

50376
1988
177



50376
1988
177

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1988

N° d'ordre : 276

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE

Diplôme présenté pour l'obtention du grade de

DOCTEUR EN BIOCHIMIE

par

Paola LEITE-CARDARELLI

*CLONAGE DE L'ANTIGENE MAJEUR DE SURFACE
DE TOXOPLASMA GONDII, P30*

présentée le 16 novembre 1988

devant la Commission d'Examen :

MM. J. MONTREUIL: Président

S. BALL,

A. TARTAR : Rapporteurs

A. CAPRON,

R. PIERCE : Examineurs

L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, Unité Mixte INSERM U 167 - CNRS 624 (1, rue du Pr Calmette, 59019 Lille Cédex), sous la direction de Mr le Professeur André CAPRON.

A mes enfants, Leonardo et Leandro,

A ma mère, Nereide,

A mon père, Mario, "*in memoriam*"

A José Paulo, mon époux, en témoignage de
toute mon affection.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur André CAPRON qui m'a accueillie dans son Laboratoire et qui a dirigé ce travail avec compétence et sagesse, transformant ainsi ces trois années de stage en une expérience inoubliable.

J'exprime toute ma reconnaissance à :

Raymond PIERCE et Marie-France CESBRON-DELAUW
qui m'ont apporté la formation scientifique sans
laquelle ce travail n'aurait pu voir le jour,

Françoise DARCY, Colette DISSOUS et Ferruccio
SANTORO pour leur précieuse collaboration scientifique,

Thérèse LEPRESLE et Philippe BOUTIN pour
leurs compétences techniques et leur disponibilité,
ainsi que leur sincère amitié tout au long de ce
travail,

Marie-Pierre FOURMAUX, Didier DESLEE, Marc
LOYENS, Josette FONTAINE, Jacques TROLET, Anita CARON,
Catherine CHAMPAGNE et Jacklyne DERICK pour leur
collaboration amicale,

Hubert CARON et Claude GODIN pour la
production des tachyzoïtes de *T. gondii*,

Nanou PHAM, Mahmoud KWEIDER, Haleh CHARIF,
Farrukh RIZVI et Odile DUVAUX pour tous nos échanges
sympathiques,

Claudine COLSON et Marie-France MASSARD pour
la mise en page de ce manuscrit, et Christian DROLEZ
pour les illustrations.

Ce travail a bénéficié de plusieurs collaborations. Je tiens à remercier plus particulièrement :

Monsieur le Professeur André TARTAR, Hélène GRAS et Pierrette MAES pour la purification de l'antigène P30 par HPLC et pour la synthèse du peptide et son couplage sur une protéine porteuse,

Monsieur Patrick MARTIN pour l'aide dans le séquençage du clone génomique dans le système Applied,

Mademoiselle Fabienne DENHEZ pour la synthèse de l'oligonucléotide,

Monsieur Gérard TORPIER pour la Microscopie Electronique,

Madame Anne DECOSTER qui nous a aimablement fourni les sérums humains,

Monsieur Dominique STEHELIN qui a mis à notre disposition le système informatique de son Service.

Je remercie également le "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil" (CNPq) pour ses subsides.

Que Messieurs Jean MONTREUIL, Steven BALL, André TARTAR, André CAPRON et Raymond PIERCE soient assurés de ma sincère reconnaissance pour avoir accepté de juger l'ensemble des travaux présentés dans ce Mémoire.

Le travail "Clonage et séquençage de la P30 de *T. gondii*" (CAPRON A., PIERCE R.J., TARTAR A., LEITE P., CEBRON-DELAUW M.F., MAES P., DARCY F.) fait l'objet d'un Brevet de propriété industrielle déposé en France le 24 juin 1988, sous le n° 88.08535.

Nos travaux, durant ces trois années, ont fait l'objet des publications suivantes :

SANTORO F., AURIAULT C., LEITE P., DARCY F. and CAPRON A. (1987) Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. C.R.Acad.Sc.Paris, 11 : 297.

RIDEL P.R., AURIAULT C., DARCY F., PIERCE R.J., NEYRINCK J.L., KUSNIEZ J.P., LEITE P., CAPRON A. (1988) Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. J. Immunol., 141 : 978.

RIDEL P.R., AURIAULT C., DARCY F., PIERCE R.J., LEITE P., NEYRINCK J.L., KUSNIEZ J.P., CAPRON A. (1988) Protective role of IgE in Immunocompromized rat toxoplasmosis. Société Française d'Immunologie and British Society for Immunology. Joint Meeting, Spring 1988, Paris, April 7-8-9, 1988. Abstract, p 44.

RIDEL P.R., AURIAULT C., DARCY F., PIERCE R.J., NEYRINCK J.L., KUSNIEZ J.P., LEITE P., CAPRON A. (1988) Toxoplasmosis in the rat : role of IgE in protection of Nu/Nu littermates. FASEB Journal, 2 : A453, 72nd Annual Meeting Las Vegas, Nevada, May 1-5, 1988.

CESBRON-DELAUW M.F., GUY B., TORPIER G., LENZEN G., CESBRON J.Y., PIERCE R.J., FOURMAUX M.P., LEITE P., DARCY F., LECOQ J.P., CAPRON A. (1988) Molecular cloning and characterization of a major secreted antigen (P23) of *Toxoplasma gondii*. Nature (soumis à publication).

CESBRON-DELAUW M.F., GUY B., PIERCE R.J., TORPIER G., LENZEN G.,
CESBRON J.Y., FOURMAUX M.P., LEITE P., DARCY F., LECOQ J.P., CAPRON A.
Molecular characterization of major secreted immunogen
of *Toxoplasma gondii*. Cold Spring Harbor Symposium.
Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention
of AIDS, September 14-18, 1988 (Abstract).

CESBRON-DELAUW M.F., GUY B., PIERCE R.J., TORPIER G., LENZEN G.,
CESBRON J.Y., LEITE P., DARCY F., LECOQ J.P., CAPRON A. A strategy
for cloning potential protective antigens of *T. gondii*.
Cold Spring Harbor Symposium Modern Approaches to New
Vaccines Including Prevention of AIDS, September 14-18,
1988. Vaccine 89 (soumis à publication).

LEITE P., PIERCE R.J., CESBRON-DELAUW M.F., BOUTIN P., SANTORO F.,
LEPRESLE T., DARCY F., CAPRON A. Molecular cloning of the major
surface antigen of *T. gondii*, P30. En préparation.

DARCY F., CHARIF H., CARON H., DESLEE D., TORPIER G., PIERCE R.,
CESBRON-DELAUW M.F., DECOSTER A., LEITE P., RIDEL P.R., CAPRON A.
Identification d'antigènes de *Toxoplasma gondii*
impliqués dans l'immunité concomitante dans la
toxoplasmose. Réunion de la Société Française
d'Immunologie, Marseille, 1-2 décembre 1988 (Abstract).

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	20
GENERALITES.....	23
1. LE TOXOPLASME ET LA TOXOPLASMOSE.....	23
1.1. Historique.....	23
1.2. Cycle évolutif.....	24
A) Chez l'hôte définitif.....	26
B) Chez les hôtes intermédiaires.....	27
1.3. La Toxoplasmose.....	29
A) La Toxoplasmose acquise.....	31
B) La Toxoplasmose congénitale.....	31
C) La Toxoplasmose des sujets immunodéprimés	34
1.4. Le traitement de la Toxoplasmose.....	35
1.5. L'immunité dans la Toxoplasmose.....	37
A) Le rôle des anticorps.....	37
B) L'immunité à médiation cellulaire.....	40
2. METHODES DE DIAGNOSTIC.....	42
2.1. Test de lyse de SABIN et FELDMAN (Dye-Test)	44
2.2. Immunofluorescence Indirecte (IFI).....	45
2.3. Test de Remington.....	45
2.4. Réaction de fixation du complément.....	46
2.5. Réaction d'hémagglutination indirecte.....	46
2.6. Agglutination directe.....	46
2.7. Test immunoenzymatique (ELISA).....	47
2.8. Test d'immunocapture.....	47

2.9. ISAGA.....	48
2.10. Autres tests.....	49
3. LES ANTIGENES DES TACHYZOITES IMPLIQUES DANS L'IMMUNITE.....	49
3.1. Antigènes totaux.....	50
3.2. Antigènes de surface.....	50
3.3. Antigènes d'excrétion-sécrétion.....	52
4. LA PROTEINE MAJEURE DE SURFACE DE <i>T. GONDII</i> , P30.....	54
5. PROPRIETES DE L'ARN ET DE L'ADN DE <i>T. GONDII</i>	56
BUT DU TRAVAIL.....	59
RESULTATS.....	62
1. PREPARATION DES SONDAS.....	63
1.1. Purification de la molécule P30.....	63
1.2. Production d'anticorps monospécifiques.....	65
1.3. Biosynthèse de l'antigène P30.....	65
2. CLONAGE D'UNE PORTION DE LA SEQUENCE CODANTE POUR L'ANTIGENE P30.....	74
2.1. Obtention de l'ARNm de tachyzoïtes et de ses produits de traduction.....	74
2.2. Obtention du clone exprimant un (des) épitope(s) de l'antigène P30.....	75
2.3. Expression de la protéine recombinante.....	78
2.4. Sous-clonage de l'insert P30.8.....	82
2.5. Séquençage de l'insert du clone P30.8 et déduction de la séquence peptidique.....	85
2.6. Synthèse d'un peptide contenant un (des) épitope(s) de l'antigène P30.....	89
2.7. Hybridation avec l'ADN et l'ARN de <i>T. gondii</i>	93
3. RECHERCHE DE LA COPIE DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE P30.....	95

3.1. Détermination d'une fraction d'ADN génomique codant pour l'antigène P30.....	97
3.2. Préparation d'une banque génomique de la fraction de 1000 à 2000 pb de l'ADN de <i>T. gondii</i> dans le phage λ gt10.....	100
3.3. Criblage de la banque génomique.....	100
3.4. Détermination de la carte de restriction...	101
3.5. Sous-clonage des fragments de digestion....	107
3.6. Séquençage des fragments de digestion.....	110
DISCUSSION.....	113
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	126
APPENDICE TECHNIQUE.....	130
1. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE.....	130
1.1. Extraction des antigènes membranaires de tachyzoïtes.....	130
1.2. Extraction des antigènes marqués de tachyzoïtes.....	130
1.3. Purification de l'antigène P30 par chromatographie liquide de haute résolution (HPLC).....	131
1.4. Purification de l'antigène P30 par chromatographie d'immunoaffinité.....	131
1.5. Obtention des ARN messagers de tachyzoïtes	132
1.6. Obtention de l'ADN de tachyzoïtes.....	133
1.7. Souches bactériennes.....	134
1.8. Vecteurs de clonage.....	134
1.9. Enzymes de restriction.....	135
2. SYNTHÈSE DE PEPTIDES.....	135
3. SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES.....	136
4. TECHNIQUES DE MARQUAGE.....	137
4.1. Marquage métabolique par la ^{35}S méthionine	137

4.2. Marquage des antigènes membranaires de tachyzoïtes par le ^{125}I	138
4.3. Marquage d'un fragment d'ADN (insert) par le α ^{32}P	138
4.4. Marquage d'un oligonucléotide par le γ ^{32}P	139
5. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES ET D'HYBRIDATION SUR MEMBRANE.....	140
5.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide....	140
5.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle.....	140
5.1.2. Electrophorèse bidimensionnelle.....	140
5.1.3. Electrophorèse des chaînes d'ADN.....	141
5.2. Immunoélectrotransfert.....	141
5.3. Dot Immunoassay.....	143
5.4. Dot Blot d'acides nucléiques.....	143
5.5. Electrophorèse en gel d'agarose.....	144
5.5.1. Isolement de fragments d'ADN.....	144
5.5.2. Electrophorèse de transfert d'ARN (Northern Blot).....	144
5.5.3. Electrophorèse de transfert d'ADN (Southern Blot).....	146
6. AUTORADIOGRAPHIE.....	147
7. COLORATION DES GELS.....	147
7.1. Coloration des gels de polyacrylamide au nitrate d'argent.....	147
7.2. Coloration des gels de polyacrylamide au bleu de Coomassie.....	148
7.3. Coloration des gels d'agarose au Bromure d'Ethidium (BrEt).....	149
8. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES.....	149
8.1. Préparation des sérums d'animaux.....	149
8.1.1. Sérum anti- <i>T. gondii</i>	149

8.1.2. Sérum anti-P30.....	149
8.1.3. Sérum anti-protéine de fusion.....	149
8.1.4. Sérum anti-peptide.....	150
8.2. Préparation d'anticorps monoclonaux anti-P30	150
8.3. Sérums Humains.....	150
8.4. Réaction d'Immunofluorescence Indirecte (IFI).....	150
8.5. Immunoprécipitation.....	151
8.5.1. Formation d'immunocomplexes.....	151
8.5.2. Isolement des immunocomplexes.....	151
9. TECHNIQUES GENETIQUES.....	152
9.1. Culture des phages.....	152
9.2. Préparation de la banque de cDNA à partir de l'ARNm de tachyzoïtes.....	153
9.2.1. Criblage de la banque et sélection des candidats "P30".....	153
9.3. Préparation des lysogènes.....	154
9.4. Identification de la protéine de fusion produite par les phages recombinants.....	155
9.5. Préparation de la banque génomique de tachyzoïtes.....	156
9.5.1. Criblage de la banque génomique avec une sonde spécifique.....	156
9.6. Obtention de l'ADN phagique.....	157
9.7. Sous-clonage et amplification d'un fragment d'ADN (Insert) dans les plasmides pUC13 et pUC19.....	159
9.7.1. Sous-clonage.....	159
9.7.2. Amplification et purification de l'ADN plasmidique.....	160
9.8. Préparation de l'ADN simple brin à partir du phage M13.....	161

9.8.1. Obtention des phages.....	161
9.8.2. Sélection et amplification des phages....	162
9.9. Détermination de la carte de restriction du clone génomique.....	164
9.10. Séquençage des fragments d'ADN clonés.....	164
BIBLIOGRAPHIE.....	168

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 immunocompétent, elle est redoutable chez le fœtus et le nouveau-né en raison des atteintes cérébrales et oculaires qu'elle entraîne. Plus récemment, l'intérêt pour ce parasite s'est encore accru car il est un pathogène opportuniste majeur causant une encéphalite fatale chez les sujets immunodéprimés (receveurs de greffe ou patients atteints de S.I.D.A.). La toxoplasmose congénitale entraîne également des pertes importantes en agriculture, en particulier dans les élevages de porcs et de moutons (chez les moutons, 50 % des avortements spontanés sont causés par le toxoplasme).

Les infections parasitaires, qui sont un des problèmes majeurs de 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, dans le cas de *Toxoplasma gondii*, pour accéder à une approche précise et fine des

mécanismes immunitaires chez l'homme, il était absolument indispensable de disposer d'antigènes purifiés et bien caractérisés pour mettre en évidence des anticorps spécifiques.

GENERALITES

1. LE TOXOPLASME ET LA TOXOPLASMOSE

1.1. HISTORIQUE

Toxoplasma gondii, du grec Toxon : arc (en raison de la forme arquée du parasite), est un protozoaire intracellulaire, découvert par SPLENDORE au Brésil, et isolé quelques mois après à l'Institut Pasteur de Tunis par NICOLLE et MANCEAUX (1908) à partir d'un rongeur sauvage, le gondi (*Ctenodactylus gondi*). D'après la classification de LEVINE et al. (1980), *Toxoplasma gondii* appartient à l'embranchement des Apicomplexa, à la classe des sporozoea, au sous-ordre des coccidia, à l'ordre des Ericoccidiida, au sous-ordre des Eimeriina et à la famille des Toxoplasmidae.

Ce protozoaire, dont l'hôte définitif est le chat, parasite l'homme ainsi que d'autres mammifères et les oiseaux.

WOLF et al. (1939) décrivent le premier cas de toxoplasmose humaine.

SABIN (1941) montre qu'il s'agit dans tous les cas d'une seule et même espèce, *Toxoplasma gondii*.

SABIN et FELDMAN (1948) mettent au point un test immunologique précoce, sensible et spécifique, le "Dye test", qui permet le diagnostic sérologique de cette parasitose.

