixée par le tétroxyde d'osmium à 2 % en tampon phosphate 0,1 M pendant 2 h ; la lamelle est déshydratée par immersion dans des concentrations croissantes d'alcool et l'inclusion est réalisée en épon.

Les coupes ultrafines sont observées sans coloration au microscope électronique JEOL 120 CX.

3.13. Test de compétition en SRIA

Le test, inspiré des travaux de MITCHEL et coll. (1981), a été mis au point pour trois objectifs précis :

- 1) La comparaison de la spécificité antigénique des anticorps monoclonaux entre eux .
- 2) La recherche dans des sérums d'infection humaines d'anticorps ayant la même spécificité antigénique que les anticorps monoclonaux produits.
- 3) Etablir la spécificité anti-T. gondii des anticorps monoclonaux produits vis-à-vis de sérums d'infection autre que la Toxoplasmose.

Principe. Le test est une modification de la technique radioimmunologique en phase solide (SRIA) qui a comme principe la mise en évidence d'une compétition entre l'anticorps monoclonal marqué à l'¹²⁵I et d'autres

anticorps (polyclonaux ou monoclonaux) non marqués. Cette réaction s'effectue vis-à-vis des sites de fixation de l'antigène adsorbé sur un support solide.

Protocole. Le support est représenté par des billes de polystyrène de 6.5 mm de diamètre (SEROA - rue de l'Industrie - Monaco). L'antigène est adsorbé à la concentration choisie et incubé avec 200 μ l de chaque dilution du matériel à tester (sérum d'infection, liquide d'ascite, surnageants de culture). Aussitôt, chaque tube reçoit 200 μ l de la dilution préétablie de l'anticorps monoclonal marqué à ^{125}I (cf. Paragraphe 3.10.1.) Après 3 heures d'incubation à température ambiante, les billes sont lavées 3 fois en tampon PBS-tween 0.4 % afin d'éliminer l'anticorps marqué non fixé. Le contrôle positif, correspondant à 100 % de la réaction, provient de la réaction directe de l'anticorps marqué sur l'antigène ; les contrôles négatifs (sérum humain normal, ascite sans spécificité anti-T. gondii, surnageants de culture de cellules de myélome) sont inclus dans toutes les réactions. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fixation (moyenne arithmétique de deux expériences) de l'anticorps monoclonal marqué vis-à-vis de l'antigène et la quantité d'anticorps sériques est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps monoclonal fixé à l'antigène.

Dans un second temps, le support est mis en incubation avec un anti-sérum spécifique d'immunoglobulines humaines de classe G ou M préparées chez la chèvre et marquées à la β -galactosidase (ZIMED) dans le but de définir les classes d'immunoglobulines impliquées dans la réaction.

Annexe 1

HANKS-WALLACE Solution

(NaCl)	8.0 g
(KCl)	0.4 g
(CaCl ₂ -2H ₂ O)	0.25 g
(MgSO ₄ -7H ₂ O)	0.20 g
(Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O)	0.15 g
(KH ₂ PO ₄)	0.06 g
(NaHCO ₃)	0.98 g
Glucose	1.00 g
Eau distillée qsp	1 l

Tampon véronal 0.08 M ; pH 8,2

Véronal sodique (Merck 6318) 16 g

HCl N 22 ml

Eau distillée qsp 1 l

Tampon PBS-IFI 0.135 M ; pH 7.4

A. Na₂HPO₄ 2H₂O 60 g

NaH₂PO₄ H₂O 13.8 g

Eau distillée qsp 1 l

40 ml de A + 960 ml de NaCl 0.9 % (p/v) en eau distillée

Annexe 2

Nature	Composition	Utilisation
MEM EAGLE	KCl	400 mg/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	242.5
	NaCl	6800
	NaHCO ₃	2000
	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1583
	Glucose	1000
	Rouge de phénoï	17
MILIEU A	Milieu DMEM ^a 4 x 10 ⁻³ M NaHCO ₃ 3,5 % AANE ^b 15 % SVF ^c 100 IU/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,2 - 7,3	Culture des cellules myéломateuses et hybrides
MILIEU B	Milieu DMEM ^a 4 x 10 ⁻³ M NaHCO ₃ 25 mM HEPES 100 UI/ml penicilline 50 µg/ml streptomycine pH 7,3	Fusion cellulaire
MILIEU HAT	Milieu A contenant : 1 x 10 ⁻⁴ M hypoxanthine 4 x 10 ⁻⁴ M aminoptérine 1,6 x 10 ⁻⁵ M thymidine	Sélection des hybrides cellulaires
MILIEU HT	Milieu HAT sans aminoptérine	Culture des cellules hybrides (transition entre le milieu HAT et le milieu A)

^a DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 4,5 g/l de glucose (Gibco, USA)

^b AANE : acide aminé non essentiel (GIBCO, USA)

^c SVF : sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage 1 h à 56°C

Annexe 3

Tampon phosphate 1 M pH 7,2

Solution mère :

Solution A : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 358,14 g/l

Solution B : $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 156,01 g/l (acide)

Mélanger \approx 72 % de solution A et 28 % de solution B pour obtenir un pH = 7,2

a) Tampon : PBS 0,01 M

- 10 ml de la solution mère tampon phosphate pH 7,2
- 9 g NaCl
- qsp 1 litre d'eau distillée

b) Tampon PBS-Azide 0,01 M

- 10 ml de la solution-mère tampon phosphate pH 7,2
- 9 g NaCl
- 0,2 g azide
- qsp 1 litre d'eau distillée

c) Tampon PBS-Tween 0,01 M

- 10 ml de la solution mère tampon phosphate pH 7,2
- 9 g NaCl
- 0,5 ml Tween 20
- qsp 1 litre d'eau distillée

d) Tampon phosphate citrate pH 5,5-0,1 M

- 100 ml de la solution mère Tampon phosphate pH 7,2
- 900 ml d'eau distillée

Ajuster à pH 5,5 avec de l'acide citrique 0,1 M

Annexe 4

Tampon de lyse

Tris	0,01 M -pH 6,8
NaCl	0,3 M
Nonidet	0,5 % (v/v)
Aprotinine	100 U/ml
PMSF	1 mM

Tampon adsorption

Tris	10 mM pH 7,4
EDTA	2 mM
Nonidet	0,5 % (v/v)
NaCl	0,15 M
Aprotinine	100 U/ml
PMSF	1 mM

Tampon TNSTE

Tris	5 mM pH 7,4
NaCl	0,15 M
SDS	0,3 % (p/v)
Triton	1,7 % (v/v)
EDTA	2 mM pH 7

Tampon TNTE

Tris	5 mM - pH 7,4
NaCl	0,15 M
Triton	2 %
EDTA	2 mM

Annexe 5

Gel de concentration 5 % SDS-PAGE

A) Acrylamide	5 g
Bis-acrylamide	0,133 g
SDS	0,1 g
Tris HCl 0.5 M pH 6,8	25 ml
Eau distillée	100 ml

7,5 ml A + 4,5 μ l Temed + 45 μ l ammonium peroxidisulphate 10 %

Gel d'analyse 13 % SDS-PAGE

A) Acrylamide	13 g
Bis-acrylamide	0,35 g
SDS	0,1 g
Tris HCl 0,75 M pH 8,8	50 ml
Eau distillée	qsp 100 ml

30 ml A + 15 μ l Temed + 100 μ l ammonium peroxidisulphate 10 %

B) Colorant bleu Coomassie SDS-PAGE

Bleu de Coomassie brillant	0,85 g
Acide acétique	50 ml
Méthanol	250 ml
Eau distillée	250 ml

Tampon échantillon

Tris HCl pH 6.8	62,5 mM
SDS	3 %
Sucrose	10 %
Bleu de bromophéno	0,005 %

Annexe 6

Tampon epsilon

Tris	12 g
NaCl	100 g
HCl (pur)	5 ml
Acide epsilon aminocaproic	6,55 g
Eau distillée	5 l

CHAPITRE IV

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. Production d'anticorps monoclonaux anti-T. gondii

4.1.1. Infection

L'étude de la cinétique d'apparition des anticorps sériques, lors de l'infection expérimentale avec la souche chronique de T. gondii chez la souris, a été effectuée en immunofluorescence indirecte (I.F.I.).

Une réponse d'infection apparaît dès la 2ème semaine ; les titres d'I.F.I. augmentent progressivement et aux alentours de la 4ème semaine ils restent supérieurs à 1/450ème.

L'utilisation du système d'infection semble être la meilleure voie d'obtention d'anticorps spécifiques à activité biologique pour la technique de fusion cellulaire. L'observation est confortée par le parallélisme existant entre l'activité des anticorps produits et l'évolution de phénomènes immunitaires chez l'animal infesté.

4.1.2. Hybridation

Nomenclature. Afin de faciliter l'identification de chacun des hybrides, nous avons choisi d'une façon arbitraire, la nomenclature suivante : une lettre pour indiquer le numéro de fusion rapportant donc le jour d'infection avant l'hybridation ; un nombre cardinal pour l'alvéole correspondant aux plaques de culture cellulaires et un dernier nombre cardinal pour chacun des clones issus de cellules d'une alvéole donnée (exemple : B 41/56).

4.1.2.1. Première hybridation. La première hybridation réalisée avec la souris après 36 jours d'infection a permis l'obtention de 65 alvéoles contenant des hybrides viables, ce qui représente un rendement de fusion de 55 % apprécié par le rapport du nombre d'alvéoles présentant un développement cellulaire sur le nombre total des alvéoles analysées après fusion.

La technique d'I.F.I. sur les tachyzoïtes a conduit à l'identification de 15 populations cellulaires hybrides sécrétant des anticorps anti-T. gondii ce qui correspond à 12,5 % des hybrides cellulaires obtenus (tableau 2).

Dans tous les cas, une fluorescence intense est révélée au niveau de la surface des tachyzoïtes.

L'étude du contenu immunoglobulinique des surnageants, manifestant une activité anti-T. gondii, a été effectuée en double diffusion en gel d'agarose.

Trois isotypes sont représentés IgG1, IgG2b et IgG3. La participation importante des immunoglobulines de la classe G peut s'inscrire dans la dynamique de l'infection.

4.1.2.2. Deuxième hybridation. La deuxième hybridation, réalisée avec des lymphocytes de souris au bout de 14 jours d'infection a permis l'obtention de 153 alvéoles contenant des hybrides viables (50 % des alvéoles originales) ; seulement 3 hybrides se sont révélés positifs : le C5/12 est positif en I.F.I.-IgM (++) , le C4/14 et le C10/18 sont positifs en E.L.I.S.A. (densité optique = 0,800 et 1,400 respectivement pour une densité optique de 0,240 dans les contrôles négatifs).

Les trois hybrides appartiennent à la classe M des immunoglobulines.

TABLEAU 2 : Première hybridation: surnageants positifs en I.F.I. vis-à-vis de T. gondii.

Hybride	I.F.I. (tachyzoïtes fixés)
B5	+++++
B28	+
B39	+
B41	+++
B70	++
B76	++
B77	+
B81	+
B88	+
B95	+
B115	+
B117	+++
B132	++
B134	++
B143	+++++
T* -	-

T* = témoin (surnageant de culture des cellules myélomateuses)

4.1.2.3. Troisième hybridation. La troisième hybridation effectuée avec des lymphocytes de souris ayant 21 jours d'infection, a permis l'obtention de 171 alvéoles contenant des hybrides viables (80 % des alvéoles originales) ; seulement 9 de ces hybrides présentaient des surnageants positifs vis-à-vis de T. gondii. Des 9 hybrides sécrétant des anticorps anti-T. gondii, 5 sont de la classe IgM, 2 de la classe IgG3, un de la classe IgG1 et le dernier est de la sous-classe IgG2a (tableau 3).

4.1.3. Caractérisation et purification des anticorps monoclonaux

* A - L'étude du contenu immunoglobulinique des surnageants, manifestant une activité anti-T. gondii, a été réalisée par double diffusion en gel d'agarose.

Des 12 clones d'hybrides stables, trois isotypes sont particulièrement bien représentés : les IgG1, les IgG2b et les IgM ; il faut noter que les clones de la classe IgG1 d'une part et les clones de la classe IgG2b d'autre part sont issus du même puits de départ. Par contre, les hybrides de la classe IgM proviennent de deux manipulations différentes (14 et 21 jours d'infection).

Dans ce travail, la connaissance de l'isotype des anticorps monoclonaux produits présente deux aspects importants qui sont :

- . Le choix de la ou des méthode(s) de purification de l'anticorps monoclonal ;
- . La prédiction des propriétés biologiques des anticorps monoclonaux ; ces propriétés seront importantes pour l'interprétation des résultats.

* B - La méthode que nous employons dans le présent travail pour la purification des anticorps monoclonaux est satisfaisante du point de vue du rendement : on prépare à partir d'un ml d'ascite 6 à 8 mg d'anticorps purifiés. Ce résultat est semblable à celui obtenu par d'autres auteurs (GALFRE et MILSTEIN, 1981).

TABLEAU 3 : Troisième hybridation : Surnageants positifs en I.F.I. et E.L.I.S.A. vis-à-vis de T. gondii.

Hybrides	I.F.I. (tachyzoïtes fixés)	E.L.I.S.A. (antigène soluble standard)
D 2/17	+++	-
D 2/18	+++	-
D 3/9	±	+
D 3/12	±	+
D 3/14	++	+
D 4/5	+	+
D 4/21	-	+
D 5/18	±	+
D 9/3	++	-
T*	-	-

T* = témoin (surnageant de culture des cellules myélomateuses)

Par contre, cette méthode semble être néfaste pour la conservation de l'activité anticorps de certains de nos hybrides. Il est possible que ces anticorps soient plus "sensibles" aux conditions de purification (par exemple : décongélation, traitement au sulfate d'ammonium, dilution sur la colonne échangeuse d'ions, etc...). Les raisons de cette fragilité dérivent vraisemblablement de changements dans la structure physico-chimique des anticorps monoclonaux par rapport aux immunoglobulines "normales".

4.1.4. Activité biologique "in vitro" des anticorps monoclonaux

Disposant d'anticorps qui présentent une activité anti-Toxoplasma décelable en I.F.I. et en E.L.I.S.A. il était important de réaliser une étude de leurs activités biologiques à l'aide du test classique de SABIN et FELDMAN : "Dye-Test".

Comme le montre le tableau 4, trois manipulations différentes ont donné des résultats concordants. Nous pouvons observer que les clones producteurs d'immunoglobulines de classe IgG ont montré un important effet cytotoxique (titre \geq à 1/32000^{ème}) vis-à-vis des parasites ; 90 à 95 % d'une population de T. gondii est tuée in vitro lorsqu'elle est incubée avec des anticorps spécifiques. Cette cytotoxicité anti-parasitaire ne s'exprime qu'en présence de facteur accessoire humain (probablement le complément).

Pour chaque expérience, nous avons utilisé des témoins de réaction, traités dans les mêmes conditions.

4.1.5. Discussion

Les variations dans le rendement des fusions cellulaires s'expliquent par les divers facteurs mis en jeu : état physiologique des cellules au

Tableau 4. Dye-test - Facteur accessoire humain

TITRE FINAL			
	1er test	2ème test	3ème test
Ascite "58" IgG1	»1/8192	1/16064 (33 % à 1/32128)	1/32000
Ascite "56" IgG1	»1/8192	1/16064	1/16000
Ascite "54" IgG2b	»1/8192	1/8032	1/8000
Ascite "62" IgG2b	»1/8192	1/16064	1/16000
3D ₁₄ "59"	NEG. (< 1/4)	/	/
3D ₁₄ "19"	NEG. (< 1/4)	/	/

moment de la fusion, stade de maturation des lymphocytes spléniques (ANDERSON et MELCHER, 1978), conditions de la fusion cellulaire, efficacité du tapis de cellules nourricières, etc...

La discordance observée entre la réactivité en I.F.I. et en E.L.I.S.A. de la population cellulaire hybride, pourrait être due aux différents traitements des substrats antigéniques : pour l'I.F.I., les tachyzoïtes sont fixés au formol, pour l'E.L.I.S.A., nous avons utilisé un extrait antigénique soluble. En effet, certains antigènes de structures ne semblent pas être présents dans l'antigène soluble.

Concernant l'activité biologique in vitro un composant thermolabile du sérum humain, appelé communément "facteur accessoire" ou "activateur" est nécessaire pour permettre aux anticorps monoclonaux de sous-classe IgG d'acquérir des capacités cytotoxiques in vitro dans le test de SABIN et FELDMAN : "Dye-test".

Ces résultats de toxoplasmolyse à l'aide des anticorps monoclonaux de sous-classe IgG sont comparables et même supérieurs à ceux obtenus avec des sérums humains riches en anticorps anti-T. gondii. Chez l'homme, ce "dye-test" reflète surtout l'évolution des immunoglobulines de classe IgG ; les immunoglobulines de classe IgM spécifiques et naturelles interviennent peu. Ainsi les résultats négatifs obtenus avec les anticorps monoclonaux de sous-classe IgM pourraient alors s'expliquer.

Cette activité cytotoxique in vitro des anticorps monoclonaux de sous-classe IgG ne s'exerce pas, vis-à-vis de tachyzoïtes vivants, lorsque le "facteur accessoire" humain (sérum humain) est remplacé par du sérum de souris Balb/C. Les faibles concentrations de complément dans le sérum de souris (7 UI/ml) pourraient expliquer ces résultats négatifs ; en effet, le sérum humain contient en moyenne 100 à 150 UI/ml.

Le tableau 5 résume les différentes caractéristiques concernant ces anticorps monoclonaux.

TABLEAU 5 : Caractérisation sérologique des anticorps monoclonaux anti-T. gondii.