HUTCHINSON (1965) affirme que les toxoplasmes sont transmis par les oeufs d'un ascaris du chat (*Toxocara cati*).

Cependant, JACCS (1967) note que les selles du chat non parasité par *Toxocara cati* peuvent être également infectieuses.

WORK et HUTCHINSON (1969) 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 (1969) évoquent la ressemblance de cette forme avec l'ocyste des coccidies.

Les travaux de HUTCHINSON (1969), de FRENKEL (1970), de HUTCHINSON et DUNACHIE (1970), et de SHEFFIELD et MELTON (1970) apportent ensuite la confirmation que chez l'hôte intermédiaire la toxoplasmose est causée par un stade asexué du cycle d'une coccidie hétéroxène dont la reproduction sexuée se déroule chez les félinés.

1.2. CYCLE EVOLUTIF (FRENKEL, 1973) (Fig. 1)

L'évolution de *Toxoplasma gondii* se fait en deux étapes :

- chez le chat, hôte définitif, il s'agit de la phase coccidienne ou sexuée,
- chez les hôtes intermédiaires, il s'agit de la phase asexuée.

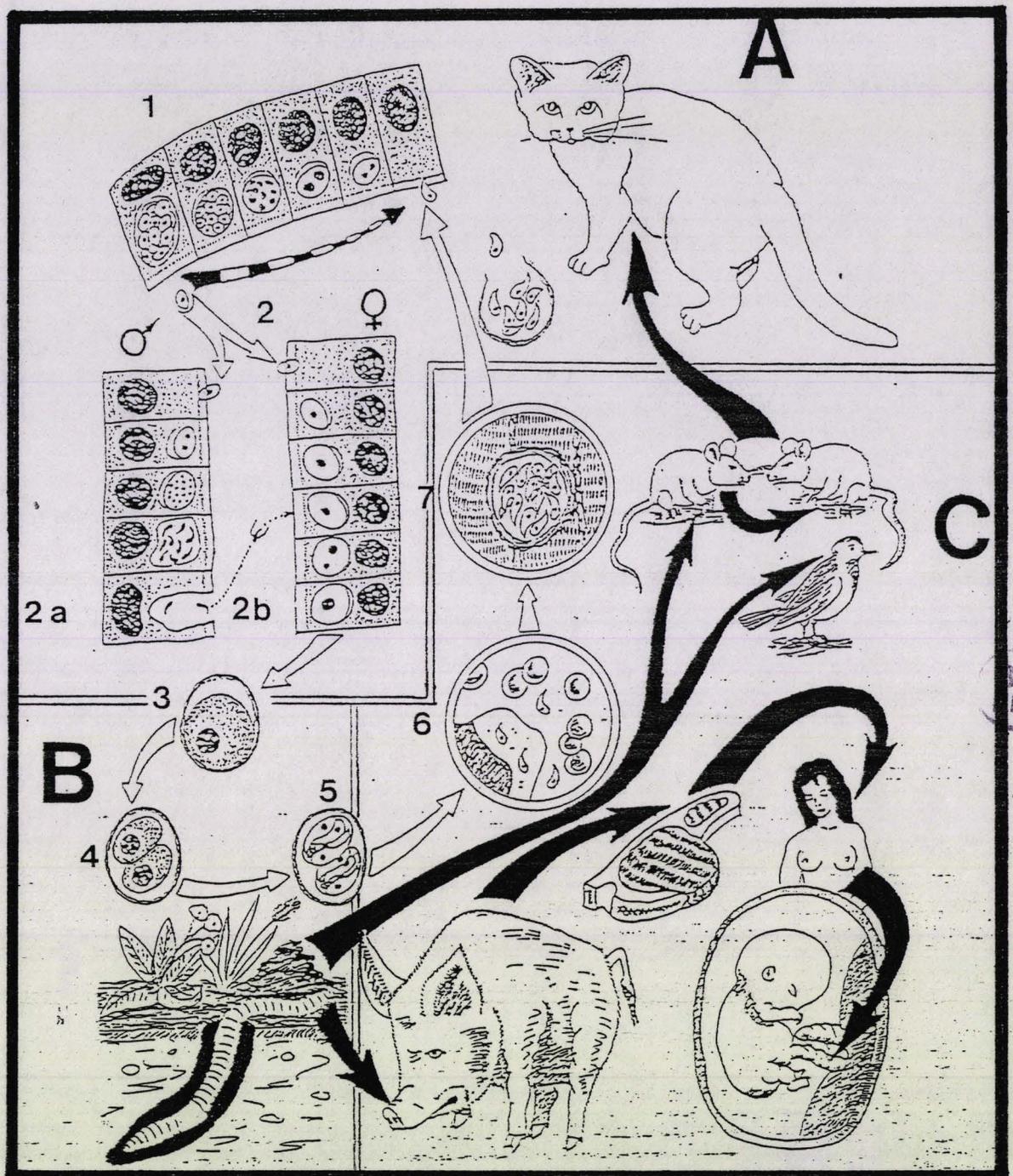


FIGURE 1 : CYCLE DE TOXOPLASMA GONDII (GOLVAN, 1983)

A : Hôte définitif
 B : Milieu extérieur
 C : Hôtes intermédiaires

1 : Schizogonie. 2 : Gamogonie. 2a : Microgamétocytes.
 2b : Macrogamétocytes. 3 : Oocystes. 4 : Sporocystes
 5 : Sporozoïtes. 6 : Tachyzoïtes. 7 : Kyste (bradyzoïtes)

A - Chez l'hôte définitif (GOLVAN, 1983)

Deux types de multiplication parasitaire sont observés : la schizogonie (reproduction asexuée) et la gamogonie (reproduction sexuée).

Une forme infestante (bradyzoïte ou sporozoïte) est introduite par voie orale puis pénètre dans l'épithélium intestinal, au sommet des villosités iléales où il devient un schizonte. Plusieurs multiplications interviennent alors, assurant la dissémination du parasite dans le tube digestif (schizogonie). Puis les mérozoïtes issus des schizontes évoluent en gamétocytes, éléments sexués (gamogonie) : les microgamétocytes, éléments mâles, qui subissent des divisions nucléaires aboutissant à la formation de 12 à 32 microgamètes falciformes et qui sont mobiles grâce à 3 flagelles, dont un rudimentaire.

Les macrogamétocytes, éléments femelles, ne se divisent pas, demeurent sous la couche de microvillosités de la cellule-hôte et deviennent des macrogamètes qui, après fécondation par les microgamètes, donneront chacun naissance à un oocyste.

Les oocystes sont rejetés dans le milieu extérieur où ils se sporulent pour former 2 sporocystes contenant chacun 4 sporozoïtes allongés qui constituent la principale source d'infestation pour les vertébrés supérieurs qui les ingèrent, mais également pour le

chat chez lequel va se reproduire le cycle décrit précédemment (DUBEY et al. 1970 ; FRENKEL, 1970 ; HUTCHINSON and DUNACHIE, 1971).

La maturation de l'oocyste s'effectue à l'air libre et en présence d'un degré d'humidité et d'oxygénation suffisamment important. Le chat enterrant ses excréments, l'achèvement de la sporogonie ne pourra se faire qu'avec la participation d'agents extérieurs tels que les vers de terre. L'oocyste est très résistant dans la terre (où il survit un an) et peut assurer très facilement la contamination tellurique des divers hôtes intermédiaires.

B - Chez les hôtes intermédiaires

La multiplication asexuée se déroule chez l'hôte intermédiaire vertébré supérieur. On assiste à deux phases :

- La PHASE PROLIFERATIVE, avec transformation, surtout dans les cellules du système réticuloendothélial, des sporozoïtes et des bradyzoïtes en tachyzoïtes, également appelés trophozoïtes (FRENKEL, 1971) : ce sont des corps en forme de croissant de 5 à 8 μm de long et 2 à 4 μm de large, avec un noyau dépourvu d'appareil locomoteur mais avec une extrémité plus effilée, mobile, formant un rostre. Le rostre antérieur contient le conoïde auquel est associé un système d'anneaux concentriques et de fibres sous-

pelliculaires. De cette région, naissent également des rhoptries qui se terminent en massue dans le cytoplasme et paraissent jouer un rôle dans la pénétration du parasite dans les cellules-hôtes. Leur reproduction se fait par endodyogénèse (GOLDMAN et al., 1958) et non par scissiparité simple. L'endodyogénèse (DUBBY et al., 1970) constitue un mode de division particulier par lequel deux cellules filles se forment à l'intérieur d'une cellule-mère. Le noyau de la cellule-mère s'étire en fer à cheval et est recouvert, à chacune de ses extrémités en dômes, par la membrane de chaque cellule-fille. Quand les cellules-filles ont atteint le volume de la cellule-mère, la membrane interne de la cellule-mère disparaît et sa membrane externe rejoint la future membrane interne de la cellule-fille. Puis, les tachyzoïtes néoformés se séparent et vont parasiter d'autres cellules.

- La PHASE D'ENKYSTEMENT : Les formes végétatives disparaissent de la circulation et le parasite va s'enkyster dans certains organes sous forme de bradyzoïtes (stade résistant à multiplication ralentie).

Les kystes, de diamètre variant entre 15 et 100 μm , dont les plus gros peuvent contenir plusieurs milliers de bradyzoïtes sont principalement retrouvés

dans le cerveau, le coeur et les muscles squelettiques (JACOBS et al., 1960 ; REMINGTON and CAVANAUGH, 1965). Leur longévité est sans doute égale à celle de l'hôte.

Ainsi, grâce à la connaissance du cycle, les différentes modalités d'infestation ont été élucidées :

- contamination par ingestion de viande mal cuite contenant des kystes de toxoplasmes,

- contamination par l'intermédiaire de mains sales ou par ingestion de salades, légumes ou fruits souillés par les oocystes provenant des excréments de chat,

- contamination par voie transplacentaire (toxoplasmose congénitale) dans le cas de primo-infection en cours de grossesse.

Donc, la prévention de la toxoplasmose reposera entre autres sur des règles hygiéno-diététiques précises.

1.3. LA TOXOPLASMOSE

Le tractus gastro-intestinal semble être la voie principale de l'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 al., 1978). Les tachyzoïtes sont ensuite disséminés dans tout l'organisme par voie lymphatique et sanguine. Progressivement, au fur et à mesure que croîtra le taux

des anticorps actifs contre les formes circulantes, cette parasitémie se réduira.

Le sujet s'immunise et les formes végétatives sont lysées dès qu'elles sont libérées de leur cellule-hôte. Cependant, dans certains organes pauvres en anticorps (cerveau, oeil), le parasite va se réfugier sous forme de bradyzoïtes à multiplication lente, présents dans des kystes.

C'est la toxoplasmose chronique qui dure pendant des années. Il n'y a plus de formes végétatives mais seulement des kystes particulièrement nombreux dans le système nerveux central et ses dépendances (rétine), ainsi que dans les muscles. Ces kystes sont remarquablement bien tolérés par les tissus de l'hôte. Tant qu'ils sont intacts, il ne se produit aucune manifestation pathologique mais dès qu'ils se rompent ou que leur coque devient perméable ceci entraîne des phénomènes inflammatoires locaux. C'est la pathogénie des toxoplasmoses chroniques évolutives.

Il existe trois formes cliniques distinctes :

- la toxoplasmose acquise
- la toxoplasmose congénitale
- la toxoplasmose des sujets immunodéprimés.

A - La Toxoplasmose acquise

Le plus souvent inapparente, la toxoplasmose acquise peut toutefois se traduire par les signes cliniques suivants :

a) Adénopathies superficielles :

Localisées le plus souvent à la région cervicale moyenne ou postérieure (REVOL, 1964), plus petites et de topographie moins généralisée que dans la mononucléose infectieuse, et persistant plus longtemps : 3 à 4 mois.

b) Adénopathies profondes :

Parfois médiastinales et mésentériques.

c) Asthénie très caractéristique et inexplicée

d) Fébricule ou fièvre

e) Exanthème assez protéiforme

f) Hépatomégalie ou splénomégalie assez rares.

S'il est nécessaire de connaître la symptomatologie pour pouvoir suspecter une toxoplasmose débutante, la diagnostiquer et l'enrayer à temps, les signes cliniques étant absents dans la plupart des cas, ce n'est souvent que la sérologie qui renseignera sur une contamination toxoplasmique.

B - La Toxoplasmose congénitale (JOURNES, 1979)

La toxoplasmose congénitale constitue un des aspects les plus préoccupants de la maladie. Le risque d'infection chez la femme enceinte est de 6 à 10 %.

en France (PINON et al., 1986a), de 2 ‰ à Londres et de 1,5 à 6,7 ‰ en Amérique du Nord (JOHNSON, 1985). Cependant, l'équation "toxoplasmose acquise en cours de grossesse = toxoplasmose congénitale" n'est heureusement pas toujours vérifiée. On peut admettre qu'un tiers seulement des nouveau-nés issus de mères infectées pendant leur grossesse seront atteints, ce qui donne une fréquence de toxoplasmose congénitale d'environ 3 ‰ au maximum. On explique ce phénomène par le fait que le toxoplasme ne peut traverser le placenta qu'en cas de lésion de celui-ci.

La date de début du passage du toxoplasme à travers la barrière placentaire reste imprécise. En théorie, le passage est possible à partir de la mise en place de la circulation foetale (21ème jour) mais il semble plus probable que ce phénomène intervienne vers la fin du 2ème mois, quand le placenta est constitué, que sa surface d'échange entre la circulation maternelle et foetale est importante, et surtout au 4ème mois lors du remaniement de la barrière placentaire et de la constitution possible de brèches à son niveau.

Si l'infestation survient dans les 3 premiers mois de la grossesse, elle affecte des étapes primordiales de l'embryogénèse. Il peut y avoir avortement spontané, sinon l'enfant présente des signes cliniques gravissimes touchant le système nerveux et/ou l'oeil.

Au niveau du système nerveux, on peut être en présence d'hydrocéphalie par obstruction de l'aqueduc de Sylvius, calcifications intracrâniennes, retard psychomoteur.

Au niveau de l'oeil, chorioretinite, microphthalmie, iridocyclite, cataracte peuvent être présentes.

Si l'infestation survient durant le second trimestre de la grossesse :

1) le nouveau-né peut être atteint d'encéphalomyélite dont les signes cliniques existent ou non à la naissance :

- l'hydrocéphalie peut ainsi exister dès la naissance ou apparaître dans les mois qui suivent,

- la microcéphalie est plus rare,

- les calcifications intracrâniennes ne sont pas souvent visibles à la période néonatale mais apparaissent à la radiographie quelques mois après la naissance ; elles siègent dans les régions pariéto-occipitale et sous-corticale et sont soit de forme nodulaire, soit souvent en coup d'ongle linéaire ou parfois curviligne,

- les crises convulsives,

- les troubles du tonus : hypotonie généralisée ou, au contraire, hypertonie,

- diverses paralysies peuvent s'observer : hémiplégie, monoplégie ou quadriplégie spastique.

2) L'ophtalmologiste peut mettre en évidence une rétinochoroïdite encore évolutive avec un oedème du fond d'oeil brun-rougeâtre devenant ensuite jaunâtre cicatriciel. Quand les lésions touchent la macula, la cécité est à redouter. Parfois, les atteintes oculaires ne sont découvertes que très tardivement : strabisme, exophtalmie, amblyopie, existence de scotomes.

Si l'infestation a lieu au cours du troisième trimestre de la grossesse, l'enfant naît à la phase parasitémique de la toxoplasmose :

- l'enfant peut naître apparemment indemne, mais il faudra le traiter impérativement pour éviter une évolution ultérieure,

- il peut présenter un ictère néo-natal prolongé qui guérira le plus souvent sans séquelles,

- il pourra être atteint d'une forme grave avec ictère grave, hépatosplénomégalie, syndrome hémorragique avec purpura et hémorragie des muqueuses,

- il pourra également présenter de banales adénopathies ou une anémie avec érythroblastose pouvant évoquer un ictère néonatal par incompatibilité sanguine foeto-maternelle.