Clone	Isotypes	Dye-Test	Hémagglutination passive	I.F.I. tachyzoïtes		E.L.I.S.A. antigène soluble standard	Antigène reconnu Kd
				fixés au formol	Vivants		
B 41/49	IgG1		Neg	+	+	Nég	30
B 41/56	IgG1	1/16064	1/10	+	+	Neg	30
B 41/58	IgG1	1/16064	1/10	+	+	Nég	30
B 132/15	IgG2b			+		Nég	
B 132/25	IgG2b			+		+	
B 132/35	IgG2b			+		Nég	
B 132/44	IgG2b			+		Nég	
B 132/54	IgG2b	1/8192	Nég	+	+	Nég	30
B 132/62	IgG2b	1/16064	Nég	+	+	Nég	30
D 3/14/19	IgM	Nég	Nég	+	faible	+	22
D 3/14/59	IgM	Nég	Nég	+	faible	+	94

4.2. DETECTION ET CARACTERISATION DES ANTIGENES DES TACHYZOITES PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX PRODUITS

Les populations hybrides sécrétant des immunoglobulines de classe IgG, étudiées par immunofluorescence indirecte, induisent une intense fluorescence qui traduit la présence d'anticorps dirigés contre la surface de tachyzoïtes. Nous avons pu déceler des réactions positives entre les anticorps monoclonaux et le parasite vivant, ce qui confirme une réactivité située au niveau membranaire (Figure 4).

Les antigènes reconnus par les anticorps monoclonaux ont été identifiés, d'une part par immunoprécipitation d'antigènes marqués et d'autre part, par la technique d'immunoélectrotransfert.

4.2.1. Immunoprécipitation

Nous avons utilisé des tachyzoïtes marqués en surface par ^{125}I ou marqués métaboliquement par la méthionine ^{35}S .

4.2.1.1. Identification d'antigènes de surface

Le profil autoradiographique des antigènes membranaires de tachyzoïtes iodés par la méthode de la lactoperoxydase et solubilisés par un détergent non ionique montre après analyse en gel de polyacrylamide-SDS, 3 molécules majeures avec un poids moléculaire apparent de 43 Kd, 30 Kd et 22 Kd et deux molécules mineures de 35 Kd et 14 Kd (figure 5, piste Surf*).

La spécificité des anticorps monoclonaux a été démontrée par immunoprécipitation de l'extrait détergent de parasites marqués, incubé avec les différents anticorps monoclonaux ; les immunocomplexes ont été précipités avec un immunosérum anti-Ig de souris lié à la Protéine A sépharose.

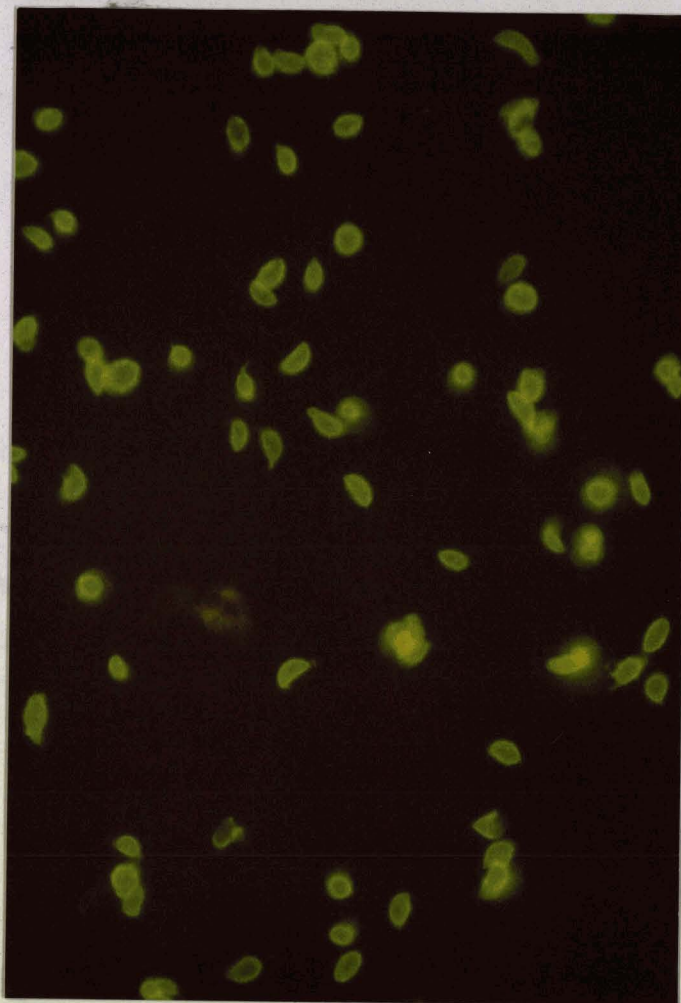


Figure 4 : Réaction d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.) produite par un anticorps monoclonal B41/58 dirigé contre la surface de T. gondii.

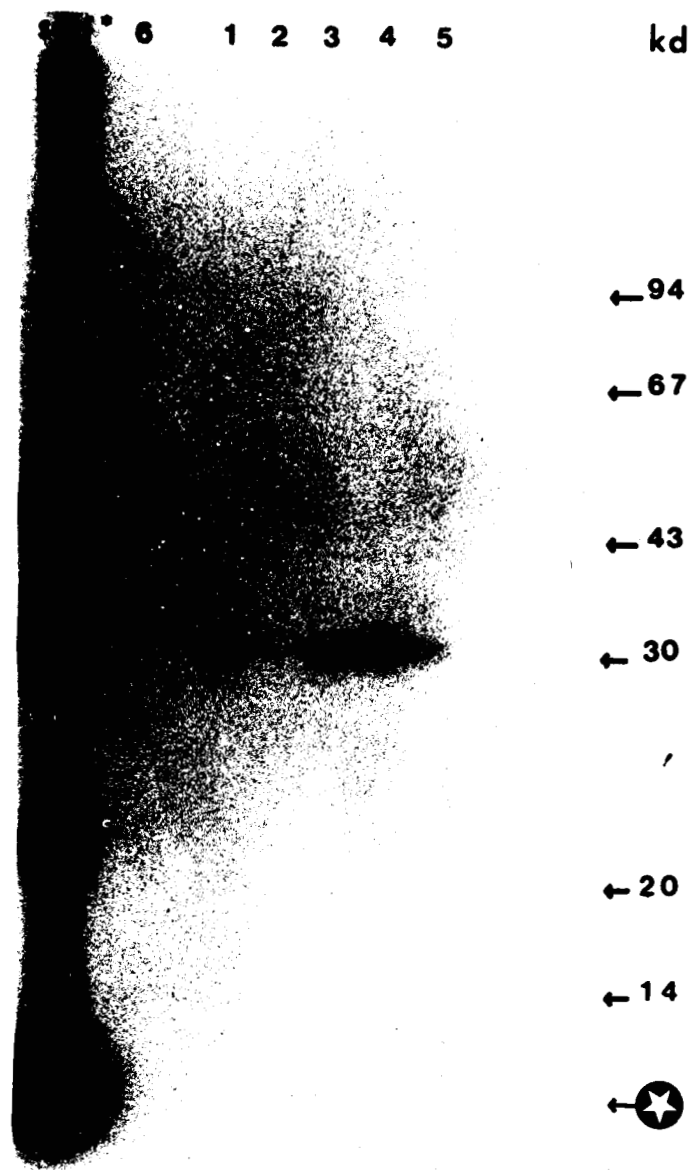


FIGURE 5

Le complexe précipité est analysé en gel de polyacrylamide. Nous pouvons observer sur la figure 5 que les anticorps monoclonaux B 41/49 (piste 1) ; B 41/56 (piste 3) et B 41/58 (piste 4) (correspondants à la sous-classe IgG1) et B 132/54 (piste 2) ; B 132/62 (piste 5) (sous-classe IgG2b) reconnaissent uniquement la molécule 30 Kd ; une des trois molécules majeures marquées par 125 Iode à la surface des tachyzoïtes. Le poids moléculaire de l'antigène membranaire isolé avec l'anticorps monoclonal B 41/58 (27 Kd) diffère légèrement quand l'électrophorèse est réalisée en condition de réduction avec le 2 mercapto-éthanol (30 Kd), comme le montre la figure 6, piste 4'. Dans toutes nos expériences les contrôles négatifs sont des ascites qui n'ont aucune activité anti-T. gondii (Figure 5 ; piste 6).

4.2.1.2. Marquage métabolique

Le marquage des protéines de T. gondii par incorporation de la méthionine 35 S, montre un profil complexe. Il semble exister une légère différence entre les tachyzoïtes après marquage intra ou extracellulaire au niveau des bandes correspondant à un poids moléculaire de 144, 116 et 56 Kd. Elles ne sont présentes qu'après marquage intracellulaire des tachyzoïtes ; les autres étant communes.

Les immuncomplexes, formés après incubation d'un extrait de tachyzoïtes intra- ou extracellulaires marqués avec les anticorps monoclonaux de classe IgG, sont isolés par adsorption sur protéine A Sepharose. Après élution, les immuncomplexes dissociés sont analysés en gel de polyacrylamide-SDS. Après fluorographie, une bande d'environ 30 Kd est identifiée dans les deux cas (marquage intra et extracellulaire) (figure 7 ; piste 4-I et 4-II). Par ailleurs quand nous comparons sur le même gel, la migration des extraits antigéniques immuno-précipités avec l'anticorps monoclonal après marquage métabolique ou de surface, la position de la bande coïncide dans les deux cas ; ce résultat est obtenu, lorsque l'électrophorèse est réalisée en présence ou en absence d'agent réducteur.

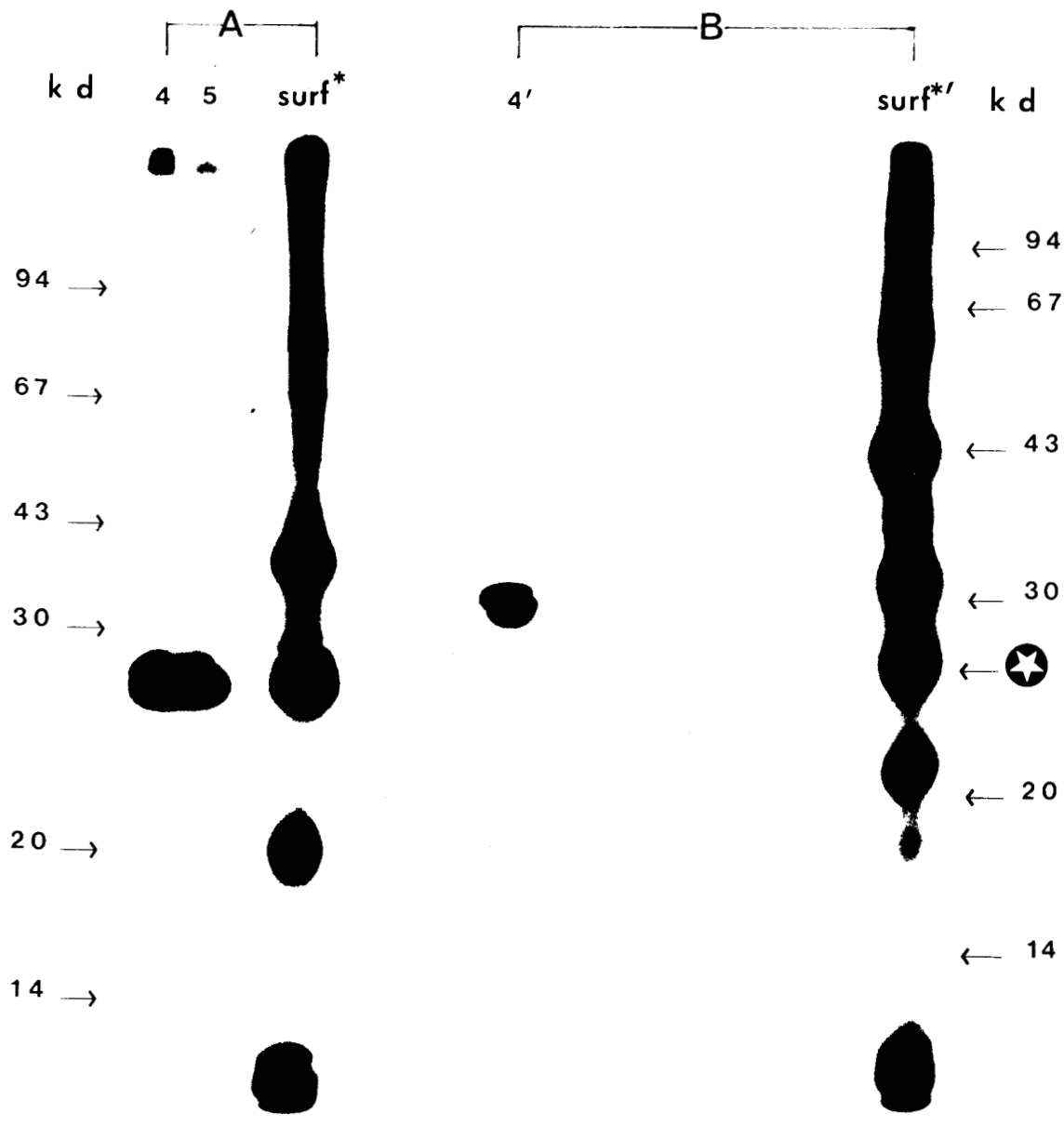


FIGURE 6

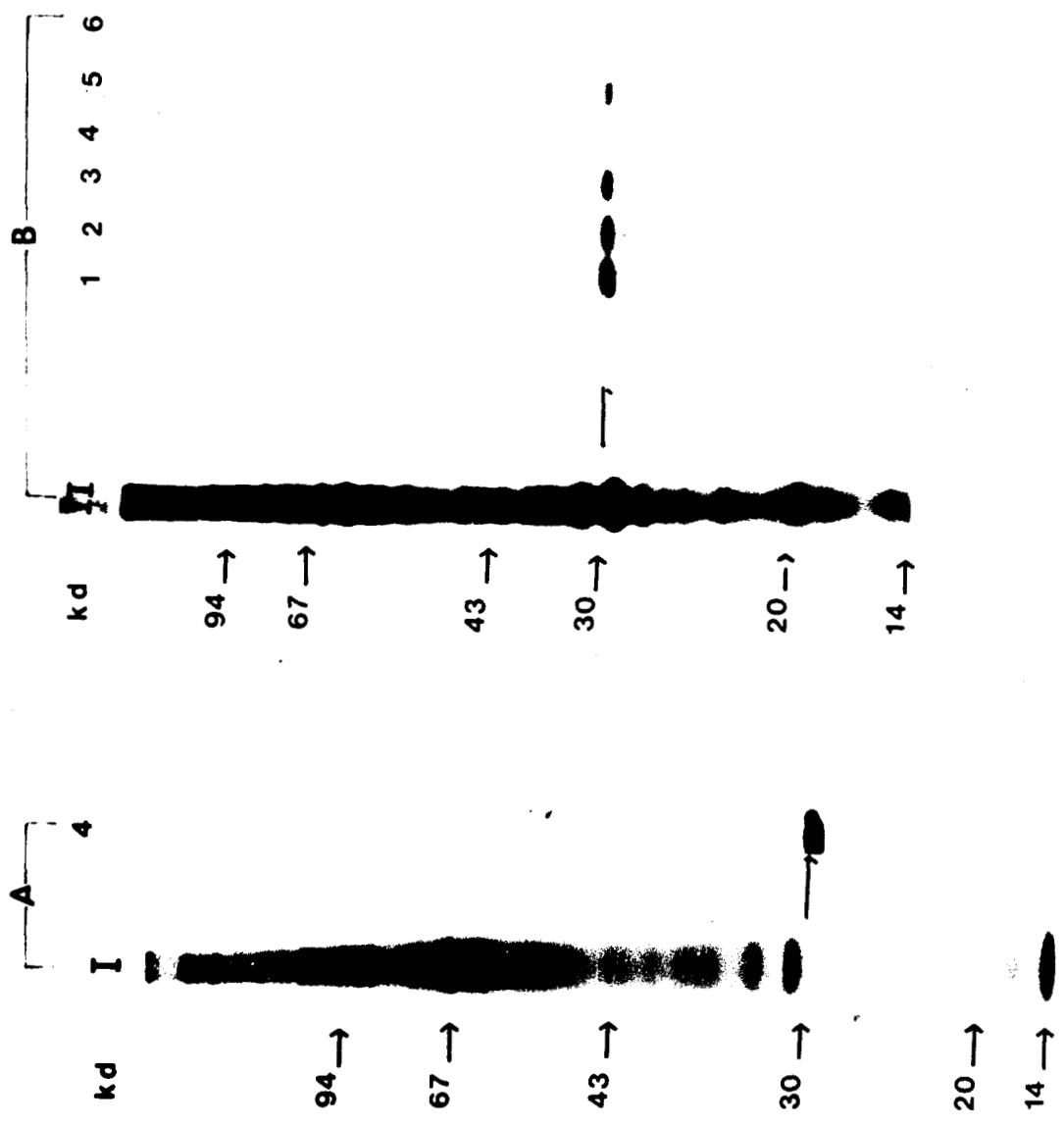


FIGURE 7

4.2.2. Immunoélectrotransfert

La technique de transfert (Western-Blotting), utilisée pour l'identification d'antigènes de T. gondii séparés électrophorétiquement en gel de polyacrylamide-SDS, a été utilisée avec 7 de nos anticorps monoclonaux. Nous avons ainsi, d'une part, confirmé la spécificité antigénique reconnue par les anticorps de classe IgG, et d'autre part, caractérisé le poids moléculaire des antigènes reconnus par les anticorps de classe IgM. Les anticorps monoclonaux de classe IgG se fixent sur un antigène de 30 Kd (figure 8 ; piste B). Par contre, pour les anticorps de classe IgM, provenant du même puits d'hybrides de départ, l'un d'entre eux (D3/14/19) reconnaît faiblement un antigène de 22 Kd et un autre (D3/14/59) identifie un antigène de 94 Kd, comme le montre la figure 8 (pistes A-C).

4.2.3. Discussion

4.2.3.1. Immunoprécipitation des protéines de surface

Les antigènes qui jouent un rôle important dans la réponse immunologique sont sans doute ceux de surface. Un procédé simple d'identification des antigènes de la membrane des tachyzoïtes est la radioiodination enzymatique, catalysée par la lactoperoxydase, qui permet de fixer l'Iode radioactif sur les résidus tyrosine des chaînes polypeptidiques (MARCHALONIS, 1971). Un nombre très faible de protéines iodées, majeures de surface, a été mis en évidence chez les zoïtes. Ceci signifie en fait qu'il existe peu de protéines à résidus tyrosyl accessibles à la surface des zoïtes, sans pour autant préjuger de l'existence d'autres protéines de surface pauvres en cet acide aminé.