C - La toxoplasmose des sujets immunodéprimés

Dans le cas de sujets immunodéprimés comme les receveurs de greffe ou les patients atteints de SIDA, on peut observer des complications très graves causées

par la réactivation de foyers d'infection latente (WEISS et al., 1988). Chez la plupart de ces patients, il n'y a pas d'augmentation de la réponse humorale typique qui serait caractéristique de la réactivation d'une infection aiguë, ce qui rend le diagnostic sérologique difficile ou indéterminé (LUFT et al., 1984).

La toxoplasmose cérébrale est la cause majeure d'encéphalite et d'abcès cérébraux (FRENKEL et al., 1975 ; SNIDER et al., 1983 ; LEVY et al., 1984). L'encéphalite par toxoplasme est une des manifestations les plus fréquentes d'infection opportuniste du système nerveux central chez les immunodéprimés. En ce qui concerne le SIDA, elle est présente chez environ 25 % des patients à Berlin, Bruxelles et Paris, et chez environ 5 à 10 % aux Etats-Unis (MC CABE and REMINGTON, 1988). On estime que, en 1991, 20.000 à 40.000 cas d'encéphalite par toxoplasme seront observés chez les patients atteints de SIDA, en ce qui concerne uniquement les Etats-Unis (LUFT and REMINGTON, 1988). Chez les patients immunodéprimés, on observe également une incidence importante de toxoplasmose pulmonaire (CATTERALL et al., 1986).

1.4. LE TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE

ASSOCIATION SULFAMIDES - PYRIMETHAMINE : les sulfamides paraissent agir sur le toxoplasme en diminuant les possibilités de synthèse de l'acide

folique. Ce sont surtout les sulfapyrimidines et les sulfadiazines qui sont actifs (Sulfamérazine et Sulfadimérazine).

La pyriméthamine (Malocide ^R) est un antagoniste de l'acide folique dans la synthèse des nucléotides parasitaires. Mais le Malocide ^R est un médicament toxique pour l'homme, agissant en particulier sur les lignées hématopoïétiques. Son utilisation expose à l'anémie, l'agranulocytose et la thrombopénie. Les sulfamides ont une action essentiellement "statique" mais la multiplication du parasite reprend dès qu'on arrête leur administration. Le Malocide ^R tue les formes végétatives mais, tout comme les sulfamides, il est pratiquement dénué d'action sur les kystes. Or, il se trouve qu'il existe une synergie entre ces deux groupes de médicaments, si bien que l'on peut réduire leurs doses respectives nettement au-dessous des doses dangereuses tout en obtenant des guérisons confirmées.

L'association Sulfadoxine-Pyriméthamine dans la proportion de 20/1, commercialisée sous le nom de Fansidar ¹, est actuellement employée dans la toxoplasmose congénitale du nourrisson.

On associe à ces deux produits actifs de l'acide folique qui a un effet protecteur contre l'action toxique du Malocide ¹ sans nuire à son efficacité sur le toxoplasme, des Corticoïdes qui permettent de réduire les phénomènes inflammatoires, de limiter les

nécroses, de faciliter le passage des médicaments actifs au niveau des cellules et de réduire leurs effets toxiques.

ANTIBIOTIQUES : la spiramycine (Rovamycine¹) semble aujourd'hui le meilleur antibiotique que nous possédions contre la toxoplasmose. Il est dénué de toxicité et se concentre bien dans les tissus, en particulier dans le placenta.

La déméthylchlortétracycline a une activité inférieure à celle de la spiramycine.

1.5. L'IMMUNITÉ DANS LA TOXOPLASMOSE

Les infections parasitaires induisent une immunité humorale et une réponse à médiation cellulaire. L'importance relative de ces deux composantes dépend du parasite en cause et de l'espèce animale.

L'infection par *Toxoplasma gondii* entraînant une immunité à la réinfection durable et spécifique, les deux versants, humoral et cellulaire, de cette immunité protectrice ont été étudiés dans différents modèles expérimentaux.

A - Le rôle des anticorps (KRAHENBUHL and REMINGTON, 1982 ; HUGHES, 1985)

Des titres élevés d'anticorps anti-toxoplasme sont trouvés chez l'homme ainsi que chez les animaux

infectés. Ces anticorps détruisent les toxoplasmes selon deux mécanismes bien connus :

- les anticorps présents dans les sérums de sujets infectés lysent les toxoplasmes par action directe en présence de complément (SABIN and FELDMAN, 1948), sauf si ces parasites sont intracelulaires ou enkystés ;

- les tachyzoïtes recouverts par des anticorps peuvent encore pénétrer dans les cellules mais il y a dans ce cas une fusion des phagosomes avec les lysosomes, ce qui entraîne la destruction du parasite (ANDERSON et al., 1976 ; HAUSER and REMINGTON, 1981), alors qu'en absence d'anticorps il y a inhibition de cette fusion, d'où survie et multiplication des toxoplasmes.

Le rôle des anticorps seuls comme mécanisme effecteur dans l'immunité contre le toxoplasme a été étudié dans différents modèles expérimentaux.

HULDT (1966) a obtenu, après immunisation de lapins avec des toxoplasmes tués par la chaleur, des titres élevés d'anticorps équivalents à ceux trouvés chez les lapins au cours d'une infection chronique. Après "challenge" avec des organismes virulents, les lapins immunisés ne montrent aucune résistance tandis que ceux présentant une infection chronique sont immuns.

Le modèle expérimental le plus utilisé est le système murin. Chez la souris, les anticorps semblent jouer un rôle non négligeable dans l'immunité. Le transfert passif de sérums anti-toxoplasme ou

d'anticorps monoclonaux confère en effet à ces animaux une protection significative contre les parasites de virulence modérée (KRAHENBUHL *et al.*, 1972 ; MASIH and WERNER, 1978 ; JOHNSON *et al.*, 1983 ; SHARMA *et al.*, 1984). Néanmoins, la résistance aux souches de haute virulence de *T. gondii* est plus faible (NAKAYAMA, 1965 ; FOSTER and McCULLOCH, 1968 ; GILL and PRAKASH, 1970 ; JOHNSON *et al.*, 1983). Il a été montré en particulier que le transfert passif d'anticorps monoclonaux réagissant avec des antigènes de surface de *Toxoplasma gondii*, peut conférer une résistance contre une infection létale de ce parasite chez la souris (JOHNSON *et al.*, 1983).

Alors que le rat euthymique est naturellement résistant à l'infection par la souche virulente RH de *T. gondii* (10^7 tachyzoïtes), le rat athymique ne survit pas à l'infection intrapéritonéale par 10^3 toxoplasmes (SANTORO *et al.*, 1987). Le transfert de sérum de rats Fischer infectés par des tachyzoïtes confère à ces rats athymiques une protection significative contre une infection "challenge" avec 10^5 tachyzoïtes de la souche RH (DARCY *et al.*, 1988). Très récemment, RIDEL *et al.* (1988) ont démontré un rôle protecteur des anticorps IgE dans ce modèle animal.

Les facteurs sériques jouent de ce fait un rôle dans la défense de l'organisme, mais ne suffisent pas à enrayer l'évolution de la maladie. Un délicat équilibre

entre la réponse humorale et l'immunité à médiation cellulaire est nécessaire pour le contrôle efficace de l'infection par toxoplasme.

B - Immunité à médiation cellulaire

Les réponses immunes à médiation cellulaire au cours de la toxoplasmose ont été démontrées par la mise en évidence d'un état d'hypersensibilité retardée (KRAHENBUHL *et al.*, 1971) et par des tests de transformation lymphoblastique antigène-spécifique (KRAHENBUHL *et al.*, 1972).

Le rôle des macrophages dans la destruction du parasite a été prouvé : les anticorps sont capables de rendre ces macrophages actifs dans leur fonction de cytolyse (ANDERSON *et al.*, 1976) alors qu'en absence d'anticorps, les parasites se multiplient dans la vacuole parasitophore. D'autre part, les macrophages peuvent être recrutés et sensibilisés par des lymphokines (SIBLEY *et al.*, 1985 ; REYES and FRENKEL, 1987), et tout particulièrement de l'interféron gamma (SUZUKI *et al.*, 1988).

Le rôle des lymphocytes a été mis en évidence par FRENKEL (1967) en réalisant des transferts adoptifs de cellules spléniques ou ganglionnaires chez les hamsters.

PAVIA (1986) démontre qu'une protection partielle contre la toxoplasmose est obtenue en transférant des cellules immunes chez le cobaye. Plus précisément, lorsqu'une suspension enrichie en lymphocytes T est traitée par un anticorps anti-lymphocytes T en présence de complément, on note la suppression de la capacité à transférer la résistance.

Le rôle des lymphocytes T dans la toxoplasmose a également été décrit lors de l'utilisation de souris athymiques (Nu/Nu) comme modèles expérimentaux (HINDBERG and FRENKEL, 1977). En effet, chez ces souris, la toxoplasmose a une issue fatale. Le transfert d'anticorps ou de cellules de moëlle osseuse à ces souris athymiques n'augmente pas leur durée de survie à l'infection. Par contre, une reconstitution avec des cellules thymiques permet la survie de 6 souris sur 8. Ces expériences montrent clairement l'implication des cellules T dans le développement de l'immunité.

D'autre part, une protection totale des rats (Nu/Nu) contre la toxoplasmose est obtenue par transfert passif, soit de 5×10^6 lymphocytes T non spécifiques (SANTORO et al., 1987), soit de seulement 10^4 lymphocytes T spécifiques (DUQUESNE, communication personnelle).

Le rôle des cellules NK ("Natural Killer") dans le contrôle du parasitisme a également été démontré. En effet, on a constaté une augmentation de l'activité de

ces cellules au cours d'une toxoplasmose aiguë ou chronique chez la souris (HAUSER *et al.*, 1982). Ceci a été confirmé *in vitro* dans le même modèle : les cellules NK, provenant de souris infectées par *Toxoplasma gondii* depuis 3 jours, sont plus cytotoxiques vis-à-vis des tachyzoïtes que les cellules témoins provenant de souris non infectées (HAUSER and VAN TSAI, 1986).

D'autres cellules immunocompétentes interviennent vraisemblablement dans l'immunité protectrice contre la toxoplasmose : par exemple, il a été récemment démontré qu'un transfert passif de plaquettes immunes protège le rat Nu/Nu de façon significative (RIDZL *et al.*, 1988). Ceci souligne l'importance que ces cellules effectrices pourraient avoir pour limiter rapidement la charge parasitaire.

2. METHODES DE DIAGNOSTIC

Le diagnostic biologique de certitude de la toxoplasmose ne peut être établi que grâce à des preuves parasitologiques. Cependant, ce diagnostic direct, souvent difficile et aléatoire, est toujours contraignant. Le diagnostic parasitologique n'est possible que dans les formes évolutives (ponction ganglionnaire) ou dans les formes congénitales (autopsie cérébrale, examen du placenta). L'autopsie

cérébrale est effectuée également chez les patients atteints de SIDA.

En général, le diagnostic de la toxoplasmose est réalisé par les techniques sérologiques. La toxoplasmose constitue d'ailleurs, de très loin, la principale application actuelle de la sérologie parasitaire puisqu'elle fait l'objet de plus de 5 millions de tests annuels, en France (GOLVAN and AMBROISE-THOMAS, 1984). C'est surtout pour le contrôle de l'immunité toxoplasmique acquise que l'on effectue la sérologie, le but étant de vérifier si des femmes ont, ou non, du fait d'une primo-infestation antérieure, acquis une immunité qui, dans la toxoplasmose, est définitivement protectrice. Dans ce cas, le risque d'une nouvelle contamination survenant en cours de grossesse, et pouvant provoquer une toxoplasmose congénitale, est absolument exclu. Au contraire, si la sérologie est négative, l'absence d'immunité acquise traduit une réceptivité complète et justifie différents conseils prophylactiques ainsi qu'une surveillance régulière.

Lors de l'infestation par les tachyzoïtes, l'immunité humorale s'installe par l'élaboration d'anticorps spécifiques de *T. gondii*, dirigés contre la membrane du parasite, puis contre ses constituants cytoplasmiques. Les premières immunoglobulines

sécrétées sont de type IgM, suivies de celles de type IgG, qui persistent durant toute la vie chez le sujet.

Les tests sérologiques permettent la détection d'anticorps anti-toxoplasmes des isotypes IgM (témoignant généralement d'une toxoplasmose aiguë récente, ou de maladie congénitale), ou IgG sans réponse IgM (témoignant d'une immunité à la réinfection). Actuellement, la recherche des anticorps IgA spécifiques semble pouvoir apporter des éléments diagnostiques supplémentaires (TURUNEN *et al.*, 1983 ; PARTANEN *et al.*, 1984 ; PINON *et al.*, 1986b ; LE FICHEUX *et al.*, 1987 ; DECOSTER *et al.*, 1988b) mais elle n'est pas encore de pratique courante.

Les tests les plus utilisés pour la détection d'anticorps spécifiques sont les suivants :

2.1. Test de lyse de SABIN et FELDMAN (ou "Dye-test"):

Décrit par SABIN et FELDMAN (1948), ce test a pour principe d'exposer des toxoplasmes vivants, en présence de facteur accessoire (complément), à du sérum décomplémenté. La présence d'anticorps spécifiques entraîne la lyse des parasites par un mécanisme de cytotoxicité complément-dépendant (CAPRON *et al.*, 1974 ; COHEN and WARREN, 1976). Ces anticorps apparaissent

entre le 4ème et le 20ème jour après l'infection et persistent très longtemps.

2.2. Immunofluorescence Indirecte (IFI) :

C'est la méthode qui est actuellement la plus utilisée en France.

La réaction antigène-anticorps s'effectue sur des lames siliconées où ont été fixés des toxoplasmes. Chaque série d'examen doit comporter plusieurs témoins réalisés avec des sérums négatifs et des sérums positifs. Il est aussi indispensable de réaliser des tests quantitatifs à l'aide d'un ou plusieurs sérums contenant un nombre connu d'unités internationales, selon un sérum-étalon.

Après addition d'un conjugué fluorescent, la visualisation de la réaction s'effectue au microscope par observation des parasites fluorescents en contact avec les différentes dilutions des sérums.

2.3. Test de Remington :

Décrit par REMINGTON *et al.* (1968), ce test consiste en une immunofluorescence indirecte où le révélateur de l'anticorps fixé sur le parasite est un conjugué fluorescent anti-IgM. La présence d'IgM est le témoin d'une affection acquise récente et évolutive ou d'une maladie congénitale.

2.4. Réaction de fixation du complément :

Effectué avec des antigènes parasitaires sur des microplaques (BENEX, 1974 ; COHEN and WARREN, 1976), ce test révèle l'existence des anticorps spécifiques plus tardivement que le test de lyse et devient négatif plus rapidement.

2.5. Réaction d'hémagglutination indirecte :

Dans cette méthode, développée par JACOBS et LUNDE (1957), des globules rouges recouverts d'antigènes de toxoplasme sont incubés avec différentes dilutions de sérum avant et après traitement au β -mercaptoéthanol. Les sérums positifs conduisent à une hémagglutination.

2.6. Agglutination directe :

Des toxoplasmes formolés, mis en présence des sérums avant et après traitement au β -mercaptoéthanol, sont agglutinés uniquement en présence d'anticorps spécifiques. C'est une méthode sensible qui permet de détecter les anticorps IgM, mais dont l'inconvénient majeur est l'interférence avec des IgM dites naturelles qui ont une spécificité croisée avec des antigènes toxoplasmiques.

2.7. Test immunoenzymatique ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") :

L'application de ces méthodes au sérodiagnostic de la toxoplasmose date de 1976 (SEGUELA *et al.*, 1976; VOLLER *et al.*, 1976). En fonction des conjugués enzymatiques utilisés, il est possible de différencier les IgG et les IgM.

En ce qui concerne les IgG leur détection et leur titrage par cette méthode sont basés sur le même principe que l'immunofluorescence, la différence entre les deux méthodes portant sur l'origine de l'antigène toxoplasmique utilisé.

Un lysat de tachyzoïtes est absorbé sur un support solide (plaque de titration), ensuite on ajoute le sérum à tester, puis l'anti IgG couplé à une enzyme, à laquelle on ajoute un substrat chromogène, ce qui permet la lecture au spectrophotomètre.

En ce qui concerne les IgM, cette technique n'apporte rien de plus que l'immunofluorescence, c'est-à-dire qu'elle n'exclut pas la possibilité de faux positifs dus aux auto-anticorps et de faux négatifs par suite d'IgG en excès.