Une des 3 protéines majeures de surface est reconnue par nos anticorps monoclonaux de classe IgG et son poids moléculaire apparent est de 30 Kd.

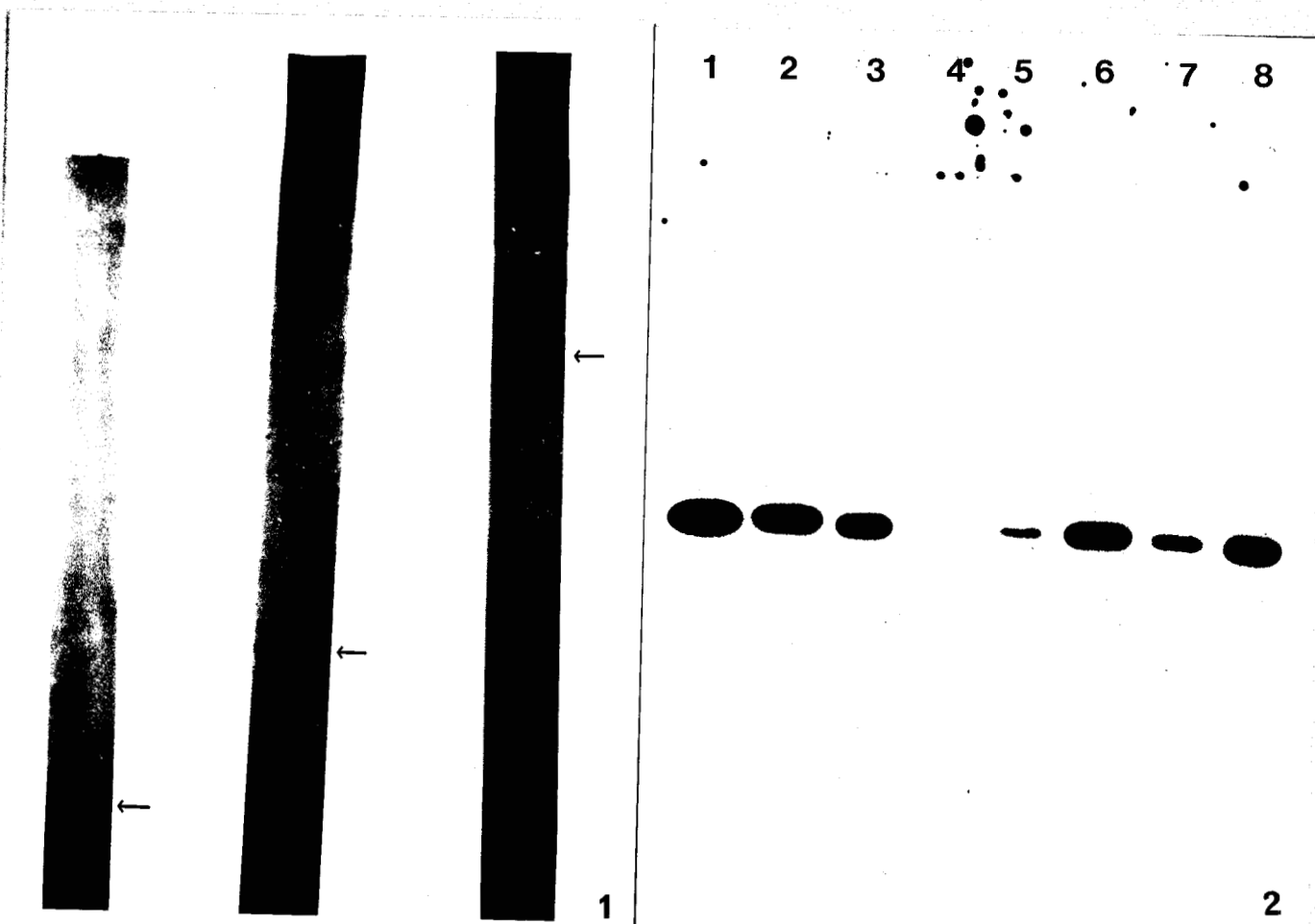


FIGURE 8 : Immunoélectrotransfert des antigènes d'un extrait soluble reconnu par les anticorps monoclonaux :

1. Révélation indirecte

A : D3/14/19 (———> 22 Kd)

B : B41/58 (———> 30 Kd)

C : D3/14/59 (———> 94 Kd)

2. Révélation directe

1. B41/58

5. B132/54

2. B41/58

6. B41/56

3. B41/58

7. B41/58

4. B41/49

8. B132/62

Lorsque l'analyse électrophorétique est réalisée en présence d'un agent réducteur, la mobilité est légèrement plus faible ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de ponts disulfures intrachainés ; hypothèse déjà avancée par Kasper et coll. (1983).

4.2.3.2. Marquage des protéines cytoplasmiques

La structure antigénique de T. gondii, après marquage métabolique, est complexe. Par rapport au marquage de surface, de très nombreuses bandes sont révélées dans les poids moléculaires les plus élevés.

Différentes analyses autoradiographiques ont montré que les anticorps monoclonaux de sous-classe IgG identifient une bande intense à 30 Kd, ce qui montre que la molécule est biosynthétisée par le tachyzoïte, dans nos conditions de marquage. De plus, cet antigène est également synthétisé par les tachyzoïtes extracellulaires, bien que ces derniers soient loin d'être dans des conditions métaboliques optimales : T. gondii ne peut se multiplier qu'en situation intracellulaire. Le fait que cet antigène d'une part et la molécule de surface iodée d'autre part migrent de façon identique et sont tous deux reconnus par le même anticorps monoclonal, laissent supposer qu'ils correspondent à deux chaînes polypeptidiques identiques.

Etant donné que la biosynthèse de l'antigène de 30 Kd existe dans les deux stades de génèse du parasite, nous avons choisi, pour notre travail, le marquage de tachyzoïtes extracellulaires en raison de leur facilité d'obtention et d'un meilleur rendement de marquage.

4.2.3.3. Immunoélectrotransfert

L'analyse des antigènes, séparés et transférés électrophorétiquement, peut dans certains cas s'avérer plus sensible et plus précise que l'immunoprécipitation ou donner un complément d'information sur les antigènes reconnus. Elle nous a permis de caractériser les antigènes reconnus par les

anticorps monoclonaux de classe IgM que nous n'avons pas réussi à identifier par immunoprécipitation. D'autre part, nous avons également utilisé cette technique car elle est plus simple et plus accessible puisqu'elle ne requiert pas d'éléments radioactifs et est donc ainsi applicable dans un grand nombre de laboratoires. Cette considération est importante quant aux éventuelles applications diagnostiques des anticorps monoclonaux.

4.3. UTILISATION DE L'ANTICORPS MONOCLONAL A DES FINS FONDAMENTALES ET APPLIQUEES

4.3.1. Distribution de l'antigène 30 Kd de surface

Nous avons utilisé l'anticorps monoclonal pour analyser la distribution de l'antigène de surface 30 Kd chez les tachyzoïtes de T. gondii par immunofluorescence et immunoperoxydase indirectes. Nous avons ainsi pu montrer une répartition uniforme de l'antigène à la surface des tachyzoïtes extra- et intracellulaires quelque soit le stade de génèse (figure 9). Nous n'avons pas obtenu de marquage intracytoplasmique des zoïtes.

4.3.2. Interaction anticorps-tachyzoïte vivant

L'immunodétection a également été utilisée pour essayer d'analyser la dynamique de l'interaction anticorps-zoïte. L'incubation de tachyzoïtes vivants dans un milieu contenant un anticorps monoclonal anti-30 Kd entraîne un revêtement uniforme des organismes par des immunoglobulines. Ce revêtement n'est pas redistribué lors de l'incubation à 37°C, contrairement à ce qui intervient lorsque des tachyzoïtes sont incubés dans un sérum immun (sérum de souris infestée), où un "capping" postérieur typique des anticorps est obtenu.

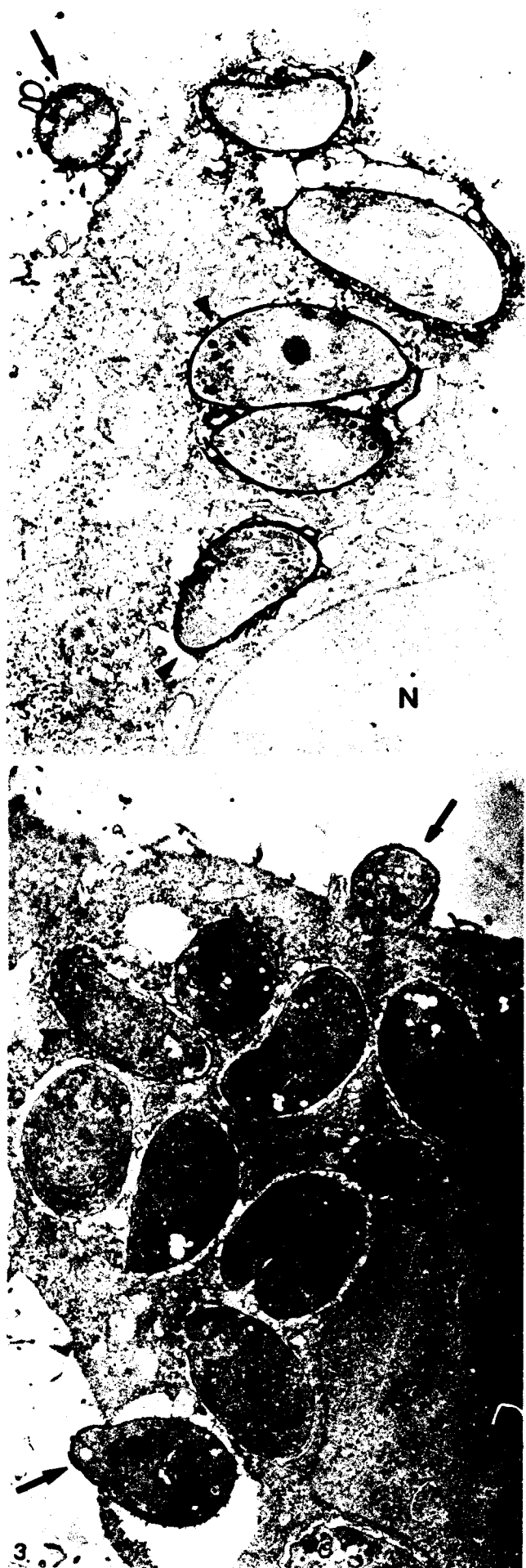


FIGURE 9

Des tachyzoïtes recouverts par l'anti-30 Kd sont encore capables d'envahir des cellules HeLa et de s'y multiplier dans ces conditions. L'immuno-détection montre que les tachyzoïtes perdent une large part de leur revêtement d'anticorps lors de l'invasion (au niveau de la jonction mobile responsable de l'entrée du parasite dans la cellule hôte).

4.3.3. Essai d'analyse de la biosynthèse de la molécule 30 Kd

L'immunoprécipitation de la protéine 30 Kd, biosynthétisée en présence de ³⁵S méthionine, avait été obtenue avec un marquage d'une durée de 60 min (voir 4.2.1.2.). Afin d'analyser les voies de biosynthèse de cette molécule nous avons procédé à des marquages plus courts ; par ailleurs, un essai préliminaire de protéolyse de la protéine de surface a été entrepris.

L'immunoprécipitation des extraits antigéniques, après marquage de 5 min. ou 30 min. présente une bande unique de poids moléculaire 30 Kd et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autre molécule immunoprécipitable par l'anticorps monoclonal anti-30 Kd (figure 10).

Outre l'étude de la synthèse de la protéine 30 Kd, nous avons envisagé l'analyse de l'insertion de cette molécule dans la membrane plasmique des tachyzoïtes. Dans ce but, nous avons incubé des tachyzoïtes en présence de trypsine dans des conditions connues pour dégrader des protéines iodées de surface des sporozoïtes de Plasmodium (YOSHIDA et coll., 1981), protozoaire relativement proche de Toxoplasma. Nous n'avons pas pu détecter d'altération des protéines iodées de la surface des tachyzoïtes sous l'action protéolytique de la trypsine, dans nos conditions expérimentales ; ainsi, l'anticorps monoclonal détecte toujours la molécule 30 Kd sans montrer de changement par rapport au témoin (Figure 11).

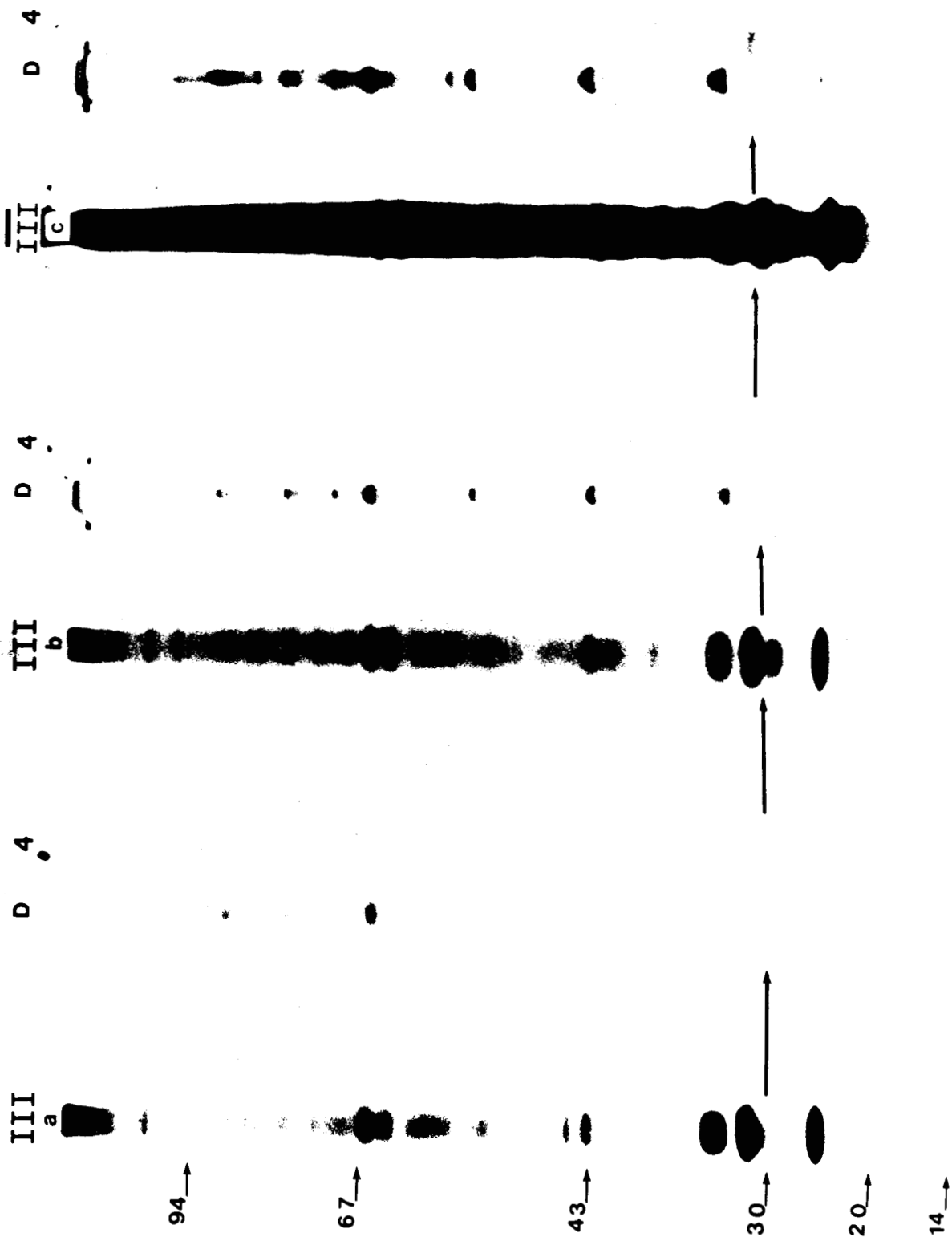


FIGURE 10

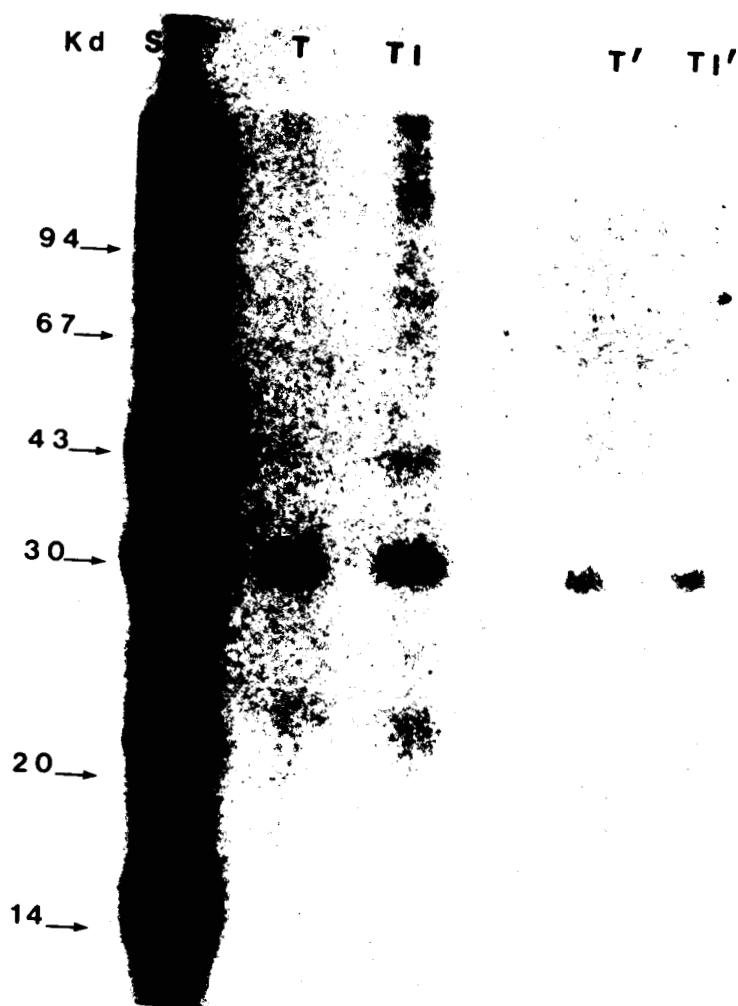


FIGURE 11

4.3.4. Cinétique de l'apparition des anticorps sériques dans la toxoplasmose humaine et expérimentale de la souris

L'application des techniques de marquages radioactifs ainsi que l'immunoprécipitation et l'analyse électrophorétique dans l'étude des antigènes, nous ont permis d'utiliser les anticorps monoclonaux comme marqueurs dans l'étude des anticorps humoraux produits par l'hôte dans les infections expérimentales et humaines.