2.8 Immunocapture :

Cette méthode permet, dans des conditions très simples, une séparation préalable des IgM puis la

révélation ultérieure des seules IgM spécifiquement anti-toxoplasmes. Ce test comprend les étapes suivantes

:

1) sensibilisation de plaques de microtitration à l'aide de sérum anti-IgM ;

2) capture dans les puits des plaques ainsi sensibilisées des IgM du sérum à tester ;

3) addition d'antigène de *Toxoplasma gondii* avec fixation uniquement sur les IgM anti-toxoplasmes ;

4) fixation sur l'antigène d'un conjugué anti-toxoplasmes marqué par une enzyme ;

5) addition d'un substrat chromogène et lecture au spectrophotomètre.

2.9. ISAGA (Immunosorbent Agglutination Assay) :

Décrite par DESMONTS (1972), cette réaction consiste en une agglutination réverse où on absorbe le sérum anti-IgM sur une plaque : ensuite le sérum à tester est ajouté puis une suspension de tachyzoïtes. On observe une agglutination des parasites si la réaction est positive.

C'est une technique très spécifique et très sensible, qui présente cependant des difficultés de lecture et d'interprétation.

2.10. Autres tests :

Parallèlement à la recherche des anticorps spécifiques, la détection d'antigènes circulants pourrait revêtir un intérêt diagnostique considérable, étant donné qu'ils sont détectables dès la phase d'invasion, bien avant l'apparition des anticorps spécifiques, et que leur présence est indépendante des capacités immunitaires du sujet. Un test ELISA a été utilisé pour montrer la présence d'antigène circulant chez l'homme, en phase aiguë de l'infection (VAN KNAPEN and PANGGABEAN, 1977 ; ARAUJO and REMINGTON, 1980). Les antigènes circulants ont été également trouvés dans le liquide amniotique et dans le liquide céphalorachidien des nouveau-nés atteints de toxoplasmose congénitale (BAKAL, 1979).

3. LES ANTIGENES DES TACHYZOITES IMPLIQUES DANS L'IMMUNITE

L'identification des antigènes qui entraînent une réponse immunitaire est importante à la fois pour le diagnostic et pour la réalisation d'un vaccin. Différents types d'antigènes des tachyzoïtes de *T. gondii* ont été caractérisés : antigènes totaux, antigènes de surface et antigènes d'excrétion-sécrétion.

3.1. Antigènes totaux :

Le travail de JOHNSON *et al.* (1981a), par 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 et 133 kDa par rapport à la fraction insoluble qui présente 8 fractions antigéniques de poids moléculaire 28, 41, 43, 49, 53, 61, 70 et 80 kDa. Ils ont aussi démontré que la fraction soluble ne contient pas de glycopeptides majeurs ; par contre, la fraction insoluble présente 3 glycopeptides dont les bandes sont détectées à 29, 53 et 123 kDa.

3.2. Antigènes de surface :

La pellicule des tachyzoïtes présente un intérêt multiple comme interface entre le parasite et son hôte étant à la fois cible des défenses de l'hôte et responsable de la motilité de l'organisme et de l'invasion (par jonction mobile entre les plasmalemmes du zoïte et de la cellule hôte). Cette pellicule est constituée d'un plasmalemme recouvert sur la face interne par un complexe membranaire comportant 2 membranes accolées dont VIVIER et PETITPREZ (1969) ont montré qu'il s'agissait de saccules aplatis. Les travaux de cryofracture de PORCHET et TORPIER (1977), et de

DUBREMETZ et TORPIER (1978) ont montré que le complexe membranaire interne était composé d'une cape apicale prolongée par des rangées de plaques alignées selon l'axe antéro-postérieur du zoïte.

Sur le plan biochimique, les résultats les plus importants concernant la pellicule de *T. gondii* ont été obtenus sur les protéines accessibles à l'iodation enzymatique, c'est-à-dire de localisation superficielle. Ces résultats ont été rendus possibles par la production d'anticorps monoclonaux anti-*T. gondii*. Le premier travail de référence dans ce domaine est celui de HANDMAN et al. (1980a) qui ont caractérisé les antigènes majeurs de la surface de toxoplasme par immunoprécipitation des antigènes radioiodés à l'aide d'anticorps monoclonaux et de sérums immuns. Ils ont ainsi identifié 4 antigènes majeurs auxquels ils ont attribué des masses moléculaires apparentes de 43, 35, 27 et 14 kDa.

Puis PFEFFERKORN et al. (1983) ont abordé l'analyse de la surface des tachyzoïtes et étudié deux des antigènes majeurs auxquels ont été attribués des poids moléculaires apparents de 30 et 22 kDa. La molécule de 30 kDa (P30) a été purifiée (KASPER et al., 1983), puis a servi à des essais de protection (KASPER et al., 1985) ; la protéine de 22 kDa (P22) s'est avérée manipulable génétiquement et des mutants viables dépourvus de cet antigène ont été produits (KASPER et al., 1982).

A l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface des tachyzoïtes, COUVREUR *et al.* (1988) ont confirmé récemment la présence d'antigènes majeurs de 43, 35, 30 et 22 kDa et ont démontré de plus l'existence d'un antigène mineur de 23 kDa.

JOHNSON *et al.* (1983), reprenant partiellement les travaux de HANDMAN et REMINGTON (1980b), ont fait état de la protection passive de souris infestées par *T. gondii* au moyen d'un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine de surface de 35 kDa.

Des travaux complémentaires ont permis de suggérer l'existence d'épitopes répétés dans la molécule P30 (RODRIGUEZ *et al.*, 1985), d'autre part l'interaction d'anticorps monoclonaux anti-P30 avec la surface des tachyzoïtes lors de l'invasion a été étudiée (DUBREMETZ *et al.*, 1985). Un anticorps monoclonal anti-P30 est utilisé actuellement à des fins diagnostiques (CESBRON *et al.*, 1985 ; SANTORO *et al.*, 1985 ; Cesbron *et al.*, 1986).

3.3. Antigènes d'excrétion-sécrétion :

Les molécules sécrétées-excrétées par les parasites (et qui possèdent des activités enzymatiques variées), ont été démontrées comme très immunogènes dans certaines infections naturelles et expérimentales et peuvent donc constituer de bons candidats à l'immunoprophylaxie (CAPRON and DESSAINT, 1988). Dans la

toxoplasmose, deux observations supportent cette hypothèse : la première montre que les antigènes de sécrétion représentent la majorité des antigènes circulants détectables tout au début de l'infection, suggérant une reconnaissance précoce par le système immunitaire (HUGHES and VAN KNAPEN, 1982). La deuxième montre que les antigènes de sécrétion induisent une stimulation lymphocytaire supérieure à celle provoquée par les antigènes somatiques (HUGHES, 1985).

Deux types d'antigènes d'excrétion-sécrétion ont été décrits : les exo-antigènes présents dans les surnageants de culture de cellules infectées (DESSEGEORGES *et al.*, 1980 ; HUGHES and VAN KNAPEN, 1982 ; CHUMPITAZI *et al.*, 1983 ; ROQUES *et al.*, 1986 ; CHUMPITAZI *et al.*, 1987) et des antigènes excrétés-sécrétés obtenus par l'incubation des tachyzoïtes en milieu acellulaire (DARCY *et al.*, 1988).

Les exo-antigènes produits en culture cellulaire, de masse moléculaire de 6000 à 800.000 (ROQUES *et al.*, 1986) sont utilisables dans des tests cutanés de détection de l'immunité anti-toxoplasmique (AMBROISE-THOMAS *et al.*, 1982).

DARCY *et al.* (1988) ont développé un nouveau procédé pour l'obtention d'antigènes sécrétés-excrétés (ESA) par les tachyzoïtes dans un milieu d'incubation sans cellules. Les ESA composés d'une vingtaine d'antigènes de masse moléculaire comprise entre 21 et

185 kDa se sont révélés très immunogènes dans les infections humaines et expérimentales. En ce qui concerne la toxoplasmose humaine, certains ESA sont reconnus par des sérums de phase aiguë (antigène de 97 kDa, marqueur de séroconversion) ou de phase chronique (antigènes de 108 kDa et 28,5 kDa, marqueurs d'immunité) (DECOSTER *et al.*, 1988a). L'un de ces ESA, de 23 kDa, a été cloné par CESBRON-DELAUW *et al.* (1988). Cet antigène est présenté comme un marqueur de phase chronique.

4. LA PROTEINE MAJEURE DE SURFACE DE T. GONDII, P30

Il a été montré que la plupart des anticorps monoclonaux dirigés contre la surface des tachyzoïtes (HANDMAN *et al.*, 1980a ; SETHI *et al.*, 1980 ; JOHNSON *et al.*, 1981b ; KASPER *et al.*, 1983 ; RODRIGUEZ *et al.*, 1985) reconnaissent une molécule de 27 à 35 kDa, définie par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE) et qu'on a nommée P30 (KASPER *et al.*, 1983 ; RODRIGUEZ *et al.*, 1985).

SIBLEY *et al.* (1986) décrivent la présence de P30 dans un réseau constitué de vésicules sécrétées par le toxoplasme dans la cellule parasitée, entre la surface du parasite et la membrane de la vacuole parasitophore. Des expériences de transfert passif d'anticorps monoclonal dirigé contre P30 (SANTORO *et al.*, 1987) ou d'immunisation active avec la molécule P30

partiellement purifiée (ARAUJO and REMINGTON, 1984) indiquent un rôle potentiel de cet antigène dans l'immunoprophylaxie de la toxoplasmose. Ce rôle dans l'immunité a été récemment conforté par les travaux de KHAN *et al.* (1988) qui démontrent que P30 induit la prolifération de cellules sanguines mononucléées de sujets séropositifs pour la toxoplasmose, mais non de sujets séronégatifs. Ils décrivent aussi la production d'interféron-gamma par les lymphocytes humains en culture, stimulés avec l'antigène P30 purifiée.

La présence d'anticorps spécifiques de P30 dans le sérum de patients présentant une toxoplasmose récente ou lointaine a été démontrée (HANDMAN and REMINGTON, 1980b ; KASPER *et al.*, 1983 ; SHARMA *et al.*, 1983). Suivant la technique de purification de P30 par immunoadsorption sur un anticorps monoclonal, KASPER *et al.* (1983), SANTORO *et al.* (1985) ont démontré que la molécule pure pourrait servir d'outil diagnostique. En effet, tous les patients en phase aiguë ou en phase chronique de la maladie possèdent des anticorps anti-P30.

Un anticorps monoclonal anti-P30 a servi de base à un test diagnostique de la toxoplasmose aiguë par une méthode d'immunocapture (CESBRON *et al.*, 1985 ; 1986). Le principe du test est basé sur la capture des IgM sériques que l'on révèle indirectement, en deux temps, par un couple antigène/anticorps monoclonal dirigé contre P30 et marqué à la peroxydase. Ce test allie à

la grande sensibilité des dosages enzymatiques la spécificité que confère un réactif monoclonal.

KASPER (1987) et WARE et KASPER (1987) ont observé l'existence de plusieurs antigènes d'un poids moléculaire de 30 kDa, qui varient selon les souches de *T. gondii*.

Malgré le nombre de publications concernant l'antigène P30, nous ne possédons que très peu d'informations concernant sa nature moléculaire et ses caractères biochimiques.

5. PROPRIETES DE L'ARN ET DE L'ADN DE *T. GONDII*

Il n'existe dans la littérature que très peu de données sur les propriétés de l'ARN et de l'ADN de *T. gondii* (NEIMARK and BLAKER, 1967 ; BORST et al., 1984).

Le fait que la synthèse de protéines et d'acides nucléiques par la cellule hôte n'est pas nécessaire à la multiplication de *T. gondii* démontre que ce parasite contient les étapes métaboliques nécessaires pour sa propre synthèse d'ADN, d'ARN et de protéines (PFEFFERKORN and PFEFFERKORN, 1976a,b ; 1981).

RENINGTON et al. (1970) ont démontré que les tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii* contiennent trois différents types d'ARN, déterminés par leur coefficient de sédimentation qui, en raison de leur abondance et de leur taille, constituent les ARN ribosomiaux et de transfert.

PRINCE et al. (1985) ont démontré que l'ARN messenger, isolé à partir de tachyzoïtes de la souche RH, pouvait être traduit dans un système de traduction *in vitro* et que les protéines synthétisées étaient reconnues par des anticorps spécifiques anti-*T. gondii*.

JOHNSON et al. (1986b) ont développé une méthode d'extraction d'ARN messenger qui code pour des antigènes de *T. gondii*.

JOHNSON et al. (1986a) ont purifié et caractérisé l'ADN de tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii*, démontrant qu'il contient un taux de G+C de 50 % et qu'il n'est pas très méthylé.

JOHNSON et al. (1987a) ont comparé l'ADN de *Toxoplasma gondii* et de *Hammondia hammondi* en utilisant comme sondes des gènes clonés d'ARN ribosomal.

JOHNSON et al. (1987b) ont analysé la séquence d'une sous-unité de l'ARN ribosomal de *T. gondii* et son implication dans l'évolution des *Apicomplexa*.

BOOTHCROYD et al. (1987) et NAGEL et BOOTHCROYD (1988) ont cloné et séquencé les gènes de l'alpha et bêta tubulines de *T. gondii*, et discutent leurs résultats en fonction de l'évolution de ce parasite et de l'implication de ces gènes dans le contrôle de la toxoplasmose.

BUT DU TRAVAIL

Des progrès récents en biologie moléculaire ont abouti au développement et futur emploi de vaccins recombinants contre des maladies parasitaires. Cependant, la recherche chez *T. gondii* a beaucoup moins avancé que chez d'autres parasites en raison de sa nature intracellulaire et de la constante contamination du matériel parasitaire par les cellules-hôtes.

Différentes études ont montré l'existence d'une molécule de masse moléculaire située entre 27 et 30 kDa, appelée P30 et représentant l'antigène majeur de surface de *Toxoplasma gondii*.

L'antigène P30 est déjà utilisé comme outil diagnostique dans le dépistage d'une toxoplasmose aiguë. Néanmoins, l'obtention d'un gramme d'antigène total de *T. gondii*, contenant entre 3 et 5 % de P30 et utilisé dans les tests immunologiques, implique le sacrifice de 2000 souris infectées.

La purification de P30 est difficilement envisageable en raison de la quantité de matériel parasitaire demandé et des problèmes liés à la structure-même de la molécule.

Le but de ce travail était le clonage et le séquençage du gène codant pour la molécule P30 afin de

rendre possible, dans un futur proche, l'utilisation de la protéine recombinante et/ou des peptides dérivés de sa séquence, dans les tests de diagnostic de la Toxoplasmose.

RESULTATS

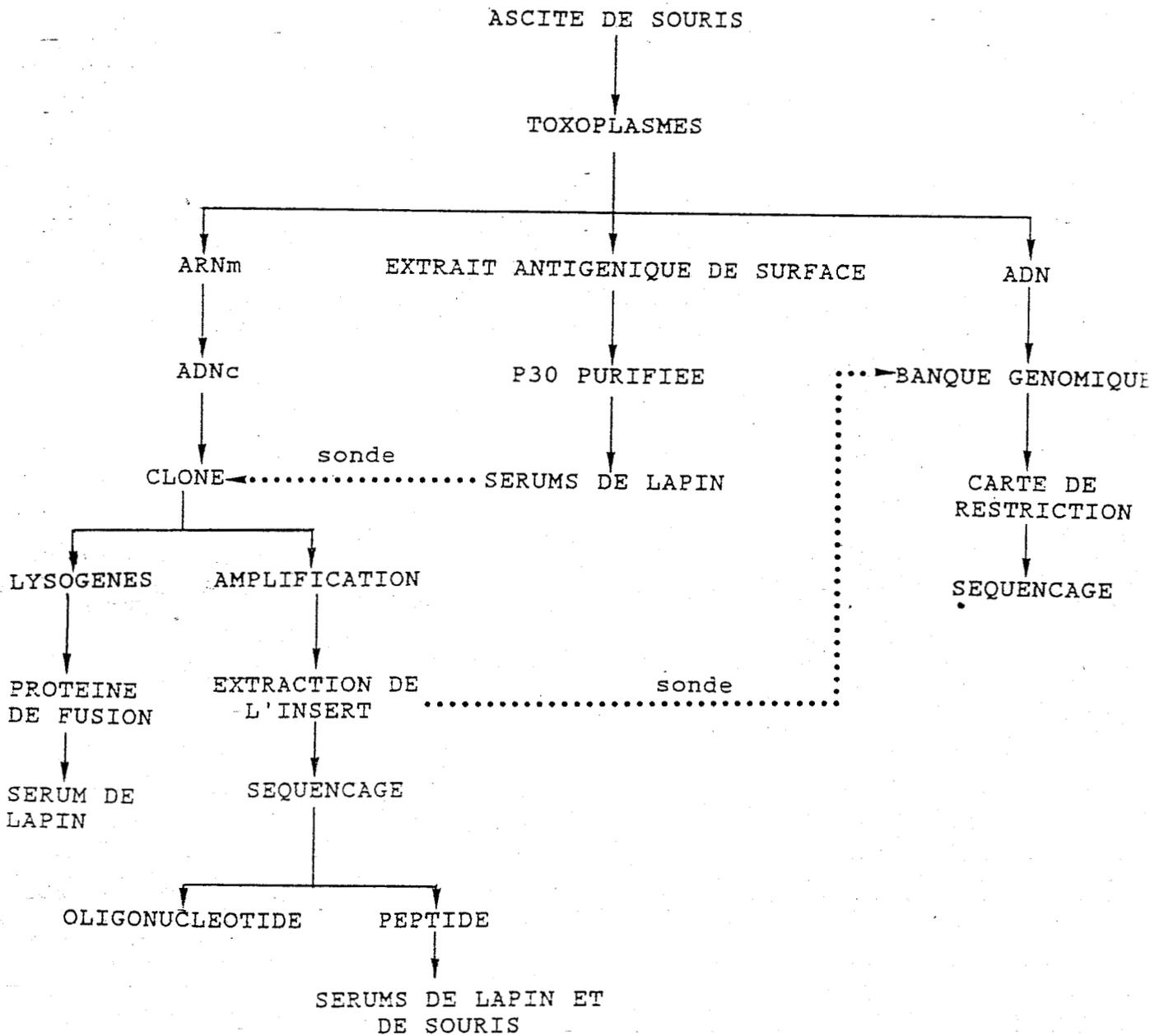


FIGURE 2 : RESUME DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. PREPARATION DES SONDÉS

Le but de notre travail était d'obtenir le(s) épitope(s) de l'antigène P30 par génie génétique.

Ainsi, l'étape initiale de ce travail expérimental a consisté à purifier l'antigène natif P30 afin d'élaborer des sondes monospécifiques d'anticorps polyclonaux pour le criblage d'une banque d'ADNc construite dans le vecteur d'expression λ gt11.

La spécificité de ces sérums a été vérifiée sur un extrait antigénique total de *T. gondii*. Ces mêmes sondes nous ont par ailleurs permis de progresser dans la caractérisation de cette molécule.

1.1. Purification de la molécule P30

L'analyse densitométrique de l'extrait membranaire de *T. gondii* (Fig. 3) révèle que l'antigène P30 constitue 14 % de la totalité de cet extrait.

L'antigène P30 a été purifié par deux méthodes :

- par passage de l'extrait membranaire de tachyzoïtes sur une colonne d'immunoaffinité contenant l'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54 produit dans notre laboratoire ;

- par filtration sur gel du même extrait antigénique sur une colonne contenant un gradient d'acétonitrile dans un appareil de Chromatographie Liquide de Haute Résolution (HPLC).

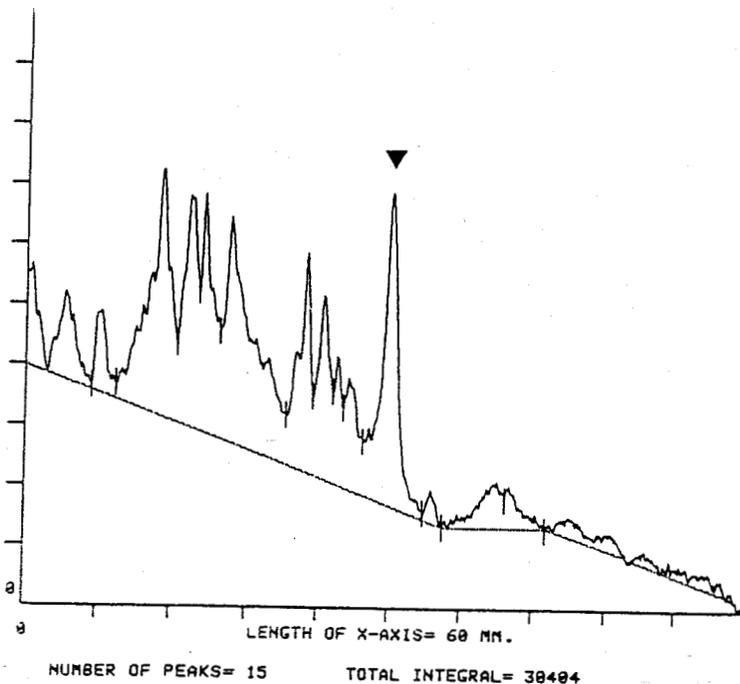


FIGURE 3 : DENSITOMETRIE REALISEE A L'AIDE D'UN CHROMOSCAN (JOYCE-LOEBL, GATESHEAD, GRANDE-BRETAGNE) D'UN GEL DE POLYACRYLAMIDE COLORE AU NITRATE D'ARGENT CONTENANT UN EXTRAIT MEMBRANAIRE DE T.GONDII.

▼: Molécule P30 (14%)

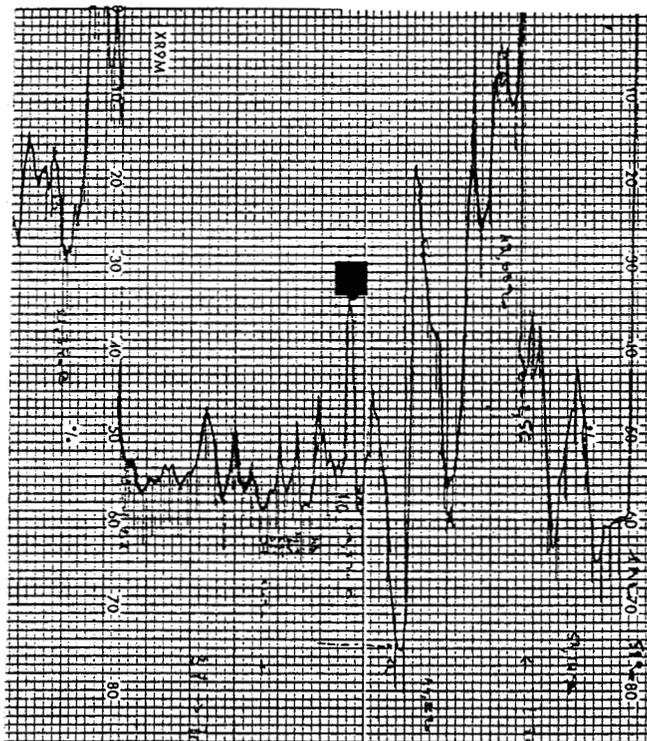


FIGURE 4 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA PURIFICATION DE LA MOLECULE P30 PAR HPLC SUR GRADIENT D'ACETONITRIL

■: Pic contenant l'antigène P30 et correspondant à 34,4%

Après cette filtration, on a retenu la fraction reconnue par l'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54 (Fig. 4).

L'antigène purifié par HPLC a été ensuite analysé par électrophorèse mono et bidimensionnelle en gel de polyacrylamide-SDS après coloration au nitrate d'argent. Après l'électrophorèse monodimensionnelle, une seule molécule de 30 kDa a été observée (Fig. 5A). Par contre, après l'analyse électrophorétique bidimensionnelle, deux molécules de même poids moléculaire (30 kDa) mais de pI voisins (7,84 et 8,07) sont observées (Fig. 5B).

1.2. Production d'anticorps monospécifiques

L'obtention des anticorps monospécifiques a été réalisée par immunisation de deux lapins : l'un avec l'antigène P30 obtenu par immunoabsorption, l'autre avec l'antigène P30 obtenu par HPLC.

La spécificité anti-P30 des sérums obtenus a été vérifiée par Immunofluorescence Indirecte (Fig. 6) par Microscopie Electronique (Fig. 7) et par Immunoprécipitation d'un extrait membranaire de tachyzoïtes marqués à l'iode.

Le profil autoradiographique des antigènes membranaires de tachyzoïtes iodés montre après analyse en gel de polyacrylamide-SDS, 3 molécules majeures avec un poids moléculaire apparent de 43 kDa, 30 kDa et 22 kDa (Fig. 8A). Après immunoprécipitation de cet extrait

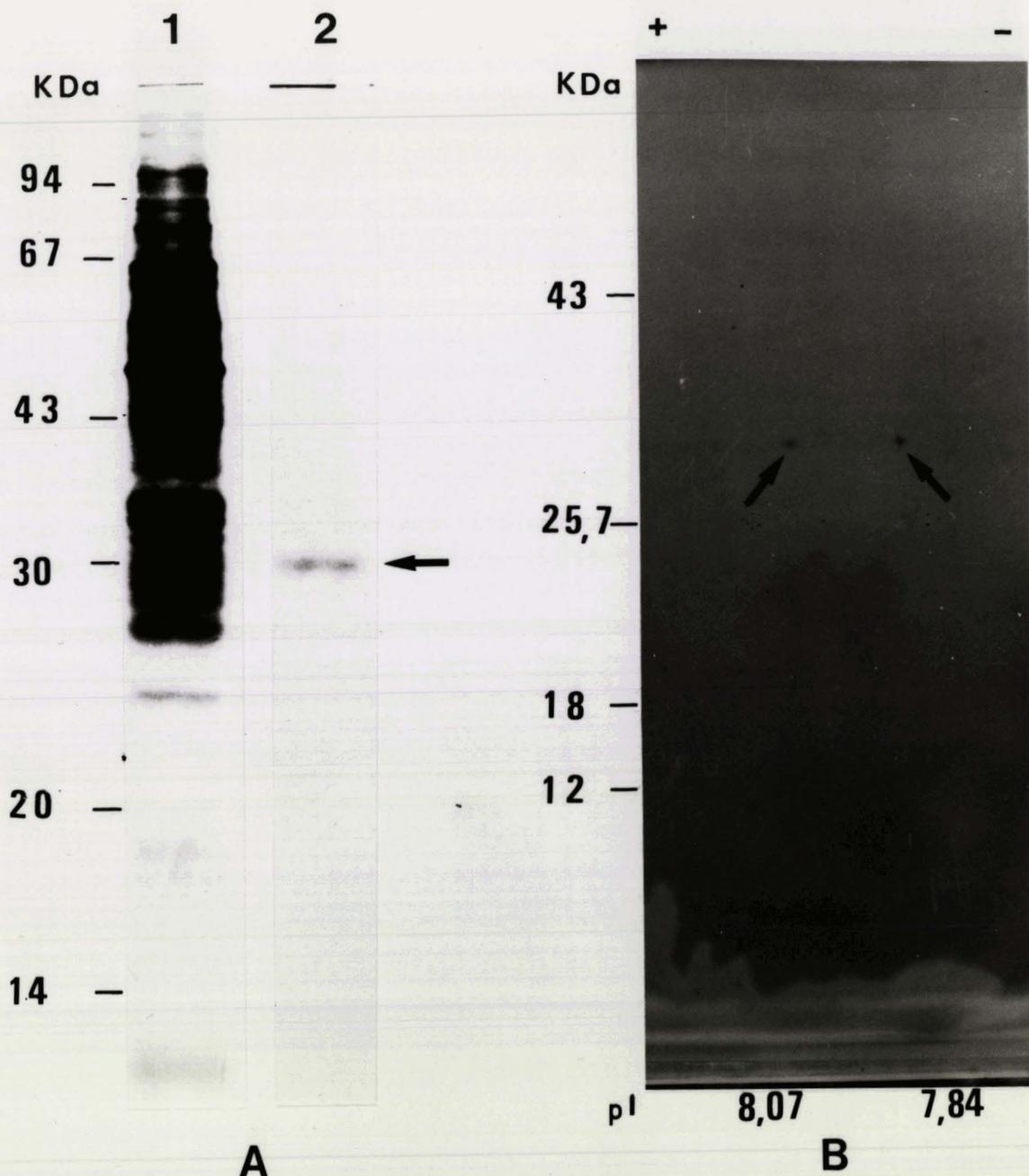


FIGURE 5 : CARACTERISATION DE LA MOLECULE P30 PURIFIEE PAR HPLC PAR ELECTROPHORESE MONODIMENSIONELLE ET BIDIMENSIONELLE APRES COLORATION AU NITRATE D'ARGENT

A : Analyse monodimensionnelle :

1 : Extrait total de T.gondii

2 : P30 purifiée

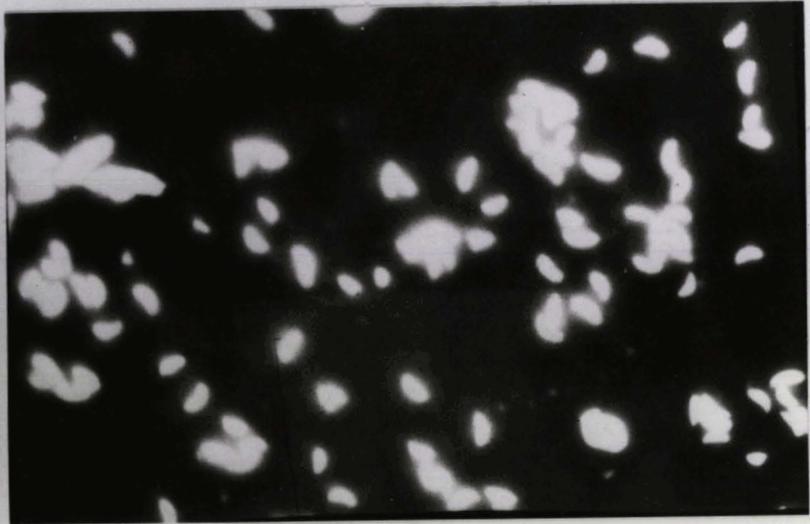
B : Analyse bidimensionnelle :

Les deux molécules qui composent l'antigène P30 sont indiquées par les flèches.

L'analyse monodimensionnelle de la molécule P30 purifiée par immunoadsorption conduit au même résultat : une seule bande de migration identique.



1



2



FIGURE 6 : RECONNAISSANCE DE LA SURFACE DES TACHYZOITES PAR LE SERUM DE LAPIN ANTI-P30 PURIFIEE PAR HPLC EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.

1 : sérum de lapin sain.

2 : sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC.