4.3.4.1. Réponse immunologique humorale chez la souris

4.3.4.1.1. Vis-à-vis d'antigènes membranaires

Deux protéines majeures de tachyzoïtes, marqués en surface, sont immunoprécipitées préférentiellement par les sérums de souris à différents jours d'infection. Nous pouvons observer, sur la figure 12, la réponse anticorps contre les antigènes membranaires de tachyzoïtes en fonction de l'évolution de la toxoplasmose.

Les sérums de souris en phase aiguë donnent une réponse faible contre l'antigène 30 Kd par rapport à l'antigène 43 Kd. Ces anticorps devraient vraisemblablement correspondre essentiellement aux anticorps de la classe IgG puisque, dans la technique d'immunoprécipitation, la protéine A-Sépha-rose fixe essentiellement les IgG. Pendant l'évolution de l'infection, la réponse immunologique contre les molécules 43 et 30 Kd est quantitativement comparable ; les bandes identifiées plus tardivement ont un poids moléculaire de 35 et 22 Kd.

Les sérums de souris saines, utilisées comme contrôle dans toutes nos expériences, confirment la spécificité des antigènes immunoprécipités.

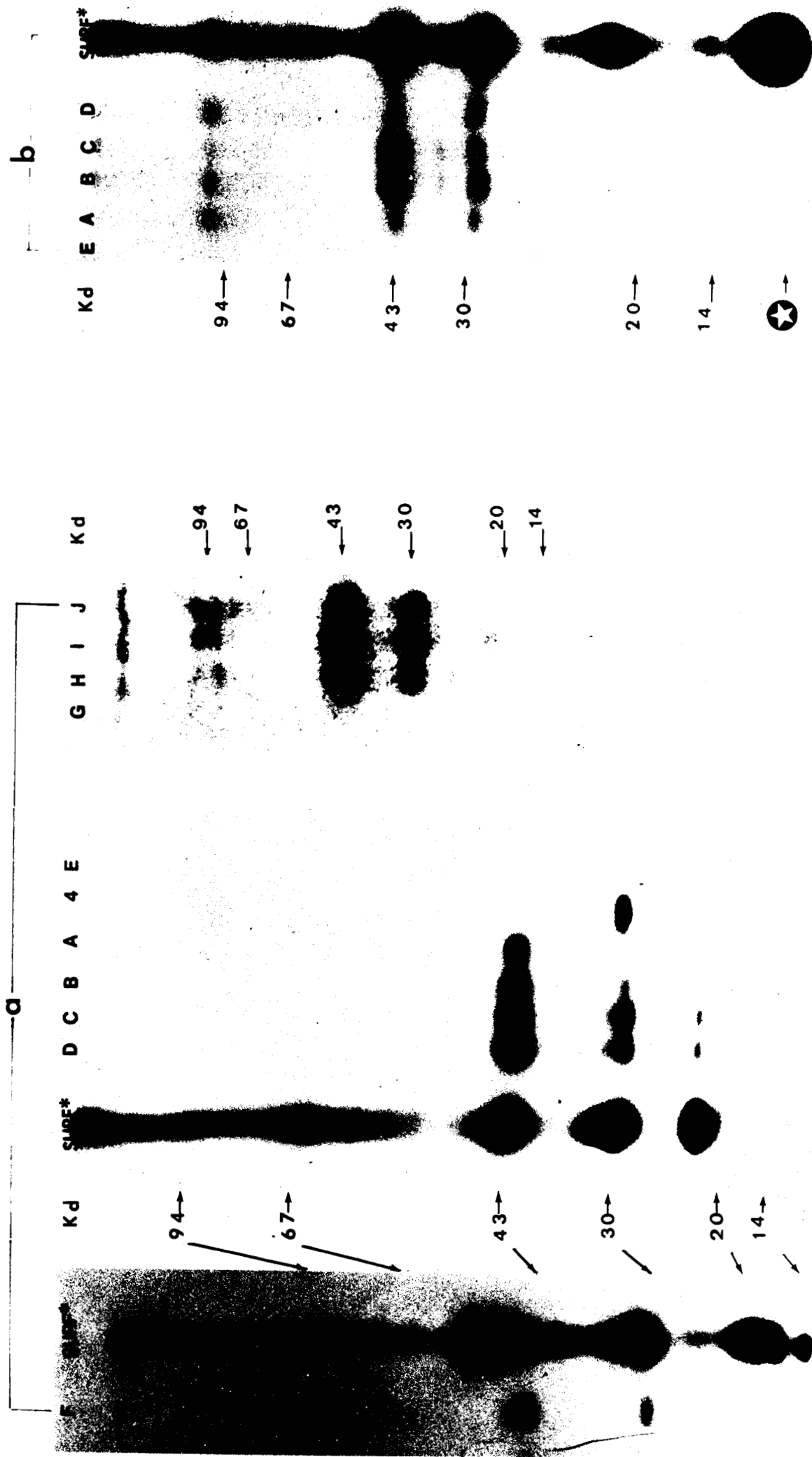


FIGURE 12

4.3.4.1.2. Vis-à-vis des antigènes cytoplasmiques

Une étude qualitative de la réponse des anticorps sériques contre des antigènes marqués métaboliquement a été effectuée chez la souris à différents jours d'infection (figure 13).

Après analyse en gel de polyacrylamide -SDS, des antigènes reconnus par des sérums de souris infectées, nous identifions la bande 43 Kd dans les différents jours d'infection tandis que l'antigène 100 Kd est seulement observé au début de l'infection. Les antigènes de haut poids moléculaire sont généralement reconnus par tous les sérums.

4.3.4.2. Réponse immunologique humorale chez l'homme

4.3.4.2.1. Vis-à-vis d'antigènes membranaires

La solubilisation par un détergent non-ionique, des tachyzoites marqués en surface, et l'incubation avec les différents sérums d'infection humaine, confirment la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre la molécule 30 Kd, présente au niveau de la membrane des tachyzoites. De plus, ces mêmes techniques nous ont permis de caractériser les autres molécules de surface des tachyzoites qui peuvent être reconnues par les anticorps synthétisés pendant l'infection humaine.

Le profil électrophorétique des antigènes reconnus par les anticorps lors de l'infection humaine comporte, dans tous les cas, les molécules 30 et 43 Kd, quelques sérums humains révèlent aussi des bandes additionnelles spécifiques à 35 et 22 Kd.

Les figures 14 et 15 correspondent à la comparaison des protéines immunoréactives exprimées à la surface de T. gondii, en utilisant différents sérums d'infection humaine (cette figure illustre les résultats de quatre expériences différentes qui ont donné les mêmes conclusions).

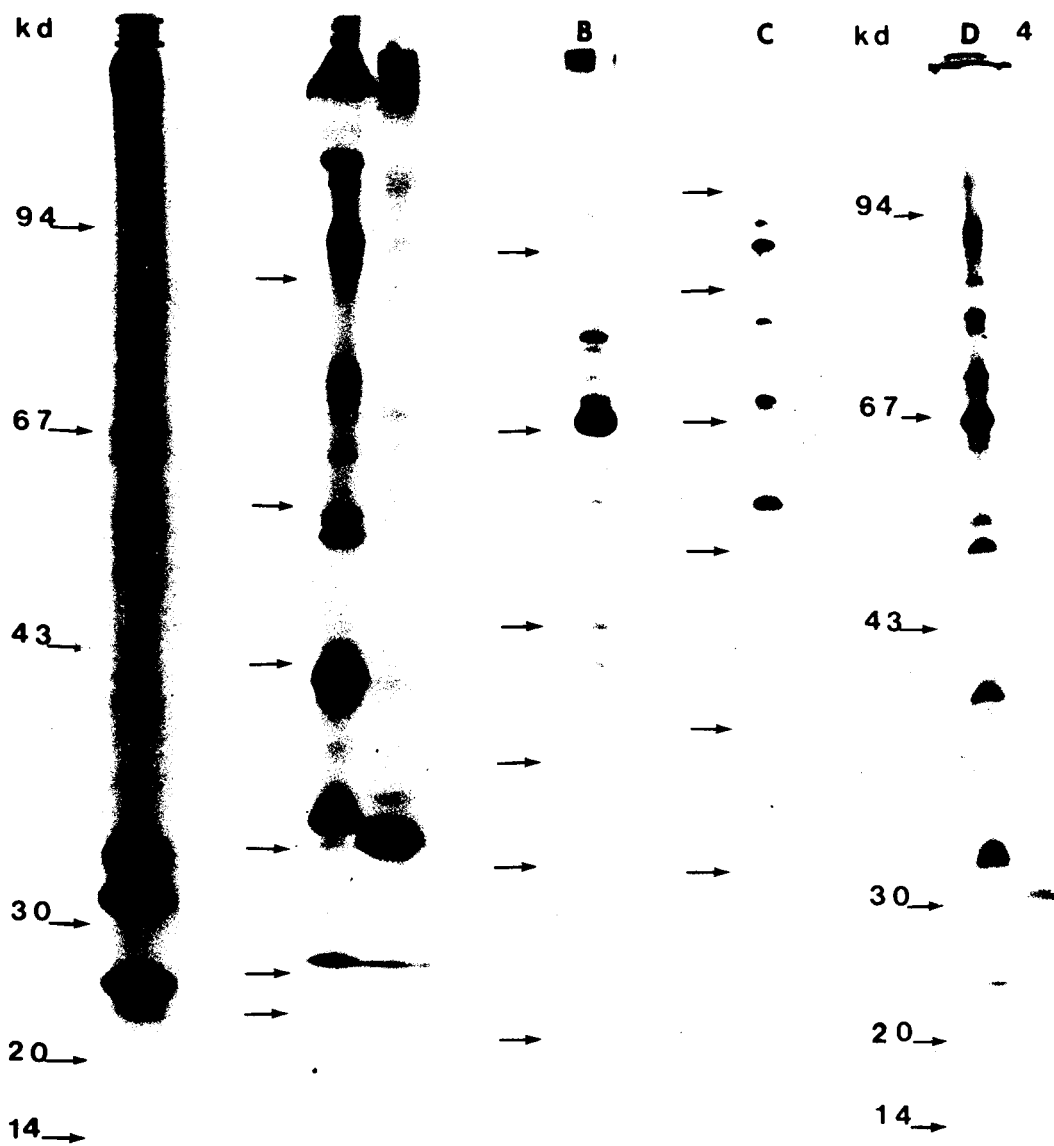


FIGURE 13

Pour faciliter l'interprétation des résultats nous avons adopté, en fonction de la sérologie et des formes cliniques de l'infection, la classification suivante : (classification établie par les Professeurs Vernes et Camus, laboratoire de Parasitologie, C.H.U. de Lille) :

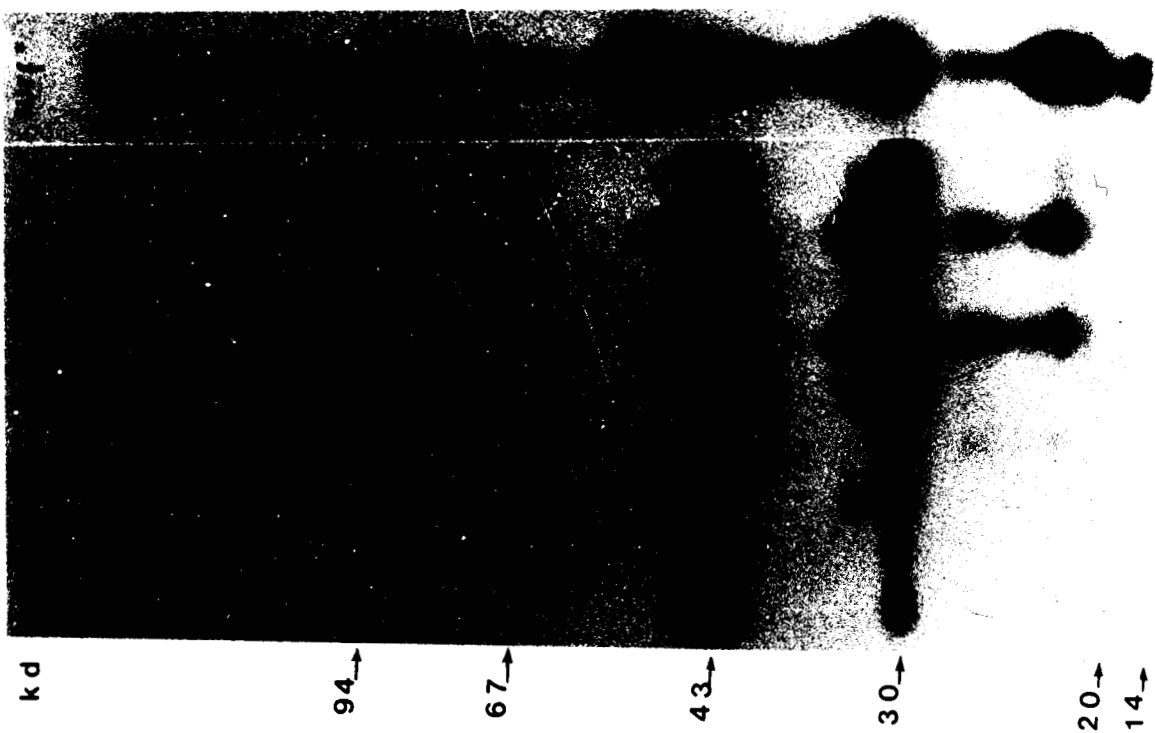
- Groupe I : anticorps résiduels
(I.F.I.-IgM Négative ; taux d'IgG faible)
- Groupe II : infection récente
(I.F.I.-IgM Positive ; taux d'IgG faibles ou élevés)
- Groupe III : infection récente douteuse
(I.F.I.-IgM douteux ou négative ; taux d'IgG faibles ou élevés)
- Groupe IV : anticorps élevés persistants dans le temps
(I.F.I.-IgM négative ; taux d'IgG élevés).

Groupe I : Les différents sérums de ce groupe présentent des titres d'anticorps décelés en I.F.I. (1/450) et en hémagglutination (1/320 ; 1/640). Ces mêmes sérums, immunoprécipités avec l'extrait de tachyzoïtes marqués en surface montrent que les anticorps reconnaissent la molécule 30 Kd qui est cependant quantitativement inférieure à la protéine 43 Kd (Figure 14 piste 1-2 et Figure 15 pistes a-b-c-d-e-f).

Groupe II : Présentant des taux d'anticorps I.F.I.-IgG (1/4000) ; I.F.I.-IgM (1/150 - 1/450) et en hémagglutination (1/1280). L'antigène 30 Kd reconnu après immunoprécipitation a une intensité légèrement plus faible que la molécule 43 Kd. On remarque aussi la présence d'une bande additionnelle à 32 Kd quantitativement inférieure aux deux molécules précédentes (Figure 14 pistes 3-4-5 et Figure 15 pistes g-h-i-j-k).

Groupe III : Dont les anticorps sont I.F.I.-IgG (1/450) ; I.F.I.-IgM (1/150 ou douteux) et en hémagglutination (1/320). Après immunoprécipitation, les

A



B



FIGURE 14

anticorps nous permettent de mettre en évidence la présence d'une bande reconnaissant la protéine 30 Kd très faiblement par rapport à la protéine 43 Kd (Figure 14 pistes 6-7 et Figure 15 pistes m-n-o-p-q).

Groupe IV : Classifié par des anticorps élevés en I.F.I. ($> 1/4000$) et en hémagglutination ($> 1/1280$) ce groupe présente à l'immunoprécipitation tous les antigènes de surface ; la protéine 30 Kd ayant la même intensité que la 43 Kd tandis que la bande 35 Kd est plus faible que les précédentes mais plus prononcée que la molécule 22 Kd (figure 14 pistes 8-9- et Figure 15 pistes r-s-t-u-v-w).

Les sérums humains, dépourvus d'anticorps anti-toxoplasme, sont utilisés comme témoins négatifs (Figure 14 piste 0).

Nous avons aussi inclus pour chaque gel un anticorps monoclonal anti-30Kd servant de marqueur du poids moléculaire 30 000 daltons.

4.3.4.2.2. Vis-à-vis des antigènes cytoplasmiques.

L'analyse qualitative de la réponse des anticorps sériques dirigés contre les antigènes cytoplasmiques marqués a été étudiée dans les sérums humains correspondant aux quatre groupes déjà cités.

Les antigènes isolés d'un extrait détergent de tachyzoïtes immunoprécipités par les sérums de souris infestées ou par les sérums humains nous donnent des profils comparables. Nous pouvons observer que seulement quelques molécules sont reconnues spécifiquement par ces anticorps.

Dans les sérums humains des différents groupes I, II, III et IV, les antigènes 43 Kd et 100 Kd sont généralement reconnus tandis que dans les sérums des groupes II et III sont observées 2 molécules supplémentaires correspondant aux antigènes de 35 et 94 Kd.

Les antigènes de bas poids moléculaire sont observés dans quelques sérums des groupes I et III tandis que pour le groupe IV, les antigènes de bas

Kd surf* a b c d e f 0 g h i j k : m n o p q r s t u v w Kd

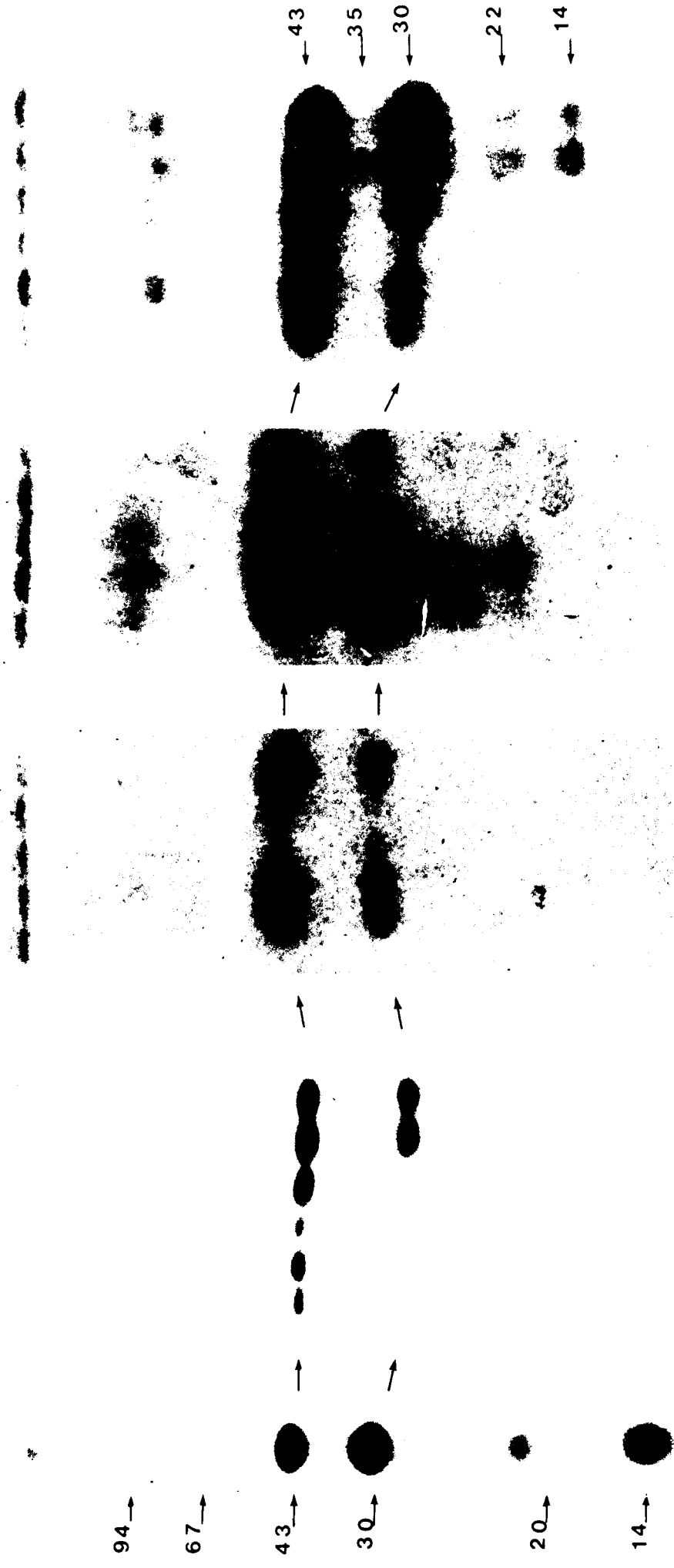


FIGURE 15

poinds moléculaire ainsi que les antigènes de haut poids moléculaire sont reconnus par tous les sérums quel que soit le stade d'infection (Figure 16).

4.3.4.3. Test de compétition en SRIA

Les résultats décrits dans ce chapitre correspondent à l'inhibition des liquides d'ascite ou des sérums humains dans la réaction de l'anticorps monoclonal B 41/58 marqué à 1^{125}I ou d'un mélange de 5 anticorps monoclonaux (de classe IgG1 et IgG2b dans les mêmes proportions) respectivement sur un antigène total soluble de tachyzoïtes couplé au support solide. La réalisation de la technique exige la détermination préalable des dilutions limites de l'antigène et de l'anticorps marqué.

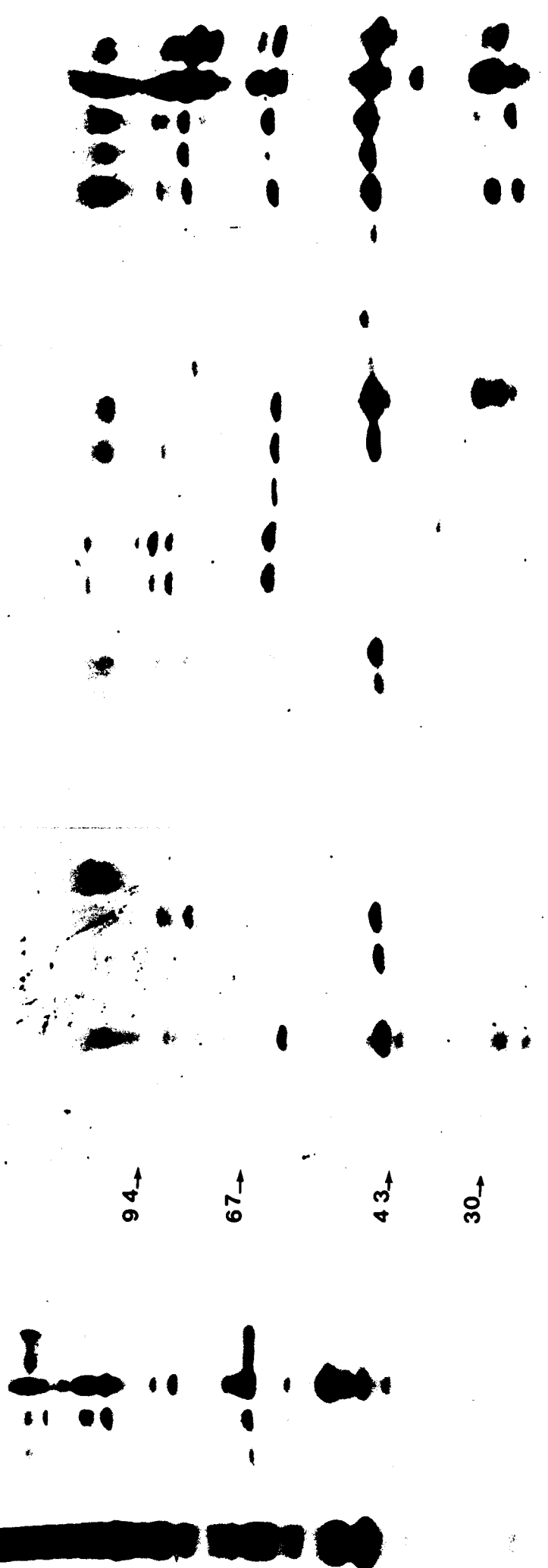
La détermination de la dilution limite d'antigène est établie par une courbe (Figure 17) obtenue à partir des résultats de la réaction des anticorps marqués à 1^{125}I mis en excès (100 000 cpm) et de différentes concentrations de l'antigène total soluble. La concentration choisie (50 $\mu\text{g/ml}$) représente la quantité d'antigène nécessaire pour lier 70 à 80 % de la radioactivité ; le 100 % correspondant au plateau de la courbe, là où l'antigène est en excès.

La détermination de la dilution limite des anticorps marqués à 1^{125}I est établie grâce à une courbe (Figure 18) obtenue à partir des résultats de la réaction de plusieurs dilutions de cet anticorps sur l'antigène total soluble en dilution limite (établie précédemment). La dilution choisie, équivalent à 50 000 cpm/100 μl , représente la plus grande dilution de l'anticorps marqué qui est encore capable de se lier à l'antigène et de donner un maximum de réactivité (100 %).

4.3.4.3.1. Inhibition par les sérums humains

La figure 19 montre les résultats d'un test de compétition entre les anticorps monoclonaux marqués et les sérums humains de différents groupes. Annexées à la figure se trouvent les caractéristiques des différents sérums : titre en I.F.I.-IgG, I.F.I.-IgM, Hémagglutination et immunoglobulines de classe G ou M.

II 2 4 9 0 kd kd i k l o p q r s t u v w



kd 94 67 43 30 20 14

94 67 43 30

FIGURE 16

Cette figure montre une réaction d'inhibition relativement importante avec les sérums des groupes II et IV et moins net avec les sérums des groupes I et III par rapport aux témoins négatifs sains. Aucun faux positif n'est observé. Six sérums du groupe II, I.F.I.-IgM négatif, se sont avérés positifs dans le test de compétition.

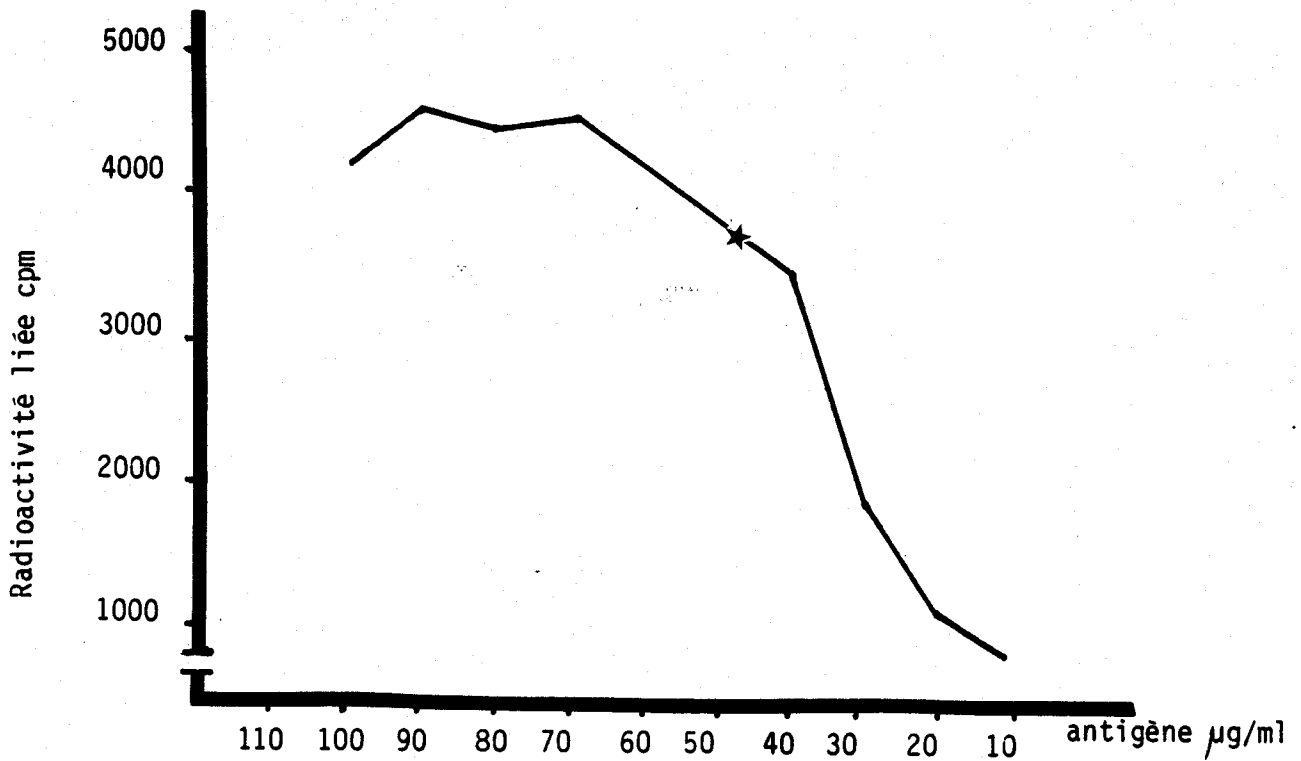
Les sérums de patients atteints de lupus érythémateux, de mononucléose infectieuse, de listériose ou de rubéole sont négatifs dans ce test.

4.3.4.3.2. Inhibition par d'autres anticorps monoclonaux

La figure 20 montre les résultats d'un test de compétition entre l'anticorps monoclonal B 41/58 et différents liquides d'ascite, où nous pouvons observer une forte inhibition avec les 4 anticorps monoclonaux. Ces résultats seront repris dans la discussion générale.

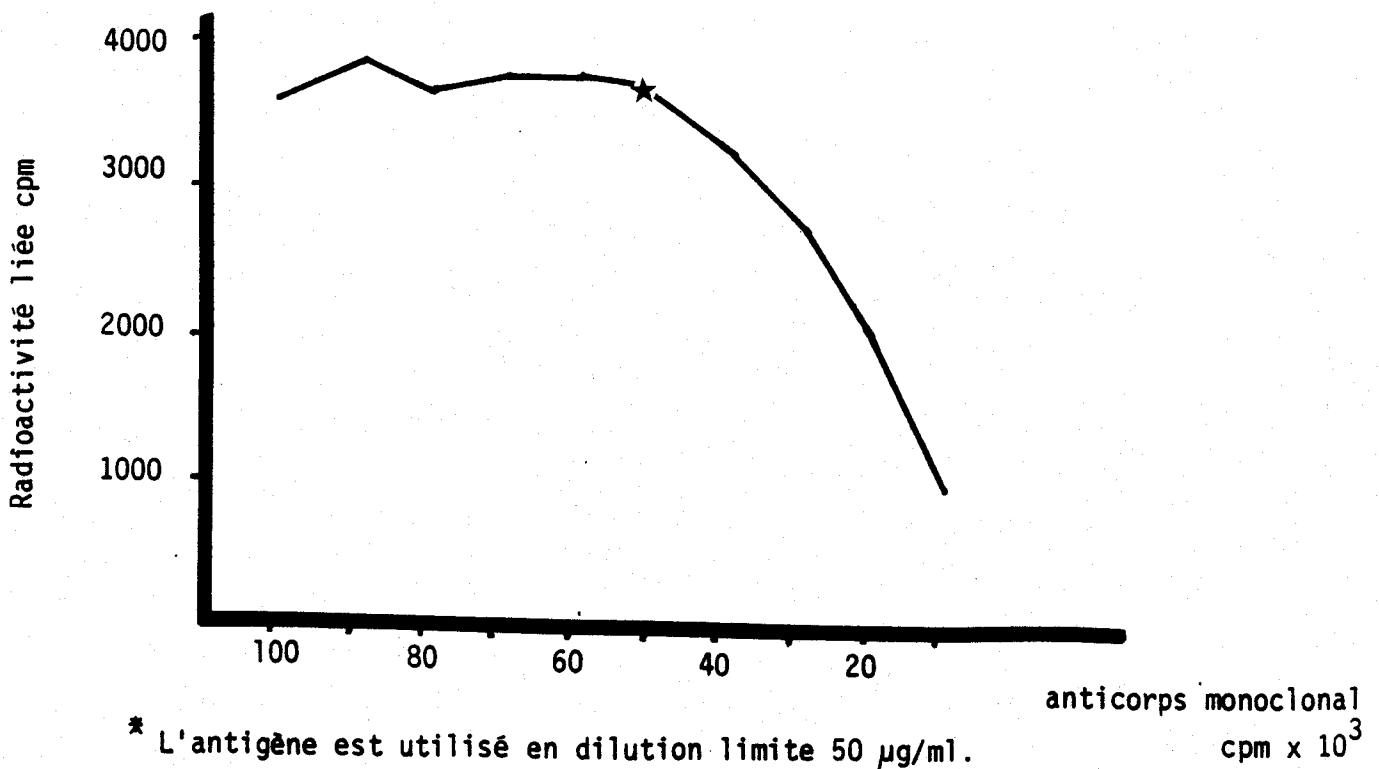
Le contrôle négatif de la réaction est un liquide d'ascite ne présentant pas une réactivité anti-T. gondii.