Handwritten notes:
S.V.P. ↓
C. 2007-2010

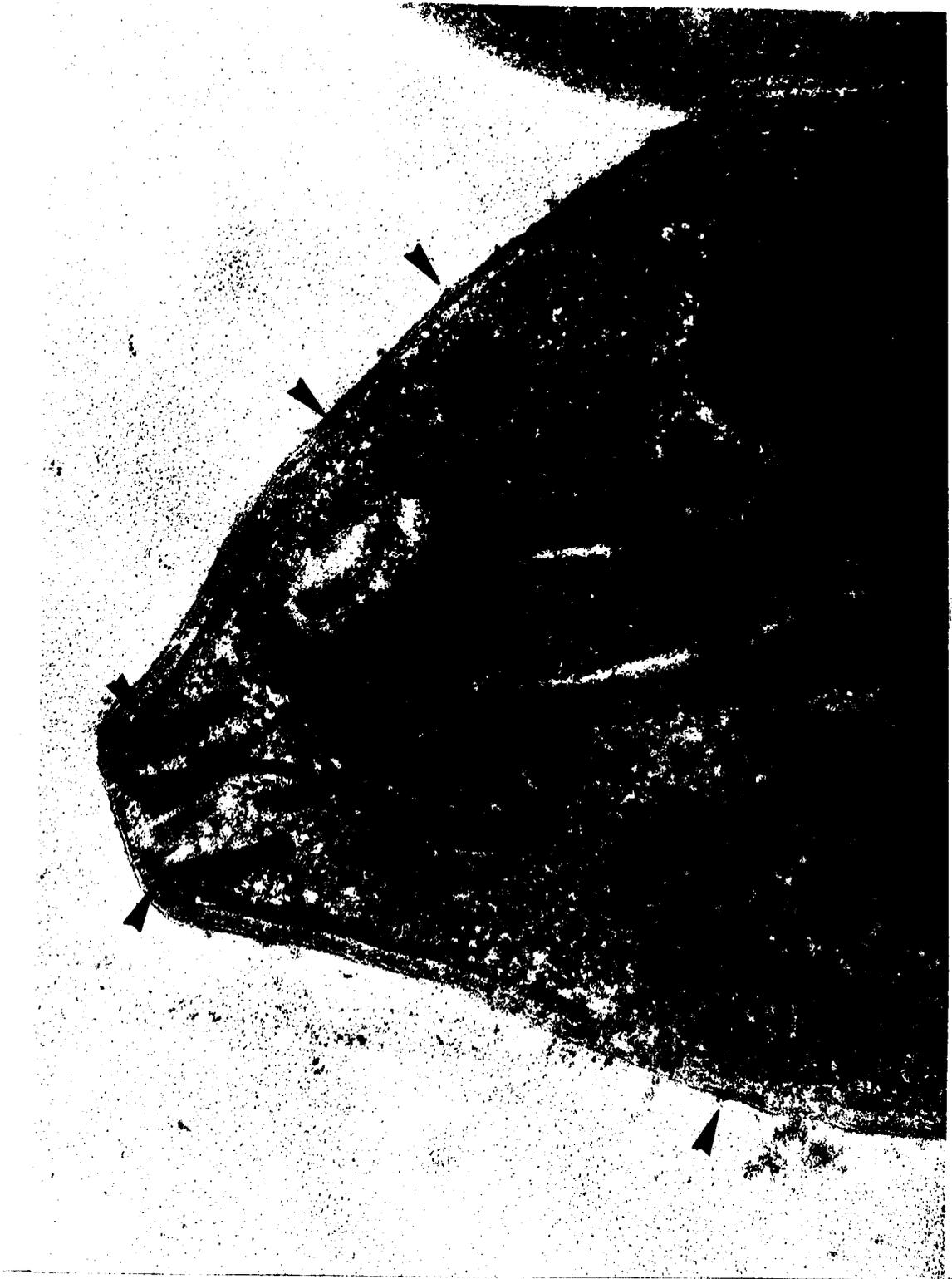


FIGURE 7 : LOCALISATION DE L'ANTIGENE P30 DANS LES TACHYZOITES DE T.GONDII PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET COLORATION A L'OR COLLOÏDAL.

Après fixation des tachyzoïtes par 1% de glutaraldéhyde et inclusion dans la résine Lowicryl K4M, les sections ultrafines sont incubées avec du sérum de lapin anti-P30 (purifiée par HPLC). La révélation est réalisée par des immunoglobulines anti-lapin couplées à l'or colloïdal (5nm).

Sur ce cliché montrant une section longitudinale de la partie antérieure d'un tachyzoïte, l'antigène P30 (flèches) est détecté au niveau de la membrane externe et du conoïde (C).

membranaire marqué à l'iode avec les sérums de lapin anti-P30 (purifié par immunoadsorption ou par HPLC) d'une part, et avec l'anticorps monoclonal G5-54 comme contrôle, le profil autoradiographique ne révèle plus qu'une seule bande de poids moléculaire apparent de 30 kDa (Fig. 8A).

Ceci démontre que nous avons obtenu des sérums polyclonaux monospécifiques dirigés contre l'antigène majeur de surface des tachyzoïtes, P30.

1.3. Biosynthèse de l'antigène P30

La spécificité anti-P30 des anticorps obtenus étant ainsi démontrée, il convenait de vérifier avant le clonage, l'activité de synthèse de la molécule P30 des tachyzoïtes isolés. Ce point a été vérifié par immunoprécipitation des produits de marquage métabolique des tachyzoïtes.

La structure antigénique de *T. gondii*, après marquage métabolique à la ^{35}S -Méthionine est complexe. Par rapport au marquage de surface, de très nombreuses bandes sont révélées dans les poids moléculaires de 67 à 200 kDa (Fig. 8B).

Les analyses autoradiographiques après immunoprécipitation ont montré que les anticorps polyclonaux monospécifiques anti-P30 présents dans les sérums de lapin anti-P30 (purifié par immunoadsorption ou par HPLC) ainsi que l'anticorps monoclonal GS-54 identifient une bande intense à 30 kDa (Fig. 8B). Ceci a montré que la molécule était bien biosynthétisée par les

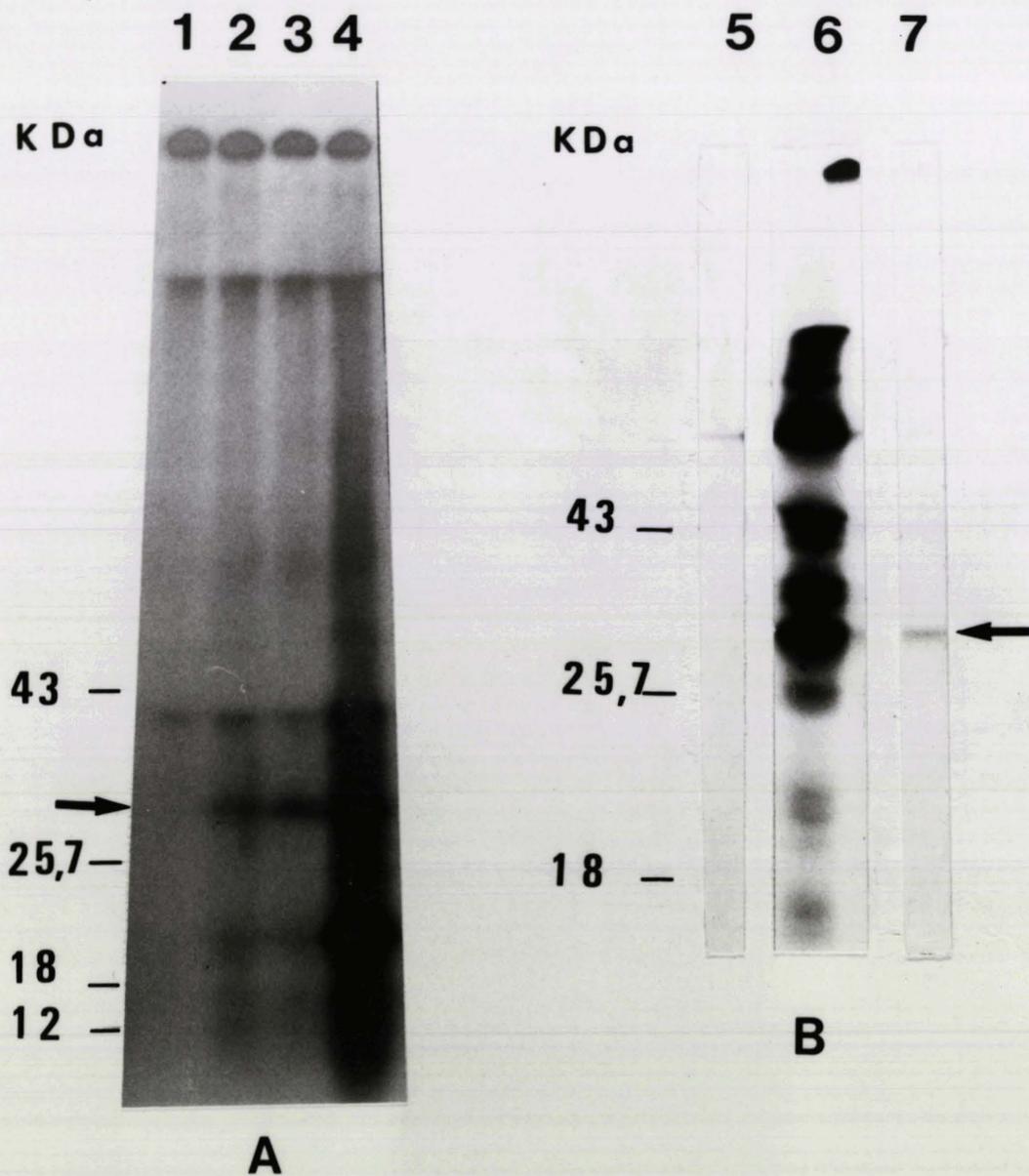


FIGURE 8 : IMMUNOPRECIPITATION DES TACHYZOITES MARQUES A L'¹²⁵IODE (A) OU MARQUES PAR LA ³⁵S METHIONINE (B) AVEC LE SERUM DE LAPIN ANTI-P30

- 1 : Sérum de lapin sain.
- 2 : Sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC.
- 3 : Anticorps monoclonal G5-54.
- 4 : Extrait total de T. gondii
- 5 : Sérum de lapin sain.
- 6 : Sérum de lapin hyperimmun.
- 7 : Sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC.

tachyzoïtes dans nos conditions de marquage. Cette observation est de grande importance puisque l'obtention des tachyzoïtes pour l'extraction des ARNm serait effectuée dans les mêmes conditions d'incubation que celles du marquage métabolique.

Le fait que la molécule biosynthétisée par le tachyzoïte d'une part et que la molécule de surface isolée d'autre part migrent de façon identique et sont toutes deux reconnues par les mêmes anticorps monospécifiques, laissent supposer qu'ils correspondaient à deux molécules identiques.

Néanmoins, une analyse plus approfondie des produits du marquage métabolique après électrophorèse bidimensionnelle en gel de polyacrylamide-SDS a montré la présence de plusieurs molécules de poids moléculaire apparent de 30 kDa, dont deux d'entre elles sont majeures (Fig. 9). Après immunoprécipitation avec différents sérums : sérum humain prélevé en phase chronique de la toxoplasmose, sérum de lapin hyperimmun, sérums de lapin anti-P30 (purifié par immunoabsorption ou par HPLC) et l'anticorps monoclonal G5-54 on observe la reconnaissance des deux molécules majeures citées précédemment, coïncidant avec les deux mêmes molécules trouvées après purification de l'extrait total de tachyzoïtes par HPLC (Fig. 10).

Ces résultats obtenus avec les antigènes marqués des tachyzoïtes confortent l'emploi des sérums de lapin

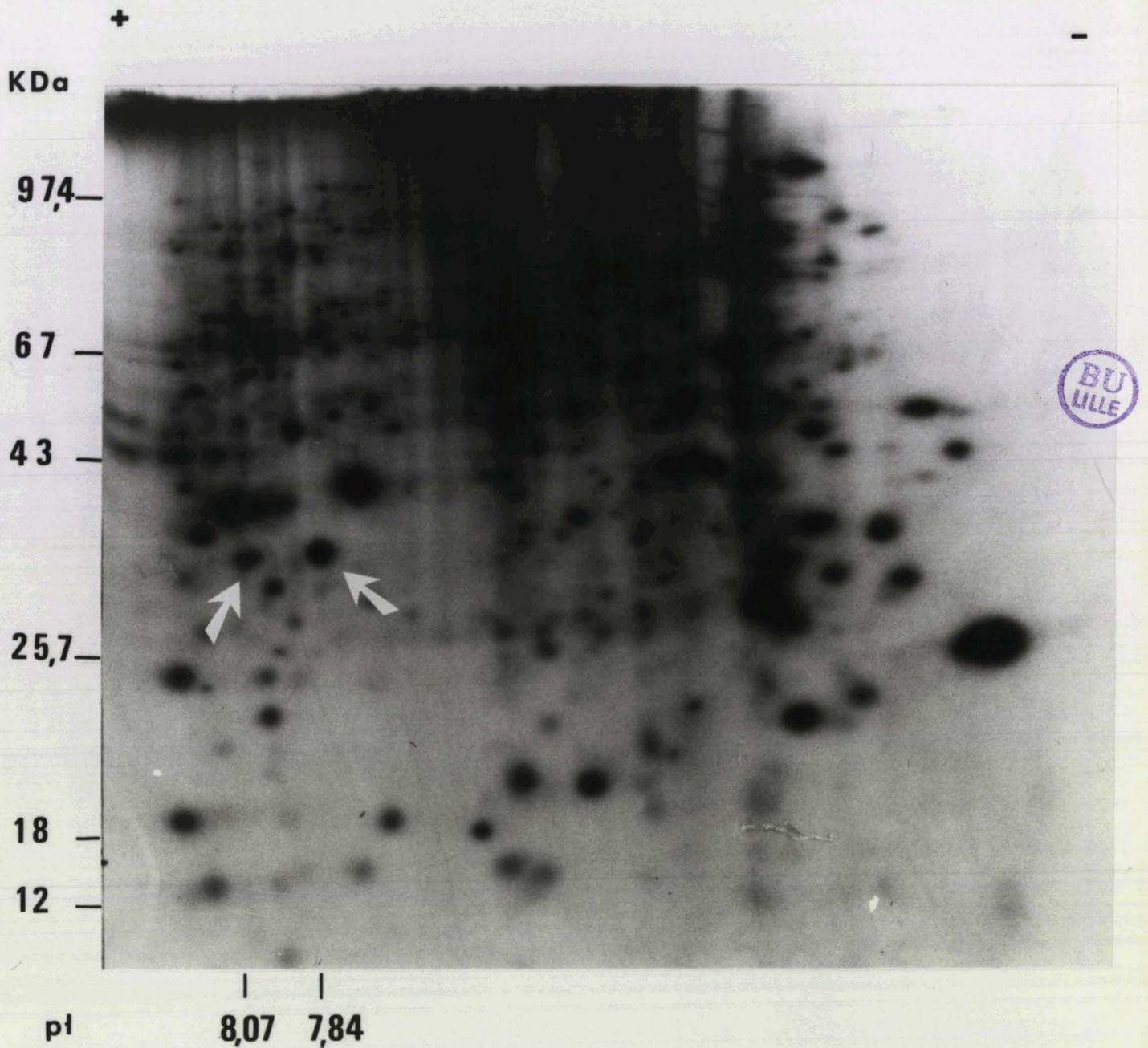


FIGURE 9 : ELECTROPHORESE BIDIMENSIONELLE DE L'EXTRAIT TOTAL DE TACHYZOITES MARQUES PAR LA ^{35}S METHIONINE

Les deux molécules qui composent l'antigène P30 sont indiquées par les flèches.