FIGURE 17 : Détermination de la dilution limite de l'antigène total soluble *

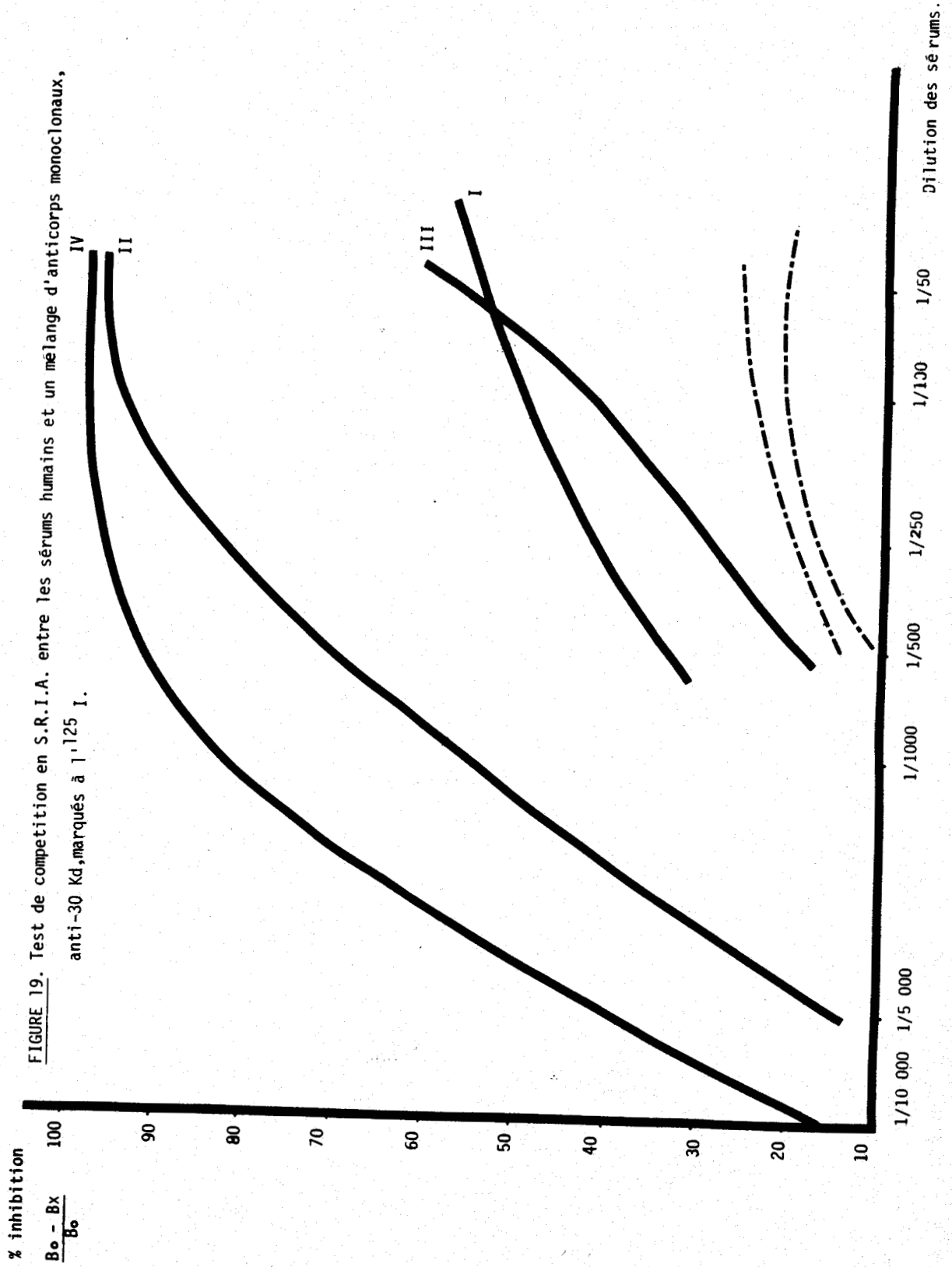


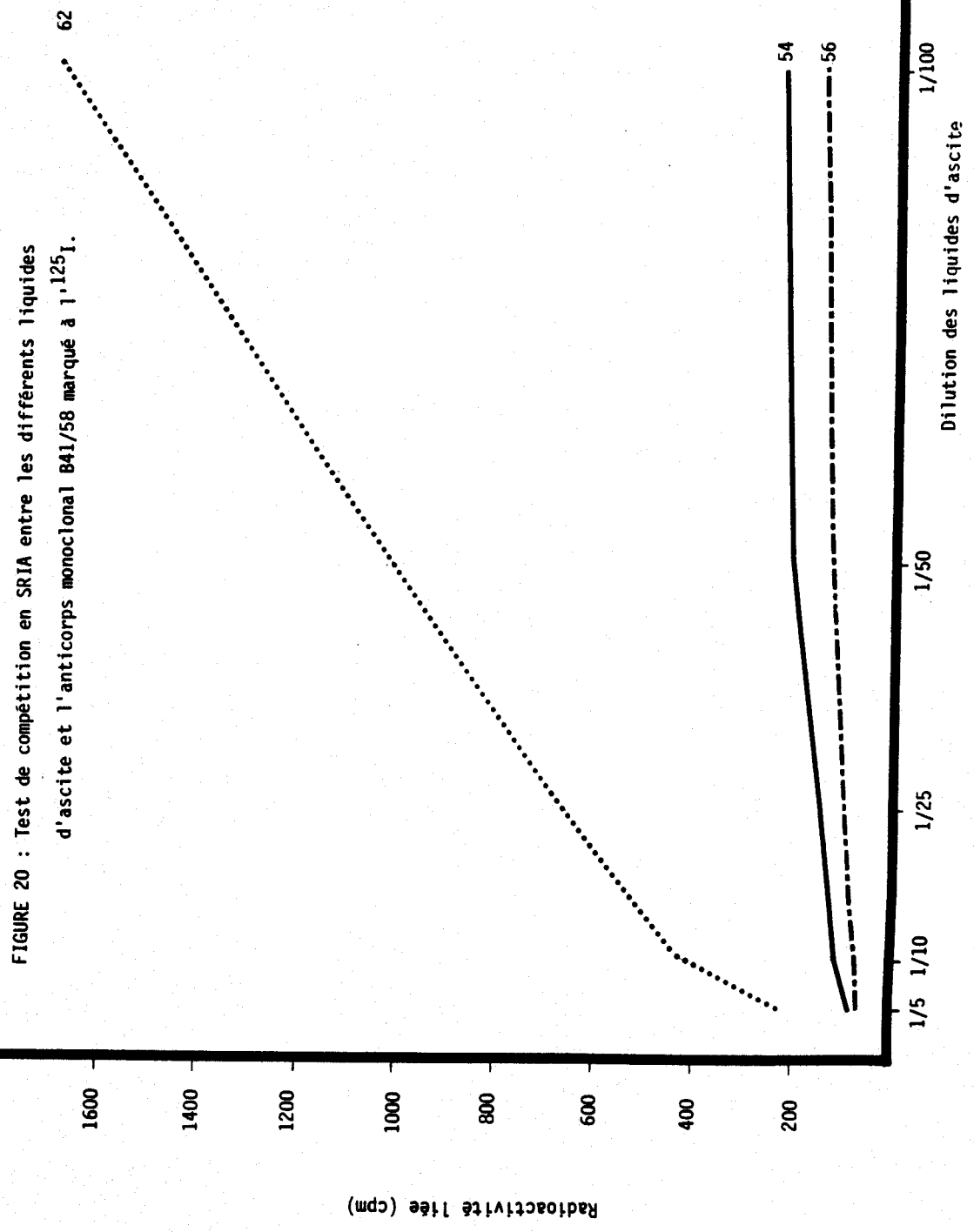
* L'anticorps monoclonal marqué est utilisé en excès (100 000 cpm)

FIGURE 18 : Détermination de la dilution limite de l'anticorps monoclonal B 41/58 marqué à ^{125}I *



* L'antigène est utilisé en dilution limite 50 $\mu\text{g/ml}$.





CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

5.1. Obtention et caractérisation d'anticorps monoclonaux

L'introduction de la technique de fusion cellulaire par KOHLER et MILSTEIN (1975) a ouvert la possibilité d'obtenir des anticorps monoclonaux avec des spécificités dirigées contre des entités potentiellement antigéniques. Ainsi pour Toxoplasma gondii leur production a été rapportée récemment par plusieurs auteurs (SETHI et coll., 1980 ; HANDMAN et REMINGTON, 1980b ; JOHNSON et coll., 1981 ; KASPER et coll., 1982). Les différentes approches qui ont été utilisées pour l'obtention des toxoplasmes des cellules immunes de rate de souris immunisées ou infectées et la désignation des cellules de myelome utilisées pour la fusion sont résumées dans le tableau 6.

Si certains auteurs (HANDMAN et coll., 1980 ; JOHNSON et coll., 1981) ont obtenu des anticorps monoclonaux réagissant avec des antigènes cytoplasmiques ou solubles, détectés par I.F.I. ou E.L.I.S.A., les seuls antigènes de Toxoplasma caractérisés par immunoabsorption et électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS sont des protéines membranaires. Deux raisons majeures expliquent ces résultats ; une raison technique, d'une part, résulte de la iodation enzymatique des protéines de surface, méthode de marquage la plus facile des antigènes en vue de leur caractérisation après immunoprécipitation. D'autre part, une raison théorique peut être avancée selon laquelle les antigènes de surface d'un parasite uni-cellulaire sont parmi les plus susceptibles d'être impliqués dans la réponse immune de l'hôte.

Les résultats des divers auteurs reposent donc sur le radiomarquage de la membrane des tachyzoïtes de Toxoplasma et par conséquent, sur le profil protéique correspondant obtenu par électrophorèse. A ce niveau déjà, les résultats publiés dans la littérature divergent sur deux aspects: d'une part le nombre de protéines majeures reconnues et d'autre part sur le poids moléculaire apparent de ces molécules dans le système d'analyse en gel de polyacrylamide-SDS.

Tableau 6 - Hybridomes producteurs d'anticorps dirigés contre T. gondii

Références	Sources de cellules pour la fusion	Dépistage	Antigènes de surface reconnus par les anticorps monoclonaux
● SETHI, ENDO et BRANDIS (1980)	Souris Balb/C - P ₃ -X ₆₃ -Ag8.653 Immunisation : J-1, 20 kystes (Gail) i.p. J-14, 20 kystes (Gail) s.c. J-29, 100 tachyzoïtes (BK) i.p. J-35-37, hybridation	- RIA avec tachyzoïtes ultrasonnés - I.F.I.	27 - 43 Kd (non publié)
● HANDMAN et REMINGTON	Souris Balb/C -NS-1 variant du P ₃ -X ₂₂ -Ag8 Immunisation : J-1, 2 x 10 ³ tachyzoïtes (C ₃₇) s.c. J-50, 5 x 10 ⁶ tachyzoïtes (fixés au formol) i.p. J-53, hybridation	- RIA avec tachyzoïtes entiers - RIA avec tachyzoïtes ultrasonnés	14 - 27 - 35 et 43 Kd
● JOHNSON, Mc NAMARA, NEOH, Mc DONALD et ZOLA (1981)	Souris Balb/C - P ₃ -X ₆₃ -Ag8.653 Immunisation : J-1 tachyzoïtes ultrasonnés (RH) i.p. J-29, Rappel dans les mêmes conditions J-32, hybridation	-I.F.I. - Hémagglutination	22 - 30 - 35 Kd
● KASPER, CRABB et PFEFFERKORN (1982)	Souris Balb/C - M P C - 11 Immunisation : J-1, 1.5 x 10 ⁷ tachyzoïtes(lysés par congélation-décongélation) i.p. J-14, 28, 42, 56, Rappel dans les mêmes conditions J-98, 2 x 10 ⁷ tachyzoïtes(lysés par congélation-décongélation) i.p. J-101, hybridation	- E.L.I.S.A.	22 - 30 Kd

En ce qui concerne le nombre d'antigènes majeurs, nos résultats coïncident avec ceux de KASPER et coll. (1983) qui identifient 3 protéines iodées en présence de lactoperoxydase. HANDMAN et coll. (1980) ont mis en évidence au moins 4 protéines majeures parmi lesquelles sont retrouvées les 3 que nous décrivons.

Cette différence est probablement due à la provenance des tachyzoïtes utilisées pour le marquage : culture cellulaire ou ascite de souris. CHBOUKI (1982) a montré en comparant les profils des protéines radiomarquées des tachyzoïtes provenant de ces deux modes de production, que les tachyzoïtes issus de cellules montraient trois protéines majeures alors que ceux venant d'ascite pouvaient compter 2 ou 3 protéines supplémentaires. Nous avons également retrouvé ces résultats et nous pensons que les tachyzoïtes d'ascite porteraient, adsorbées à leur surface, des protéines de souris. Cette hypothèse avait déjà été envisagée par HANDMAN et coll. (1980). Ces considérations nous ont conduit à utiliser le plus souvent possible, malgré la moins grande facilité d'obtention, des tachyzoïtes issus de culture de cellules.

D'autre part, il apparaît une différence dans les résultats entre les auteurs qui concerne une protéine de 14 Kd dont l'existence est à notre avis douteuse.

En effet, dans la plupart des travaux où elle apparaît, elle est confondue avec le front de migration de l'électrophorèse et correspond probablement à l'iode radioactif libre provenant de la préparation. Certains de nos gels montrent une telle bande, vraiment très faible ; mais dans les conditions d'électrophorèse utilisées, les protéines de bas poids moléculaire migrent près du front et le témoin de masse moléculaire 14 000 est alors pratiquement confondu avec le front de migration.

En ce qui concerne le poids moléculaire apparent des protéines de surface, des différences assez importantes sont notées entre les auteurs, bien qu'il semble s'agir des mêmes protéines. Les résultats de KASPER et coll.

(1983) apportent une réponse à cette question : l'utilisation ou non d'agents réducteurs lors de l'électrophorèse altère le comportement de ces protéines dans le système d'analyse en gel de polyacrylamide-SDS, ce qui est essentiellement dû à la présence de ponts disulfure intramoléculaire.

Nos résultats coïncident exactement avec ceux de KASPER et coll. (1983) et il semble bien que les trois protéines majeures de surface de T. gondii sont 22-30 et 43 Kd, migrant respectivement à environ 17, 27 et 35 Kd dans un système non réducteur.

Cette comparaison entre nos résultats et ceux de KASPER et coll. (1983) nous permettent d'affirmer que les anticorps monoclonaux que nous avons obtenus reconnaissent la même molécule P30 décrite par ces auteurs. La comparaison avec les résultats de HANDMAN et coll. (1980) ou ceux de JOHNSON et coll. (1982) reste plus délicate.

En ce qui concerne la spécificité antigénique reconnue par nos différents anticorps monoclonaux, nous ne pouvons pas, à la vue de nos résultats de compétition entre les différents anticorps monoclonaux, conclure qu'ils reconnaissent le même épitope. En effet, nos expériences de compétition ont été réalisées avec un seul anticorps monoclonal marqué à ^{125}I (B41/58) ; seuls des tests croisés pourraient définitivement conclure à une même spécificité antigénique. Quoiqu'il en soit il est vraisemblable que les clones B41/56 et B41/58 expriment une même spécificité antigénique puisqu'ils sont issus du même hybride de départ et sécrètent le même isotype : IgG1. Il serait intéressant de comparer par rapport au clone B41/58, les deux clones B132/54 et B132/62 (dérivant du même hybride et sécrétant des IgG2b) qui ont donné des pourcentages d'inhibition différents dans les tests de compétition.

L'ensemble de nos résultats indiquent clairement que ces cinq anticorps monoclonaux, ayant servi dans des applications diagnostiques, reconnaissent la même molécule 30 Kd ; des résultats complémentaires sont nécessaires pour prouver que cette molécule comporte un ou plusieurs épitopes.

5.2. Utilisation de la sonde monoclonale anti-30 Kd

5.2.1. Immunodétection

5.2.1.1. Localisation de la molécule 30 Kd

La molécule 30 Kd est une protéine majeure à la surface des tachyzoïtes de T. gondii, accessible à l' ^{125}I (KASPER et coll., 1983). Dans notre étude nous confirmons sa localisation dans la membrane du parasite après un marquage des protéines de surface. Tous les zoïtes extracellulaires présentent un marquage uniforme en délimitant la périphérie du parasite ce qui montre que la molécule 30 Kd est distribuée d'une façon homogène sur la membrane plasmique des tachyzoïtes.

JOHNSON et coll. (1983) ont obtenu des résultats similaires en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de T. gondii, parmi lesquels un anticorps anti-30 Kd était probablement présent.

D'autre part, la molécule 30 Kd est également décelée à la surface des tachyzoïtes intracellulaires, laquelle n'est pas accessible à une radioiodation, et cette molécule est trouvée tout au long du cycle d'endodyogenèse des tachyzoïtes.

Dans la situation où les parasites pénètrent dans les cellules, l'anticorps monoclonal anti-30 Kd n'est pas éliminé lors de l'invasion de la cellule, contrairement à ce qui se passe chez les sporozoïtes de Plasmodium berghei où l'antigène de surface Pb44 est éliminé (HOLLINGDALE, 1982).

Ceci montre ainsi qu'il existe entre ces deux modèles parasitaires des différences importantes.

5.2.1.2. Interaction entre l'anticorps monoclonal et l'antigène de membrane des tachyzoïtes vivants

L'incapacité du Toxoplasma vivant à "capper" la double couche d'anticorps quand la première comporte un anticorps monoclonal anti-30 Kd est surprenante.

En effet un "capping" a été reporté dans des études précédentes sur l'interaction entre ligands et zoïtes chez les sporozoaires et spécialement dans le cas du toxoplasme (DZBENSKI et ZIELINSKA, 1976). Nous avons confirmé ce phénomène de "capping" en présence d'anticorps provenant de sérums de souris infestées. Pour expliquer nos résultats avec l'anticorps monoclonal anti-30 kd, nous devons admettre que les déterminants de surface de 30 Kd ne peuvent pas être redistribués dans la membrane du zoïte en situation classique de formation de "cap".

Une telle immobilité de certains sites antigéniques avait été déjà suggérée dans le cas d' Eimeria nieschulzi où la surface du sporozoïte restait fluorescent après le "capping" d'anticorps dirigés contre les sporozoïtes (CHBOUKI et DUBREMETZ, 1982).

5.2.1.3. Elimination de l'anticorps monoclonal anti-30 Kd pendant l'invasion

La capacité de pénétration dans la cellule par les tachyzoïtes, recouverts par l'anticorps monoclonal anti-30 Kd, fut une observation inattendue et permet de conclure que les zoïtes sont encore doués d'une mobilité même sans un "capping" des anticorps. Une telle possibilité n'avait pas été prise en considération dans des hypothèses antérieures sur la mobilité des tachyzoïtes où les deux phénomènes étaient considérés comme étant étroitement liés et interdépendants (RUSSEL et SINDEN, 1981). Le revêtement des tachyzoïtes par l'immunoglobuline anti-30 Kd n'inhibe donc pas le mouvement du parasite. Le faible marquage, observé chez les zoïtes intracellulaires par rapport aux zoïtes extracellulaires au moment de l'immunodétection de

l'anticorps anti-30 Kd sur les organismes, pré-incubés, pourrait être à première vue attribué à un défaut de pénétration des réactifs dans la cellule. La faible quantité d'anticorps anti-30 Kd sur des zoïtes intracellulaires pré-incubés est due probablement à la perte de ces protéines pendant l'invasion.

Une question importante reste encore sans réponse à savoir si l'antigène de 30 Kd est aussi perdu pendant l'invasion du parasite ou si la liaison entre l'antigène et l'anticorps est rompue.

L'accumulation de vésicules marquées derrière l'extrémité du parasite envahissant pré-revêtu laisse supposer une perte de produit au niveau des composants membranaires ; non seulement le revêtement d'anticorps est concerné mais aussi probablement la double couche lipoprotéique.

L'insuccès des zoïtes, recouverts d'anticorps monoclonaux, à se développer dans des macrophages (HAUSSER et REMINGTON, 1981 ; et SETHI et coll., 1981) est probablement expliqué par les propriétés phagocytaires des macrophages. L'élimination incomplète du revêtement d'anticorps pendant l'invasion (nos résultats) pourrait rendre compte de l'action toxolytique des macrophages ; néanmoins le mécanisme de ce phénomène reste encore inconnu.