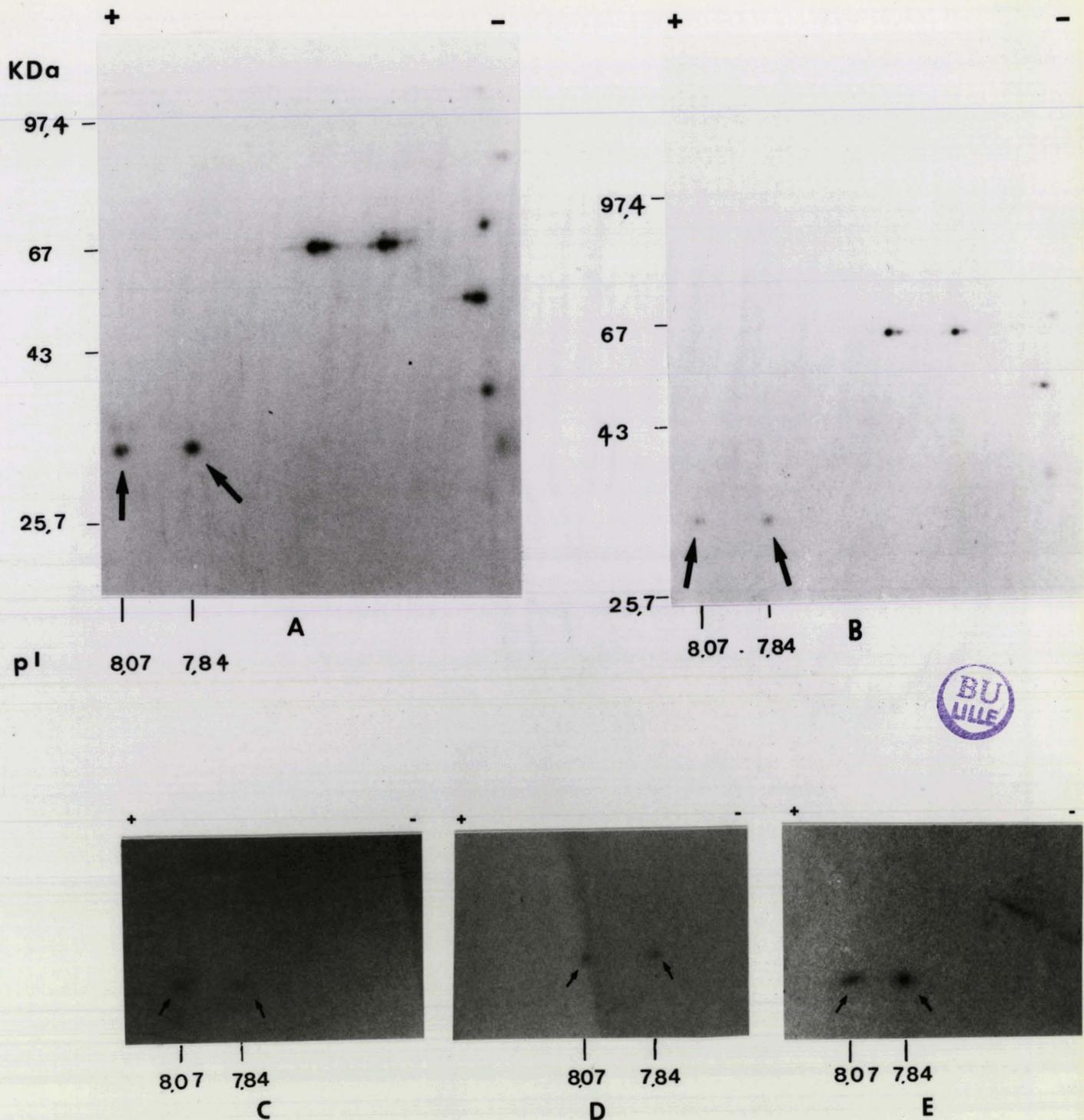


FIGURE 10 : ANALYSE BIDIMENSIONNELLE DES IMMUNOPRECIPITES DES TACHYZOITES MARQUES PAR LA ^{35}S METHIONINE

Immunoprécipitation avec :

- A : Sérum de lapin hyperimmun.
- B : Sérum humain de phase chronique de toxoplasmose.
- C : Sérum de lapin anti-P30 purifiée par immunoadsorption.
- D : Sérum de lapin anti-P30 par HPLC.
- E : Anticorps monoclonal G5-54.

* les molécules qui composent l'antigène P30 sont indiquées par les flèches.

Remarque : Dans le cas d'immunoprécipitation par des sérums monospécifiques (C,D,E), aucun autre spot n'est observé.

polyclonaux monospécifiques comme sondes pour le criblage de banques d'expression.

2. CLONAGE D'UNE PORTION DE LA SEQUENCE CODANTE POUR L'ANTIGÈNE P30

Dans cette étape du travail expérimental, nous avons extrait les ARN messagers de *T. gondii* et construit une banque d'ADNc pour essayer d'obtenir des clones exprimant le(s) épitope(s) de l'antigène P30.

Des tests immunologiques se sont avérés nécessaires pour caractériser cet (ces) épitope(s) et pour confirmer la séquence de l'ADN cloné.

2.1. Obtention de l'ARNm de tachyzoïtes et de ses produits de traduction

Après extraction, environ 2 mg d'ARN total sont obtenus à partir de 10^{10} tachyzoïtes. Environ 3 % d'ARNm polyA⁺ sont isolés.

La traduction de 30 µg d'ARN total ou de 3 µg d'ARNm poly-A⁺ de tachyzoïtes dans le lysat de réticulocytes de lapin conduit à de nombreux produits.

L'immunoprécipitation de ces produits de traduction avec des sérums humains de phase chronique et le sérum de lapin hyperimmun démontre la synthèse *in vitro* de plusieurs antigènes protéiques de *T. gondii*. Par contre, l'immunoprécipitation de ces mêmes produits avec les sérums de lapin monospécifiques anti-P30 (purifiée par

immunoabsorption ou par HPLC) ne révèle aucun de ces produits de traduction (Fig. 11).

Nous avons effectué un marquage métabolique des tachyzoïtes à la ^{35}S Méthionine en présence de 0,375 mM d'Actinomycine D (inhibiteur de la transcription) et 1 mM de cyclohexymide (inhibiteur de la synthèse protéique). L'effet de ces produits sur la synthèse protéique est vérifié après précipitation des protéines marquées à l'acide trichloroacétique (TCA) (Fig. 12). Après immunoprécipitation des extraits antigéniques marqués avec le sérum monospécifique de lapin anti-P30 purifié par HPLC, nous avons observé l'inhibition de la synthèse protéique en présence de cyclohexymide. Par contre, en présence d'Actinomycine D, l'antigène P30 continue à être produit, ce qui démontre qu'il n'y a pas eu de transcription de cet antigène à ce stade du métabolisme du parasite (Fig. 12).

Ce résultat démontre par ailleurs que l'ARN messager de l'antigène P30 est minoritaire et très stable, expliquant l'absence d'un produit de traduction dans nos conditions d'obtention des ARNs.

2.2. Obtention d'un clone exprimant un (des) épitope(s) de l'antigène P30

Le dérivé du phage λ gt11 a permis l'expression de gènes de tachyzoïtes sous le contrôle du promoteur Lac,

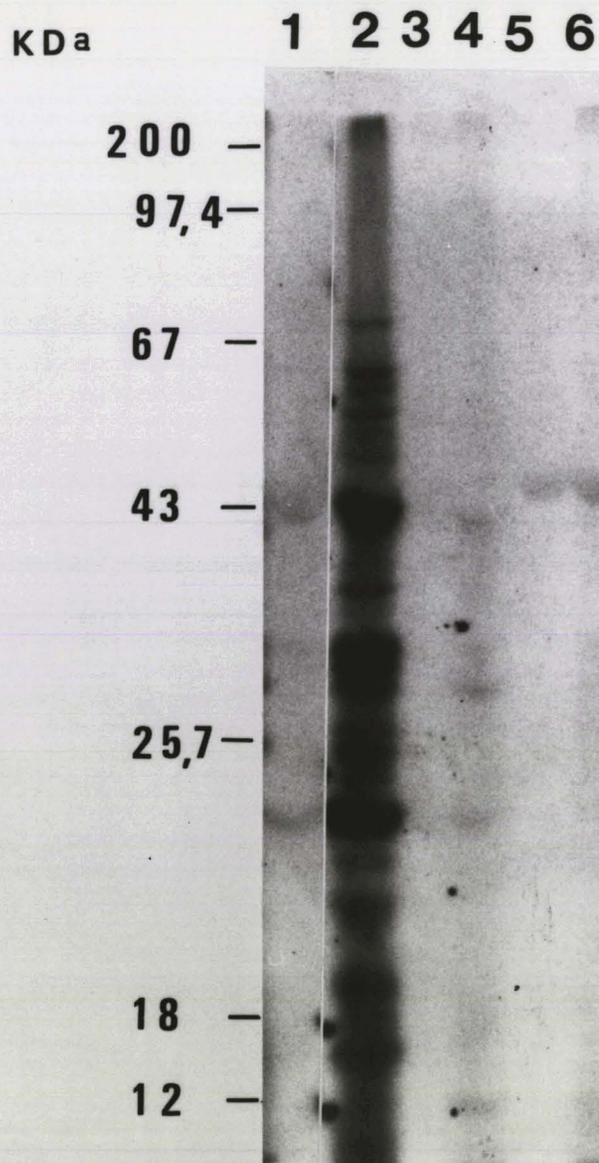


FIGURE 11 : IMMUNOPRECIPITATION DES PRODUITS DE TRADUCTION DE L'ARN DE T.GONDII.

1,3 et 5 : Produits de traduction endogènes au système de traduction (contrôle).

2,4 et 6 : Produits de traduction de l'ARN de T.gondii.

Immunoprécipitation avec :

1 et 2 : sérum de lapin hyperimmun.

3 et 4 : sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC.

5 et 6 : anticorps monoclonal G5-54.

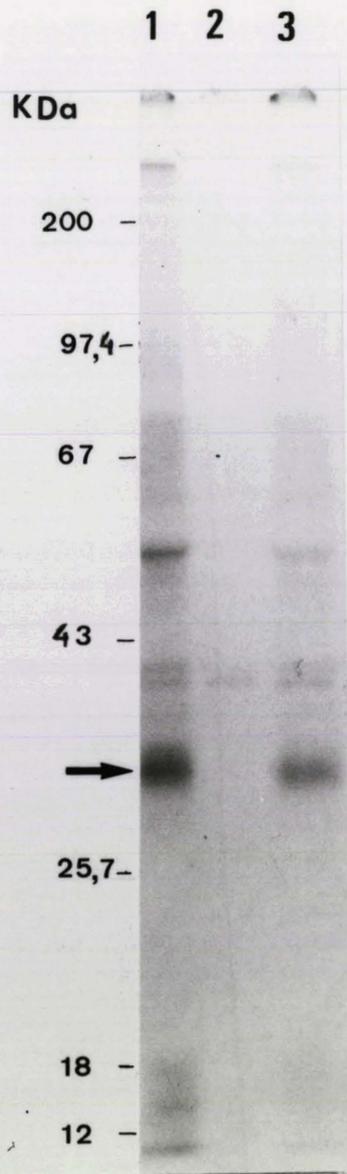


FIGURE 12 : MARQUAGE METABOLIQUE A LA ^{35}S METHIONINE DES TACHYZOITES EN PRESENCE DE CYCLOHEXIMIDE ET ACTINOMYCINE D.

Radioactivité incorporée (après précipitation au TCA):

En absence d'inhibiteur : 97079,00 cpm

En présence de cycloheximide : 15113,26 cpm

En présence d'actinomycine D : 72874,83 cpm

Immunoprécipitation des protéines marquées avec le sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC :

1 : en absence d'inhibiteur

2 : en présence de cycloheximide

3 : en présence d'actinomycine D

après fusion des ADNsc avec le gène de la β -galactosidase de *E. coli* (YOUNG and DAVIS, 1983).

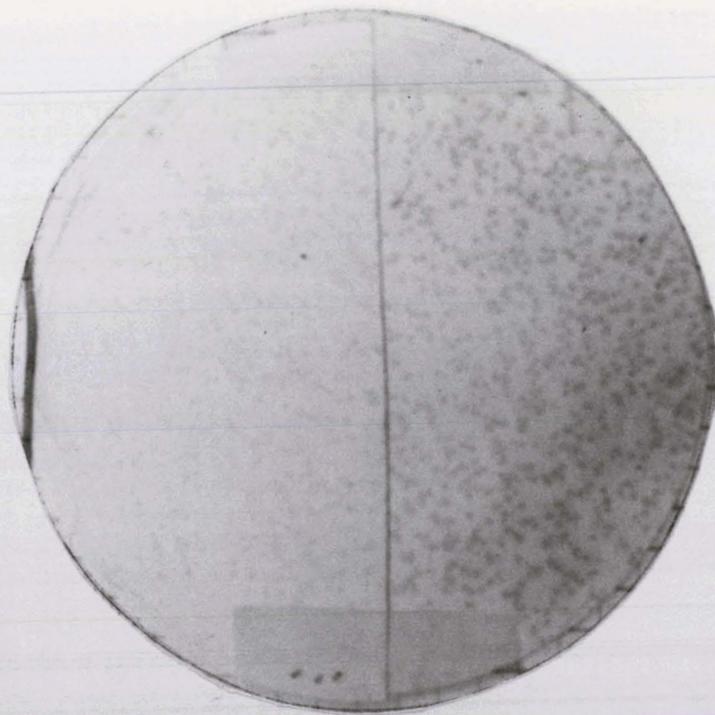
Un échantillon de la banque en λ gt11 a été inoculé sur la souche de *E. coli* Y1090 à une dilution représentant 10^4 phages/boîte de 90 mm de diamètre. L'induction de l'expression de la protéine sous le contrôle du promoteur Lac a été déclenchée à 42°C en présence d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Les protéines synthétisées ont été adsorbées sur membrane de nitrocellulose. Ces membranes ont été ensuite incubées en présence d'un sérum de lapin polyclonal monospécifique anti-P30 (purifié par immunoadsorption) et les anticorps ont été détectés par un second anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase.

Cette détection a permis d'identifier les phages recombinants dont l'insertion d'ADNc a dirigé la synthèse d'une protéine ou fraction de protéine portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-P30.

Le criblage de 5×10^5 clones recombinants a révélé 11 clones potentiels. Après purification et un nouveau criblage, un seul clone a été retenu (P30.8) (Fig. 13).

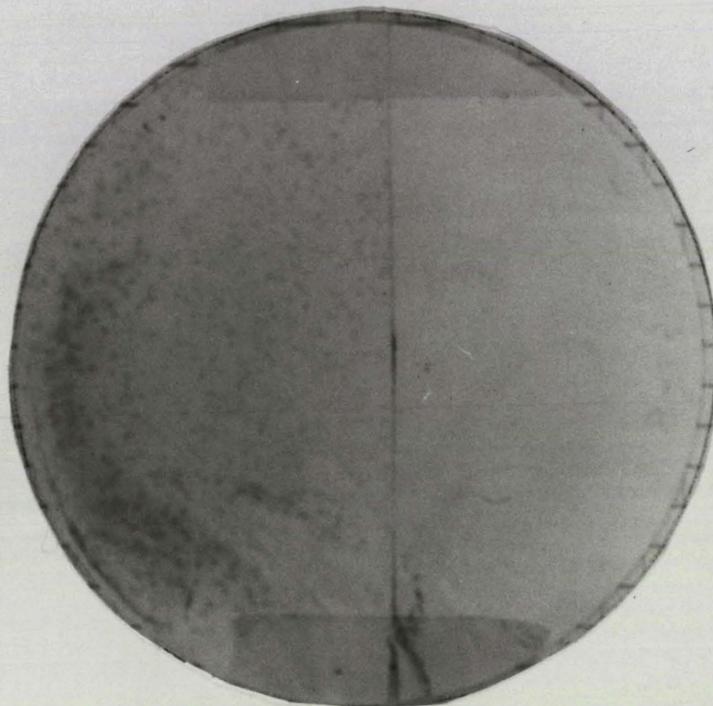
2.3. Expression de la protéine recombinante

Pour l'obtention de la protéine clonée, les bactériophages du clone P30.8 purifié ont été utilisés pour transformer la souche *E. coli* Y1089 r^{-m+} lysogène pour le phage λ . L'induction des bactéries lysogènes en



1

2



3

4



FIGURE 13 : PURIFICATION DU CLONE P30.8

Révélation par :

- 1 : sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC (1/100)
- 2 : sérum de lapin anti-P30 purifiée par immunoabsorption (1/100)
- 3 : sérum de lapin hyperimmun (1/100)
- 4 : sérum de lapin sain (1/100)

milieu liquide a permis l'expression de la protéine de fusion et sa purification après lyse bactérienne. Le lysat a été analysé sur gel de polyacrylamide 8 % coloré au bleu de Coomassie. La protéine recombinante obtenue est d'un poids moléculaire de 120 kDa, indiquant la synthèse d'environ 6 kDa de la protéine de *T. gondii* (le reste étant constitué par la β -D-galactosidase d'*E. coli* codée par le vecteur) (Fig. 14).

Ayant comme finalité vérifier la présence de la protéine clonée chez *T. gondii*, la protéine de fusion est d'abord séparée des autres constituants du lysat bactérien, induit par le lysogène P30.8, sur gel de polyacrylamide 8 %. Plusieurs extraits de lysats sont déposés selon le nombre de sérums à tester. Les protéines séparées sont ensuite transférées sur nitrocellulose. Des bandes de membranes sont découpées et mises en contact avec différents sérums.