Le résultat principal de notre étude est de souligner l'apposition étroite entre la membrane de l'hôte et du parasite pendant la pénétration, libérant du parasite des molécules adsorbées à la surface. Ce résultat est à rapprocher de la jonction mobile décrite lors de l'invasion de l'érythrocyte par le mérozoite de Plasmodium où le "cell-coat" du mérozoite est éliminé de manière comparable à ce que nous observons pour l'anticorps fixé sur le Toxoplasma . Néanmoins, dans ce dernier cas, quelques molécules adsorbées restent en surface puisqu'un léger marquage est observé dans des zoïtes intracellulaires.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux connaître la nature exacte de cette interaction et les mécanismes de mobilité.

5.2.2. Biosynthèse de la molécule 30Kd

L'étude de la biosynthèse de la molécule 30 Kd n'a été qu'abordée au cours de notre travail. Ces observations préliminaires ne peuvent pas en outre être comparées à d'autres, aucune étude comparable n'ayant encore été réalisée chez les coccidies. Nous n'avons pu mettre en évidence de précurseur de la molécule 30 Kd, même avec des durées de marquage de l'ordre de cinq minutes, temps relativement court si on le compare à la durée du cycle cellulaire de Toxoplasma qui est d'environ 6 h. Trois hypothèses sont envisageables : ou la 30 Kd n'a pas de précurseur distinct, ou nos temps de marquage sont encore trop longs, ou encore il existe un précurseur ne possédant pas l'épitope reconnu par nos anticorps monoclonaux. La purification de la molécule 30 Kd par immunoabsorption (KASPER et coll., 1983) et la préparation d'anticorps polyclonaux d'une part, l'isolement des ARN messagers des tachyzoites et leur expression in vitro d'autre part devraient permettre de résoudre ce problème.

Le transit de la molécule 30 Kd de son site de biosynthèse jusqu'à la surface du zoïte reste à étudier. Notre unique tentative à cet égard montre que la protéine 30 Kd de Toxoplasma est moins sensible à la trypsine que la Pb44 des sporozoïtes de Plasmodium berghei (YOSHIDA et coll., 1981). Ceci confirme la différence entre les 2 molécules Pb44 est plus superficielle alors que la 30 Kd est très probablement transmembranaire ainsi que le suggèrent KASPER et coll. (1983).

5.2.3. Cinétique de la réponse immune humorale

Les études sérologiques chez l'homme indiquent que 20 à 90 % des populations adultes sont atteints d'infection due au Toxoplasma gondii, laquelle est grave chez l'enfant ayant une toxoplasmose congénitale et chez les patients immunosupprimés. Peu d'études ont été effectuées sur les antigènes reconnus par les anticorps spécifiques. La difficulté de préparation d'antigènes purs et l'extrême hétérogénéité des anticorps dans la réponse immunologique ont toujours limité l'analyse des antigènes parasitaires reconnus.

Les anticorps monoclonaux sont ainsi précieux pour identifier les immuno-déterminants spécifiques et donc pour évaluer la réponse immune humorale.

5.2.3.1. Réponse immune humorale vis-à-vis des antigènes cytoplasmiques

Les anticorps de classe IgM chez les patients en phase aiguë d'infection sont difficilement mis en évidence par I.F.I. ; récemment un effet inhibiteur a été attribué aux IgG sériques lorsque les titres sont élevés (FILICE et coll., 1980).

Dans notre étude, l'immunoprécipitation d'un extrait antigénique soluble marqué à la méthionine ³⁵S avec des sérums humains en phase aiguë ou chronique d'infection montrent un profil complexe d'immunoréactivité. Les antigènes bien représentés ont un poids moléculaire apparent de 84-70-68-62-49-35- 31 - 29 - 28 et 24 Kd. La plupart de ces antigènes correspondent à ceux mis en évidence par ERLICH et coll. (1983) par la technique d'immunoélectrotransfert ; de plus ils démontrent que les antigènes de poids moléculaire 75-70-65-54-38- 31 - 29 - 28 -26- 24 Kd, réagissent avec les anticorps de classe IgG pendant les différents stades de l'infection. Un travail récent de SHARMA et coll. (1983) par la technique d'immunoélectrotransfert, révèle que des anticorps IgM et IgG, présents dans

les sérums humains d'infection, reconnaissent des antigènes communs d'un poids moléculaire de 32-22 et 6 Kd. Un anticorps de classe IgM reconnaît un antigène 6 Kd en réponse initiale lors de l'infection puis ils observent une réponse IgM vis-à-vis des autres antigènes 32 et 22 Kd et une réponse IgG dirigée contre l'antigène 6 Kd et les antigènes de haut poids moléculaire. NAOT et REMINGTON (1981) ont rapporté que les anticorps IgG ainsi que les IgM, présents dans des sérums de patients, réagissent avec des fractions membranaires de T. gondii.

JOHNSON et coll. (1982) après une analyse des polypeptides et des glycopeptides des préparations antigéniques solubles (TF1) et insolubles (TF2) de tachyzoïtes iodés en présence de lactopéroxydase ou de Chloramine T, suivi d'une immunoprécipitation montrent l'existence de 4 polypeptides qui sont communs pour les fractions TF1 et TF2 et ayant un poids moléculaire de 56-43-35 et 14 Kd ; les trois derniers sont certainement identiques à ceux démontrés par HANDMAN et coll. (1980). Le même auteur décrit un anticorps monoclonal qui réagit uniquement dans le test d'hémagglutination indirecte; l'antigène reconnu présente un poids moléculaire de 98 Kd et n'est présent que dans la fraction soluble. Cet antigène est immunoprécipité par les sérums d'infection ayant un titre élevé en hémagglutination indirecte.

Nous avons mis au point un test de compétition entre les anticorps sériques d'infection humaine et l'anticorps monoclonal anti-30 Kd. Les résultats semblent indiquer la présence dans les sérums d'infection d'anticorps qui reconnaissent le même déterminant antigénique que celui reconnu par l'anticorps monoclonal ou au moins un autre très proche et sur la même molécule. De plus, un dosage des immunoglobulines humaines de classe IgG ou IgM impliquées dans la compétition peut être réalisé postérieurement au test, le taux permettant de quantifier les anticorps spécifiques chez l'homme lors des différents stades cliniques de l'infection.

5.2.3.2. Immunoréponse vis-à-vis des antigènes de surface

Les anticorps monoclonaux dirigés contre la membrane de T. gondii ayant une réactivité en I.F.I., ont été développés par HANDMAN et REMINGTON (1980a) ; SETHI et coll. (1980) et JOHNSON et coll. (1981). Une caractérisation préliminaire d'antigènes de membrane de tachyzoïtes a été effectuée par HANDMAN et REMINGTON avec différentes souches de T. gondii RH, C₃₇ et C₅₆, marquées à l'iode et immunoprécipitées par des sérums de souris en phase chronique d'infection. Quatre protéines majeures marquées sont décelées avec les 3 souches à un poids moléculaire de 43-35-27 et 14 Kd.

Le marquage des tachyzoïtes, par l'¹²⁵I en présence de lactoperoxydase, nous a permis de mettre en évidence un nombre limité de protéines de surface précipitées par les anticorps produits au cours de la toxoplasmose expérimentale ou humaine. Cette étude a pour but d'analyser le développement de la réponse anticorps contre les antigènes de surface du tachyzoïte au cours de l'infection humaine. Trois antigènes majeurs de poids moléculaire de 43, 30 et 22 Kd et deux mineurs à 35 et 14 Kd ont été identifiés par des sérums de souris et humains infectés par T. gondii. Le profil antigénique, reconnu par les anticorps sériques spécifiques varie considérablement pendant l'infection ; en effet, la distinction entre la phase aiguë et la phase chronique est difficile à établir. La notion importante apportée par cette étude est la démonstration que l'homme atteint d'une toxoplasmose présente des anticorps contre l'antigène 30 Kd et dans la plupart des cas des anticorps contre l'antigène 43 Kd quand l'infection est douteuse ou récente tandis que l'intensité de la réponse anti-30 Kd est plus importante au moment du développement d'une immunité à la réinfection. Chez la souris cette période correspond à la 4^{ème} semaine d'infection ; nous avons pu vérifier l'absence d'anticorps anti-30 Kd dans les sérums de souris au moment de la période précoce d'infection.

Ainsi, certains déterminants antigéniques, reconnus par les anticorps sériques, sont accessibles à la surface des parasites vivants. Cette situa-

tion conduit à envisager la participation de ces antigènes dans des mécanismes d'immunité dépendants d'anticorps spécifiques. L'utilisation des anticorps produits dans ce travail suggère que l'antigène 30 Kd pourrait être responsable d'un mécanisme effecteur. Cette hypothèse est appuyée indirectement par la cinétique de la réponse immune humorale chez la souris et chez l'homme et plus directement par les expériences préliminaires très récentes de protection passive conférée par les anticorps monoclonaux de classe IgG1, lors d'infections aiguës et chroniques chez la souris.

CONCLUSION

Nos résultats confirment que la molécule de surface de 30 Kd est un immunogène majeur dans la Toxoplasmose. A ce titre, il est possible d'espérer une application des anticorps monoclonaux obtenus dans le diagnostic de cette maladie, dont l'importance dans la pathologie du nouveau-né n'est pas négligeable. En outre, des résultats parallèles à ceux de JOHNSON et coll. (1983) n'excluent pas la possibilité d'une protection par la molécule 30 Kd, ce qui ouvre à des perspectives très importantes. Notre travail préliminaire sur la biosynthèse de cette molécule montre que cette protéine est activement transcrite et que l'on peut vraisemblablement espérer obtenir in vitro et analyser précisément les séquences responsables de son immunogénicité et éventuellement les utiliser à des fins protectrices.

REFERENCES

- AKONG, Q.F., FISCHER, D., TAMPION, W., LUCY, J.A. (1975) Mechanism of cell fusion. Nature , 253 , 194.
- ANDERSON, J., MERLCHERS, F. (1978) The antibody repertoire cell lines obtained by fusion of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. Cur. Trop. Microbiol. Immunol. , 81 , 130.
- ANTHONY, R.L., CODY, T.S., CONTAMINE, N.T. (1981) Antigenic differentiation of Trypanosoma cruzi and Trypanosoma rangeli by means of monoclonal hybridoma antibodies. Am. J. Trop. Med. Hyg. , 30 , 1192.
- ARAUJO, F.G., HANDMAN, E., REMINGTON, J.S. (1980a) Binding of lectins to the cell surface of Trypanosoma cruzi . J. Protozool. , 27 , 397.
- ARAUJO, F.G., HANDMAN, E., REMINGTON, J.S. (1980b) Use of monoclonal antibodies to detect antigens of Toxoplasma gondii in serum and other body fluids. Infect. Immunity , 30 , 12.
- ARAUJO, F.G., REMINGTON, J.S. (1980) Antigenemia in recently acquired acute toxoplasmosis. J. Infect. Dis. , 141 , 144.
- ARAUJO, F.G., WONG, M.M., THEIS, REMINGTON, J.S. (1973) Experimental Toxoplasma gondii infection in a nonhuman primate. Am. J. Trop. Med. Hyg. , 22 , 465.
- BARSKI, G., CORNEFERT, F. (1960) Production dans des cultures in vitro de deux souches cellulaires en association de cellules de caractère "hybride". C.R. Acad. Sci. (Paris), 251 , 1825.

BAZIN, H., BECKERS, A., QUERINJEAN, P. (1974) Three classes and four subclasses of rat immunoglobulins : IgM, IgA, IgE and IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c. Eur. J. Immunol. , 4 , 44.

BEVERLEY, J.K.A. (1958) A rational approach to the treatment of toxoplasmic uveitis. Trans. Ophthalmol. Soc. UK , 78 , 9.

BEVERLEY, J.K.A. (1959) Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. Nature , 183 , 1348.

CARLIER, Y., BOUT, D., DESSAINT, J.P., CAPRON, A., VAN KNAPEN, F., RUITENBERG, E.J., BERGQUIST, R., HULDT, G. (1980) Evaluation of the ELISA and other serological tests for the diagnosis of toxoplasmosis. W.H.O. , 58 , 99.

CHBOUKI, N., DUBREMETZ, J.F. (1981) Redistribution des récepteurs superficiels chez les sporozoites d' Eimeria nieschulzi (coccidie) induite par différents ligands. J. Protozool. , 29 , 299.

CLEVINGER, B., HANSBURG, D., DAVIE, J. (1978) Murine anti- α (1-3) dextran antibody production by hybrid cells. Curr. Topics Microbiol. Immunol. , 81 , 110.

COCHRANE, A.H., SANTORO, F., NUSSENZWEIG, V., GWADZ, R.W., NUSSENZWEIG, R. S. (1982) Monoclonal antibodies identify the protective antigens of sporozoites of Plasmodium knowlesi . Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) , 79 , 5651.

CONLEY, F.K., JENKINS, K.A. (1981a) Immunohistological study of the anatomic relationship of *Toxoplasma* antigens to the inflammatory response in the brains of mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immunol.* , 31 , 1184.

CONLEY, F.K., JENKINS, K.A., REMINGTON, J.S. (1981b) *Toxoplasma gondii* infection of the central nervous system : use of the PAP method to demonstrate *Toxoplasma* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *Hum. Pathol.* , 12 , 690.

COON, H.G., WEISS, M.C. (1969a) A quantitative comparison of formation of spontaneous and virus produced viable hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 62 , 852.

COON, H.G., WEISS, M.C. (1969b) Sendai produced somatic cell hybrids between L cell strains and liver and L cells. In : Heterospecific Genome Interactions. The Wistar Institute Symposium, pp. 83-96. The Wistar Institute Press, Philadelphia.

COTTON, R.G.H., SECHER, D.S., MILSTREIN, C. (1973) Somatic mutation and the origin of antibody diversity clonal variability of immunoglobulin produced by MOPC 21 cell in culture. *Eur. J. Immunol.* , 3 , 135.

DAVIDSON, M.R., GERALD, P. (1976) Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridation by polyethylene glycol. *Somat. Cell. Genet.* , 2 165.

des MOUTIS, I., OUAISSI, A., GRZYCH, J.M., YARZABAL, L., HAQUE, A., CAPRON, A. (1983) *Onchocerca volvulus* : detection of circulating antigen by monoclonal antibodies in human onchocerciasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 32 , 533

DISSOUS, C., DISSOUS, C., CAPRON, A. (1981) Isolation and characterization of surface antigens from Schistosoma mansoni schistosomula. Mol. Biochem. Parasitol. , 3 , 215.

DUBEY, J.K., MILLER, N.L., FRENKEL, J.K. (1970) The Toxoplasma gondii oocyst from cat feces. J. Exp. Med. , 132 , 636.

DUBREMETZ, J.F. (1981) Les zoïtes des coccidies : cytologie, biochimie, physiologie et interactions avec la cellule hôte. Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques de Lille I. 112 p.

DZBENSKI, T.H., ZIELINSKA, E. (1976). Antibody-induced formation of caps in Toxoplasma gondii . Experientia , 32 , 454.

EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, W.E., GOTTLIEB, P.D., RUTISHUSER, U., WAXDAL, M.J. (1969). The covalent structure of an entire 6 immunoglobulin molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 63 , 78.

EICHENWALD, H.F., SHINEFIELD, H.R. (1963) Antibody production by the human fetus. J. Pediatr. , 63 , 870.

EPHRUSSI, B. (1964) Chromosomal markers. Somatic Cell Genetics. R.S. Krooth Ed., pp. 253-273, University of Michigan Press, Ann. Arbor, Michigan.

EPHRUSSI, B. (1972) In : Hybridization of somatic cells. Princeton, New Jersey, Princeton University Press, pp. 23.

EPSTEIN, N., MILLER, L.H., KAUSHEL, D.C., UDEINYA, I.J., RENER, J., HOWARD, R.J., ASOFSKY, R., AIKAWA, M., HESS, R.L. (1981) Monoclonal antibodies against a specific surface determinant on malarial (Plasmodium knowlesi) merozoites block erythrocyte invasion. J. Immunol. , 127 , 212.

ERLICH, H.A., RODGERS, G., VAILLANCOURT, P., ARAUJO, F.G., REMINGTON, J. (1983) Identification of an antigen-specific immunoglobulin M antibody associated with acute Toxoplasma infection. Infect. Immunol. , 41 , 683.

FELDMAN, H.A. (1956) The relationship of Toxoplasma antibody activator to the serum-properdin system. Ann. N.Y. Acad. Sci. , 66 , 263.

FELDMAN, H.A., LAMB, G.A. (1966) A micromodification of the Toxoplasma dye-test. J. Parasitol. , 52 , 415.

FILICE, G.A., YEAGER, A.S., REMINGTON, J.S. (1980) Diagnostic significance of immunoglobulin M antibodies to Toxoplasma gondii detected after separation of immunoglobulin M from immunoglobulin G antibodies. J. Clin. Microbiol. , 12 , 336.

FREEMAN, R.R., TREJDOSIEWICZ, A.J., CROSS, G.A.M. (1980) Protective monoclonal antibodies recognizing stage-specific merozoites antigens of a rodent malaria parasite. Nature , 284 , 366.

FRENKEL, J.K. (1961) Pathogenesis of toxoplasmosis with a consideration of cyst rupture in Besnoitia infections. Surv. Ophthalmol. , 6 , 799.

FRENKEL, J.K. (1970) Pursuing Toxoplasma . J. Infect. Dis. , 122 , 553.

FRENKEL, J.K., NELSON, B.M., ARIAS-STELLA, J. (1975) Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis : clinical and experimental aspects. Hum. Pathol., 6 , 97.

FROLAND, S.S., NATVIG, J.B. (1972) Class, sub-class and allelic exclusion of membrane-bound Ig of human B lymphocytes. J. Exp. Med. , 136 , 409.

FUJITA, K., KAMEI, K., SHIOIRI-NAKANO, K. (1970) Toxoplasma : seroreactions with antibody fragments. Exp. Parasitol. , 27 , 395.

GALFRE, B., MILSTEIN, G. (1981) In : Methods of Enzymology, 73 , Immunochemical techniques (Part B), Acad. Press, Inc, p. 3.

GANSHOW, R. (1966) Glucuronidase gene expression in somatic hybrids. Science , 153 , 84.

GERSHON, D., SACHS, L. (1963) Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. Nature , 198 , 912.

GODING, J.W. (1980) Antibody production by hybridomas. J. Immunol. Methods, 39 , 285.

GRIMWOOD, B.G., HECHERY, K., STEVENS, R.W. (1979) Toxoplasma gondii purification of trophozoites propagated in cell culture. Exp. Parasitol. , 48 , 282.

GRZYCH, J.M., CAPRON, M., VERWAERDE, C., NOGUEIRA-QUEIROZ, A., BAZIN, H., CAPRON, A. (1982) Monoclonal anti- Schistosoma mansoni antibodies. A summary of recent progresses. In : Proprieties of the Monoclonal Antibodies Produced by Hybridome Technology and their Application to the Study of Diseases. Proceedings of a symposium held at the National University of Singapore 1981, p. 105.

HANDMAN, E., REMINGTON, J.S. (1980a) Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to Toxoplasma gondii . Immunol. , 49 , 579.

HANDMAN, E., REMINGTON, J.S. (1980b) Antibody responses to Toxoplasma antigens in mice infected with strains of different virulence. Infect. Immunol. 29 , 215.

HANDMAN, E., GODING, J.W., REMINGTON, J.S. (1980c) Detection and characterization of membrane antigens of Toxoplasma gondii . J. Immunol. , 124 , 2578.

HAUSER, W.E., REMINGTON, J.S. (1981) Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of Toxoplasma gondii of normal macrophages. Infect. Immunity , 32 , 637.

HAUSER, W.E., SHARMA, S.E., REMINGTON, J.S. (1983) Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of Toxoplasma gondii . J. Immunol. , 131 , 458.

HOLLINGDALE, M.R., LELAND, P., LEEF, J.L., SCHWARTZ, A.L. (1983) Entry of Plasmodium berghei sporozoites into cultured cells and their transformation into trophozoites. Am. J. Trop. Med. Hyg. , 32 , 685.

HOWARD, J.C., BUTCHER, G.W., GALFRE, G., MILSTEIN, C. (1978) Monoclonal, anti-rat MHC (H-1) alloantibodies. In : Curr. Topics Microbiol. & Immunol. , 81 , 54.

HUGHES, H.P.A. (1981) Characterization of the circulating antigen of Toxoplasma gondii . Immunol. Letters , 3 , 99.

HUGHES, H.P.A., VAN KNAPEN, F. (1982) Characterization of a secretory antigen from Toxoplasma gondii and its role in circulating antigen production. Int. J. Parasitol. , 12 , 433.

HULDT, G. (1963) Experimental toxoplasmosis. Parasitemia in guinea pigs. Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 58 , 457.

HULDT, G. (1971) Studies on experimental toxoplasmosis. Ann. N.Y. Acad. Sci 177 , 146.

HUTCHISON, W.M. (1965) Experimental transmission of Toxoplasma gondii . Nature , 206 , 961.

HUTCHISON, W.M. (1969) Observations on the faecal transmission of Toxoplasma gondii . Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 77 , 275.

HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F. (1970) Intestinal forms of the coccidian parasite Toxoplasma gondii . J. Parasitol. , 56 , 429.

HUTCHISON, W.M., DUNACHIE, J.F. (1971) The life cycle of the coccidian parasite, Toxoplasma gondii , in the domestic cat. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. , 65 , 380.

JACOBS, L., REMINGTON, J.S., MELTON, M.L. (1960) A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted Toxoplasma. J. Parasitol. , 46 , 23.

JACOBS, L. (1967) Toxoplasma and toxoplasmosis. Adv. Parasitol. , 7 , 1.

JENSEN, J.B., EDGAR, S.A. (1976) Possible secretory function of the rhoptries of Eimeria magna during penetration of cultured cells. J. Parasitol. 62 , 988.

JOHNSON, A.M., MCNAMARA, P.J., NEOH, S.H., MCDONALD, P.J., ZOLA, H. (1981) Hybridomes secreting monoclonal antibody to Toxoplasma gondii . Ajebak , 59 , 303.

JOHNSON, A.M., MCDONALD, P.J., NEOH, S.H. (1981) Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of Toxoplasma gondii . Biochem. Bioph. Res. Commun. , 100 , 934.

JOHNSON, A.M., MCDONALD, P.J., NEOH, S.H. (1983) Molecular weight analysis of Toxoplasma gondii soluble antigens. J. Parasitol. , 69 (in press).

JOHNSON, A.M., MCDONALD, P.J., NEOH, S.H. (1983) Monoclonal antibodies to Toxoplasma cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. J. Protozool. , 30 , 351.

JOHNSON, A.M., HAYNES, W.D., LEPPARD, P.J., MCDONALD, P.J., NEOH, S.H. (1983) Ultrastructural and biochemical studies on the immunohistochemistry of Toxoplasma gondii antigens using monoclonal antibodies. Histochemistry , 77 , 209.

KASPER, L.H., CRABB, J.H., PFEFFERKORN, E.R. (1982) Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of Toxoplasma gondii . J. Immunol. , 129 , 1694.

KASPER, L.H., CRABB, J.H., PFEFFERKORN, E.R. (1983) Purification of a major membrane protein of Toxoplasma gondii by immunoabsorption with a monoclonal antibody. J. Immunol. , 130 , 2407.

KAUFMAN, H.E., MELTON, M.L., REMINGTON, J.S., JACOBS, L. (1959) Strain differences of Toxoplasma gondii . J. Parasitol. , 45 , 189.

KOHLER, G., HOWE, S.C., MILSTEIN, C. (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. Eur. J. Immunol. , 6 , 292.

KOHLER, G., PEARSON, T., MILSTEIN, C. (1977) Fusion of T and B cells. Somat. Cell. Genet. , 3 , 303.

KOHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature , 26 , 495.

KRAHENBUHL, J.L., GAINES, J.D., REMINGTON, J.S. (1972a) Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis. J. Infect. Dis. , 125 , 283.

KRONVALL, G., GREY, H.M., WILLIAMS, R.C. (1970) Protein A reactivity with mouse immunoglobulins. Structural relationship between some mouse and human immunoglobulins. J. Immunol. , 105 , 1116.

KUHN, D., WEILAND, G. (1969) Experimentelle Toxoplasma-Infektionen bei der Katze. I. Wiederholte Übertragung von Toxoplasma gondii durch Kot von mit Nematoden infizierten Katzen. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. , 82 , 401.

LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature , 227 , 680.

LAINSON, R. (1958) Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of Toxoplasma gondii . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. , 52 , 396.

LASKEY, R.A., MILLS, A.D. (1975) Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. , 56 , 335.

LIEBERMAN, R., POTTER, M., MUSHINSKI, E.B., HUMPHREY, W.Jr, RUDIKOFF, S. (1974) Genetics of a new Ig VH (T15 idiotype) marker in the mouse regulating natural antibody to phosphoryl choline. J. Exp. Med. , 139 , 983.

LITTLEFIELD, J. (1964) Selection of hybrids from mating of fibroblast in vitro and their presumed recombinantes. Sciences , 145 , 709.

LYCKE, E., NORRBY, R., REMINGTON, J.S. (1968). Penetration enhancing factor extracted from Toxoplasma gondii with increase in its virulence from mice. J. Bacteriol. , 96 , 785.

MARCHALONIS, J.J., CONE, R.E., SANTER, V. (1971) Enzyme iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. J. Biochem. , 124 , 921.

MAS BAKAL, P., IN'T VELD, N. (1979) Demonstration of circulating antigen, antibody and parasitaemia after experimental Toxoplasma infection in mice. Acta Leidensia , 47 , 37.

- McCONAHEY, P.J., DIXON, F.J. (1966) A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. Int. Arch. Allergy , 29 , 185.
- McKEARN, T.J., SARMIENTO, M., WEISS, A., STUART, F.P., FITCH, F.W. (1978) Selective impression of reactivity to rat histocompatibility antigens by hybridoma antibodies. Cur. Trop. Microbiol. Immunol. , 81 , 61.
- MILLER, M.J., ARONSON, W.J., REMINGTON, J.S. (1969) Late parasitemia in asymptomatic acquired toxoplasmosis. Ann. Intern. Med. , 71 , 139.
- MILSTEIN, C. (1980) Les anticorps monoclonaux. Pour la Science , 38 , 46.
- MITCHELL, G.F., CRUISE, K.M., GARCIA, E.G., ANDERS, R.F. (1981) Hybridoma-derived antibody with immunodiagnostic potential for schistosomiasis japonica. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 78 , 3165.
- NAOT, Y., REMINGTON, J.S. (1980) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to Toxoplasma gondii : use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis. , 142 , 757.
- NICHOLS, B.A., CHIAPPINO, M.L., O'CONNOR, G.R. (1983) Secretion from the Rhoptries of Toxoplasma gondii during host-cell invasion. J. Ultrastr. Res. , 83 , 85.
- NICOLLE, C.H., MANCEAUX, L. (1908) Sur un protozoaire nouveau du gondii Toxoplasma n.gen. Arch. Inst. Pasteur Tunis , 1 , 97.
- NISONOFF, A., HOPPER, J.E., SPRING, S.B. (1975) The antibody molecule, Dixon F.J., Kunkel H.G. (eds), Acad. Press, p. 407.

NORRBY, R., LYCKE, E. (1967) Factors enhancing the host cell penetration of Toxoplasma gondii . J. Bacteriol. , 93 , 53.

OROZCO, O. (1982) Production d'anticorps monoclonaux anti-antigène 5 de Trypanosoma cruzi . D.E.R.B.H., Faculté de Médecine de Lille II, 141 p.

OUCHTERLONY, D. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. Progr. Allergy , 5 , 1.

PFEFFERKORN, E.R., PFEFFERKORN, L.C., COLBY, E.D. (1977) Development of gametes and oocysts in cats fed cysts derived from cloned trophozoites of Toxoplasma gondii . J. Parasitol. , 63 , 158.

PERRIN, L.H., RAMIREZ, E., LAMBERT, P.H., MIESCHER, P.A. (1981) Inhibition of P. falciparum growth in human erythrocytes by monoclonal antibodies. Nature , 289 , 301.

PONTECORVO, G. (1975) Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. Somat. Cell. Genet. , 1 , 397.

PORCHET-HENNERE, E., TORPIER, G. (1977) Etude du germe infectieux de sarcocystis Tenela et Toxoplasma gondii par la technique du cryodecapage. Z. Parasitenk. , 54 , 101.

POTOCNJAK, P., YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R.S., NUSSENZWEIG, V. (1980) Monovalent fragments (Fab) of monoclonal antibodies to a sporozoite surface antigen (Pb44) protect mice against malarial infection. J. Exp. Med. , 151, 1504.

POTTER, M., WAITERS, J.L. (1973) Effects of intraperitoneal pristane on

established immunity to the Adj-PC-5 plasmacytoma. J. Nat. Cancer Inst. , 51 , 875.

RAIZMAN, R.E., NEVA, F.A. (1975) Detection of circulating antigen in acute experimental infections with Toxoplasma gondii . J. Infect. Dis. , 132 , 44

REMYNGTON, J.S., MELTON, M.L., JACOBS, L. (1961a) Induced and spontaneous recurrent parasitemia in chronic infections with avirulent strains of Toxoplasma gondii . J. Immunol. , 87 , 578.

REMYNGTON, J.S., JACOBS, L., MELTON, M.L. (1961b) Congenital transmission of toxoplasmosis from mother animals with acute and chronic infections. J. Infect. Dis. , 198 , 163.

REMYNGTON, J.S., CAVANAUGH, E.N. (1965) Isolation of the encysted form of Toxoplasma gondii from skeletal muscle and brain. New Engl. J. Med. , 273 , 1308.

REMYNGTON, J.S., HACKMAN, R. (1966) Changes in mouse serum proteins during acute and chronic infection with an intracellular parasite (Toxoplasma gondii). J. Immunol. , 95 , 1023.

REMYNGTON, J.S., MILLER, M.J., BROWNLEE, I. (1968) IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. J. Lab. Clin. Med. , 71 , 855.

REMYNGTON, J.S., DESMONTS, G. (1976) Toxoplasmosis. in Remington J.S., Klein, J.O. (eds) Infections Diseases of the Fetus and Newborn Infant , 191 , W.B. Saunders, Philadelphia.

SABIN, A.B., FELDMAN, H.A. (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (Toxoplasma). Science , 108 , 660.

SCALETTA, L., EPHRUSSI, B. (1965) Hybridization of normal and neoplastic cells in vitro . Nature , 207 , 1169.

SCHUPP, E., MICHEL, R., RAETHER, W., NIEMEITZ, H., UPHOFF, M. (1978) Invasion von erythrozyten durch Toxoplasma gondii . Z. Parasitenkd. , 55 , 189.

SELIGMAN, M., BROUET, J.C. (1973) Antibody activity of human myeloma globulins. Seminars in Hematology , 10 , 163.

SETHI, K.K., RAHMAN, A., PELSTER, B., BRANDIS, H. (1977) Search for the presence of lectin-binding sites on Toxoplasma gondii . J. Parasitol. , 63, 1076.

SETHI, K.K., ENDO, T., BRANDIS, H. (1980) hybridomas secreting monoclonal antibody with specificity for Toxoplasma gondii . J. Parasitol. , 66 , 192.

SETHI, K.K., ENDO, T., BRANDIS, H. (1981) Toxoplasma gondii trophozoites precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. Immunol. Letters , 2 , 343.

SETHI, K.K., BRANDIS, M. (1981) Generation of hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies against Toxoplasma gondii of rabies virus following fusion of in vitro -immunized spleen cells with myeloma cells. Ann. Immunol. , 132c , 29.

SHARMA, S.D., MULLENAX, J., ARAUJO, F.G., ERLICH, H.A., REMINGTON, J.S.

(1983) Western blot analysis of the antigens of Toxoplasma gondii recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immunol. , 131 , 977.

SHEFFIELD, H.G., MELTON, M.L. (1970) Toxoplasma gondii : the oocyst, sporozoite and infection of cultured cells. Science , 167 , 892.

SHULMAN, M., WILDE, C.D., KOHLER, G. (1978) A better line for making hybridomas secreting specific antibodies. Nature , 276 , 269.

SIEGEL, S.E., LUNDE, M.N., GELDERMAN, A.H., HALTERMAN, R.H., BROWN, J.A., LEVINE, A.S., GRAW, R.G. (1971) Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. Blood , 37 , 188.

SNARY, D., FERGUSON, M., SCOTT, M., ALLEN, A. (1981) Cell surface antigens of Trypanosoma cruzi : use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol. , 3 , 343.

SORIEULS, S., EPHRUSSI, B. (1961) Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro . Nature , 190 , 653.

STADTSBAEDER, S., NGUYEN, B.T. (1977) Etude de l'immunité anti-toxoplasme chez les souris athymiques congénitales nu/nu. Ann. Immunol. , 128c , 149.

STRANNEGARD, O. (1967a) The formation of Toxoplasma antibodies in rabbits. Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 71 , 439.

STRANNEGARD, O. (1967b) Kinetics of the in vitro immunoinactivation of Toxoplasma gondii . Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 71 , 450.

SUTTON, R., WRIGLEY, C.W., BALDO, B.A. (1982) Detection of IgE- and IgG-

binding proteins after electrophoretic transfer from polyacrylamide gels. J. Immunol. Methods , 52 , 183.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and source applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 76 , 4350.

TSANG, V.C.W., PERALTA, J.M., SIMMONS, A. R. (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer Blot Techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Methods Enzymology , 92 , 377.

VAN DER WAAIJ, D. (1959) Formation, growth and multiplication of Toxoplasma gondii cysts in mouse brains. Trop. Geogr. Med. , 11 , 345.

VAN KNAPEN, F., PANGGABEAN, S.O. (1977) Detection of circulating antigen during acute infections with Toxoplasma gondii by ELISA. J. Clin. Microbiol. , 6 , 545.

VAN KNAPEN, F., PANGGABEAN, S.O. (1980) Laboratory diagnosis of toxoplasmosis by means of an ELISA triple test (detection of class-specific IgG, IgM and circulating antigens). Antonie van Leeuwenhoek , 46 , 102.

VERWAERDE, C., GRZYCH, J.M., BAZIN, H., CAPRON, M., CAPRON, A. (1979) Production d'anticorps monoclonaux anti- Schistosoma mansoni . Etude préliminaire de leurs activités biologiques. C.R. Acad. Sci. (Paris), 289d , 725.

WALDELAND, H., FRENKEL, J.K. (1983) Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. J. Parasitol. , 69 , 60.

WARREN, J., SABIN, A.B.(1942) Effect of certain antiprotozoal drugs on Toxoplasma in vitro and in vivo . Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 51 , 15.

WARREN, J., RUSS, S.B. (1948) Cultivation of Toxoplasma in embryonated egg. An antigen derived from chorioallantoic membrane. Proc. Soc. Exp. Biol. Med 67 , 85.

WEIGERT, M., RASHKE, W.C., CARSON, D., COHN, M. (1974) Immunochemical analysis of the idiotypes of mouse myeloma proteins with specificity for levan or dextran. J. Exp. Med. , 139 , 137.

WEISS, M.C., GREEN, H. (1967) Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 58 , 1104.

WOLF, A., COWEN, D., PAIGE, M.D. (1939) Toxoplasmic encephalomyelitis 3. A new case of granulomatous encephalomyelitis due to a protozoon. Amer. J. Pathol. , 15 , 657.

WORK, K., HUTCHISON, W.M. (1969a) A new cystic form of Toxoplasma gondii . Acta Pathol. Microbiol. Scand. , 75 , 191.

WORK, K., HUTCHISON, W.M. (1969b) The new cyst of Toxoplasma gondii . Acta Pathol. Microbiol. Scand., 75 , 414.

YERGANIAN, G., NELL, N. (1966) Hybridization of dwarf hamster cell by UV-inactivated sendai virus. Proc. Natl. Acad. Sci. , 55 , 1066.

YOSHIDA, N., NUSSENZWEIG, R.S., POTOCNJAK, P., NUSSENZWEIG, V., AIKAWA, M. (1980) Hybridoma produces protective antibodies directed against the sporo-

zoite stage of malaria parasite. Science , 207 , 71.

YOSHIDA, N., POTOČNJAK, P., NUSSENZWEIG, V., NUSSENZWEIG, R.S. (1981) Biosynthesis of Pb44, the protective antigen of sporozoites of Plasmodium berghei . J. Exp. Med., 154 , 1225.