La protéine recombinante exprimée est reconnue par des anticorps présents dans des sérums provenant d'infections expérimentales et humaines. Un sérum de lapin hyperimmun, un sérum de lapin infesté et des sérums humains de phase chronique de la toxoplasmose reconnaissent cette protéine, ainsi que deux sérums polyclonaux monospécifiques anti-P30, l'un dirigé contre l'antigène P30 purifié par HPLC, l'autre dirigé contre l'antigène P30 purifié par chromatographie d'immunoaffinité. Ces sérums ont été épuisés contre un

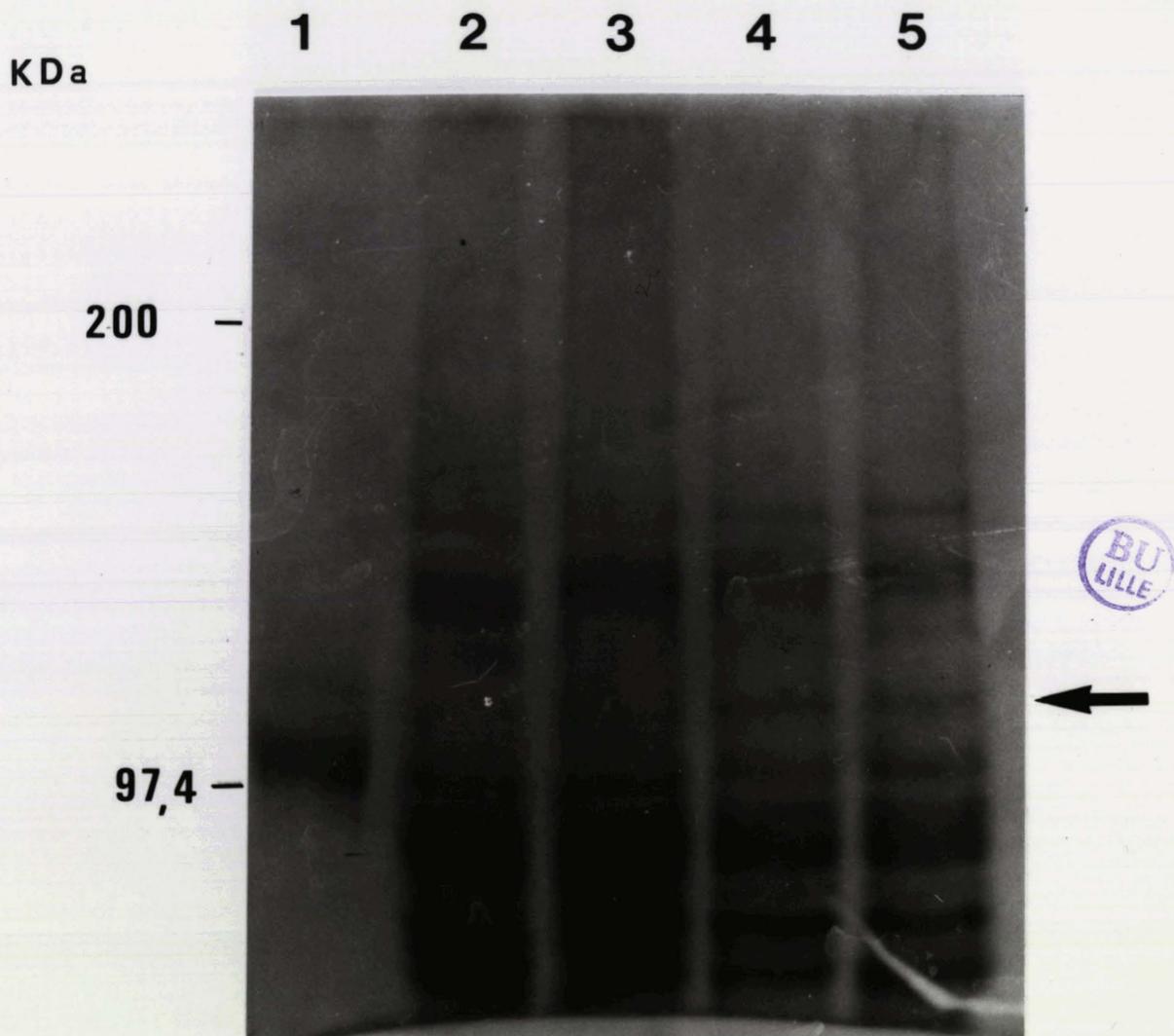


FIGURE 14 : CARACTERISATION EN SDS-PAGE DE LA PROTEINE RECOMBINANTE P30 APRES COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE.

1 : β galactosidase purifiée

2 : lysat bactérien d'E.coli

3,4 et 5 : Trois préparations différentes de la protéine recombinante P30 exprimée dans E.coli (flèche)

lysate bactérien d'*E. coli* Y1089. Des sérums sains ont été utilisés comme contrôles négatifs.

La reconnaissance de la protéine recombinante par ces différents sérums démontre le clonage d'un épitope de l'antigène P30 de *T. gondii* (Fig. 15).

La protéine recombinante a été utilisée pour l'immunisation de lapins. Par la technique d'Immunofluorescence Indirecte, nous avons pu démontrer que les sérums anti-protéine recombinante reconnaissent la surface des tachyzoïtes. Un sérum de lapin sain et un sérum de lapin dirigé contre une autre protéine recombinante de *T. gondii* produite chez *E. coli* ont été employés comme contrôles négatifs (Fig. 16). Ces mêmes sérums reconnaissent un extrait antigénique de *T. gondii* par la technique de "dot immunoassay" (Fig. 17).

2.4. Sous-clonage de l'insert P30.8

Il était nécessaire dans une première étape de caractérisation du clone d'obtenir le fragment d'ADN de *T. gondii* cloné (insert).

L'ADN phagique du clone λ gt11 P30.8 a été isolé puis digéré par l'endonucléase EcoRI. Après électrophorèse en gel d'agarose 2 %, l'insert a été visualisé aux ultraviolets après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Nous avons pu ainsi déterminer selon la distance de migration, la taille

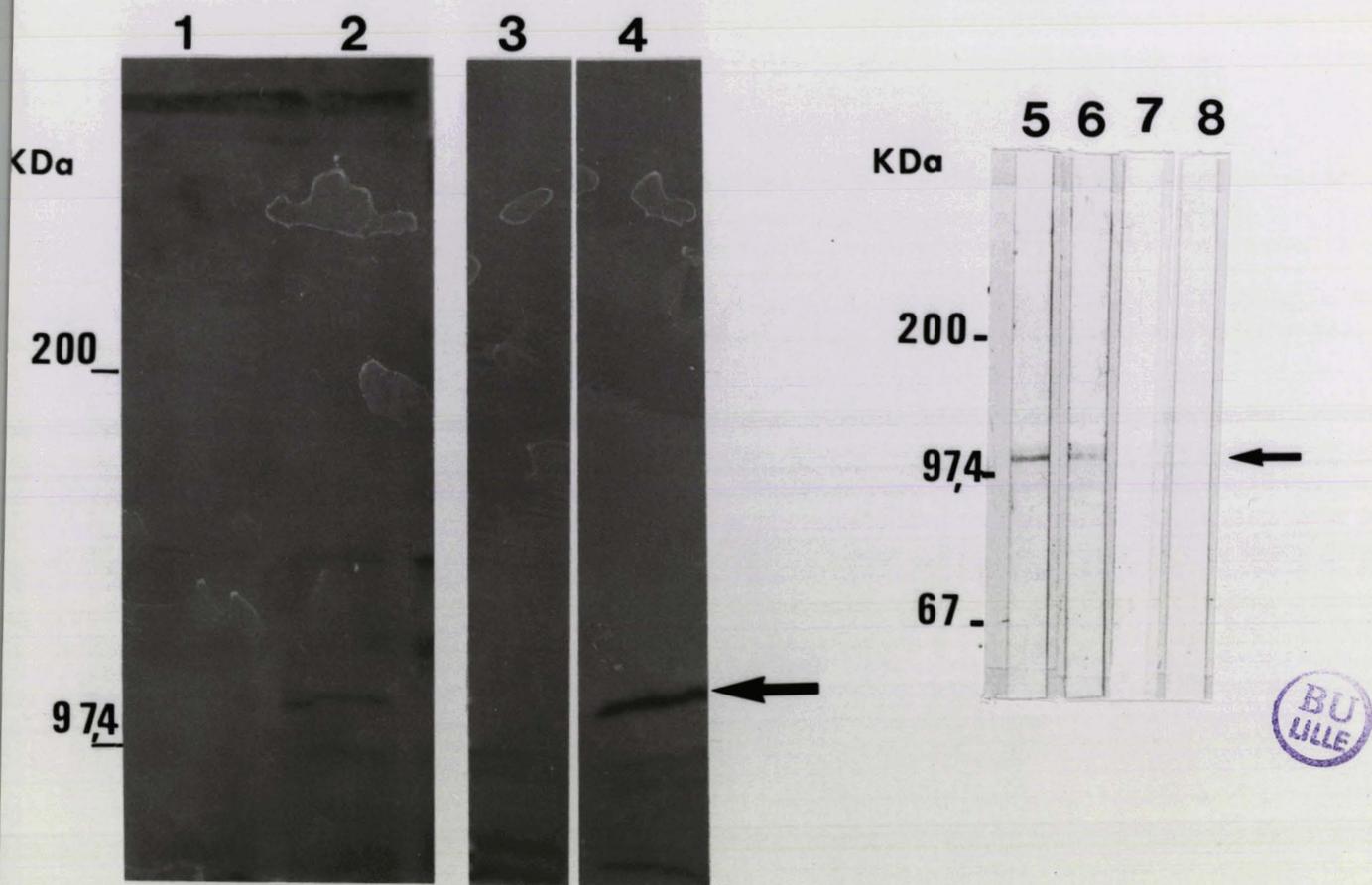


FIGURE 15 : CARACTERISATION PAR IMMUNOELECTROTRANSFERT DE LA PROTEINE RECOMBINANTE P30.

1 et 2 : Révélation de la protéine recombinante P30 par le sérum de lapin hyperimmun (1/100)

- 1 : lysat bactérien d'E.coli
- 2 : protéine recombinante P30

3 et 4 : Révélation de la protéine recombinante P30 par le sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC (1/100)

- 3 : lysat d'E.coli
- 4 : protéine recombinante P30

5,6,7 et 8 : Révélation de la protéine recombinante P30 par des sérums humains prélevés en phase chronique (1/100) (5 et 6) ou sains (1/100) (7 et 8)



FIGURE 16 : RECONNAISSANCE DE LA SURFACE DES TACHYZOITES PAR LE SERUM DE LAPIN ANTI-PROTEINE RECOMBINANTE P30 EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.



1 2 3 4 5 6

FIGURE 17 : RECONNAISSANCE PAR LA TECHNIQUE DE "DOT IMMUNOASSAY" DE L'EXTRAIT ANTIGENIQUE DE T. GONDII PAR UN SERUM DE LAPIN PRODUIT CONTRE LA PROTEINE RECOMBINANTE P30.

Antigène déposé :

1,3 et 5 : 0,5mg de BSA

2,4 et 6 : 0,5mg d'extrait antigénique de T.gondii

Révélation par :

1 et 2 : sérum de lapin anti-protéine recombinante P30 (1/100)

3 et 4 : sérum de lapin sain (1/100)

5 et 6 : sérum de lapin hyperimmun (1/100)

approximative de l'insert : 150 paires de base (vis-à-vis de témoins de poids moléculaires : échelle BRL 123 pb).

L'insert a été ensuite extrait de l'agarose et sous-cloné dans le site EcoRI du vecteur plasmidique pUC13. L'hôte bactérien utilisé, *E. coli* JM109 est alors amplifié, le plasmide pouvant être ensuite extrait et digéré par EcoRI. La présence de l'insert dans pUC13 est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 2 % (Fig. 18).

2.5. Séquençage de l'insert du clone P30.8 et déduction de la séquence peptidique

Pour analyser les séquences nucléotidique et protéique du clone P30.8, l'insert obtenu a été sous-cloné dans le phage M13 mp18.

Le séquençage de l'insert par la méthode des didéoxynucléotides terminateurs de chaîne (SANGER *et al.*, 1977) (Fig. 19)) a permis la caractérisation complète de la séquence qui comprend 164 paires de bases codant pour 54 acides aminés, le cadre de lecture étant défini à partir de l'insertion dans le gène de la β -D-galactosidase du phage λ gt11 (Fig. 20).

Cette séquence nous a permis d'observer que nous n'avions ni la partie N-terminale, ni la partie C-terminale de l'antigène P30.

L'interrogation de banques de données de séquences (GENBANK, EMBL, NBRF) indique que cette séquence ne

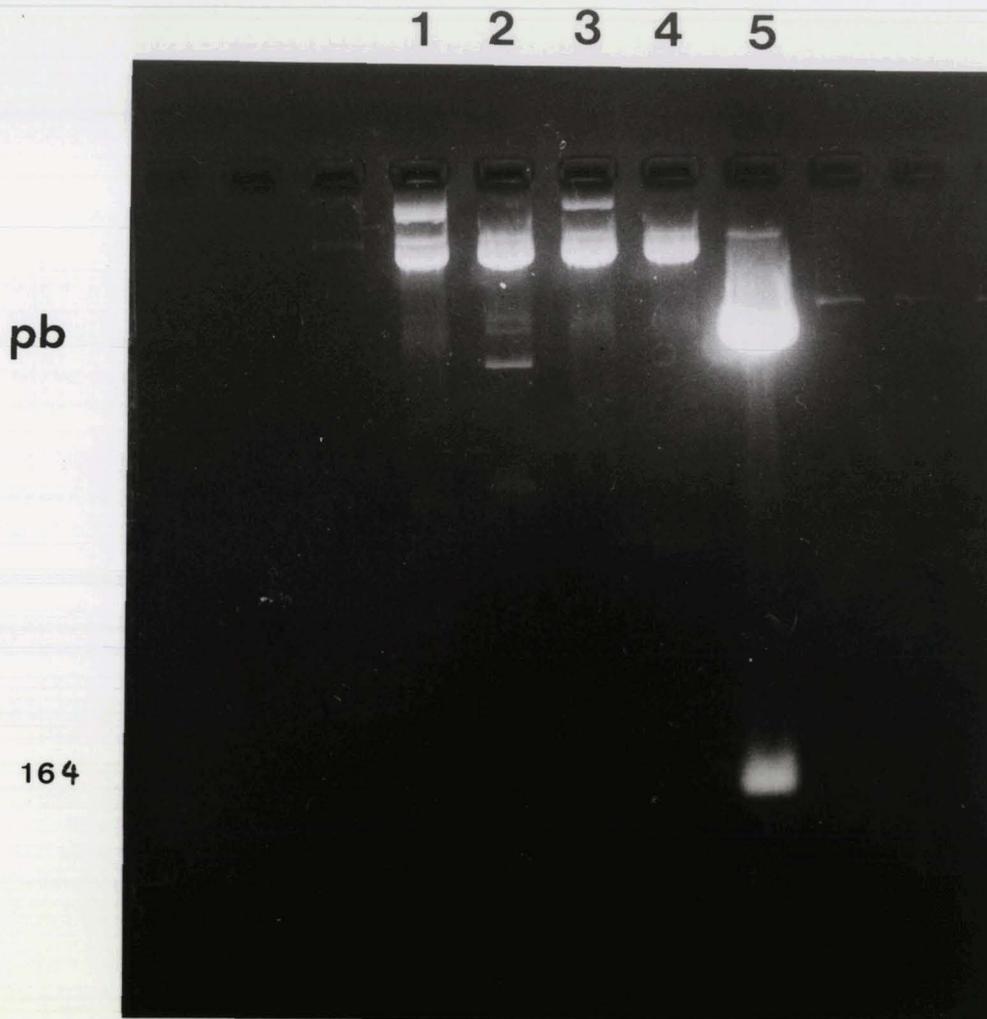


FIGURE 18 : VERIFICATION SUR GEL D'AGAROSE 2% COLORE AU BrEt DE LA PRESENCE DE L'INSERT DU CLONE P30.8 DANS LE CULOT BACTERIEN (E.COLI JM 107) APRES INFECTION PAR LE PHAGE M13 AVANT LE SEQUENCAGE. L'ADN BACTERIEN A ETE DIGERE PAR L'ENDONUCLEASE Eco RI.

1, 2, 3 et 4 : phages M13 mp18 contenant le fragment de digestion Eco RI de 164pb.

5 : plasmide pUC 13 contenant l'insert du clone P30.8 digéré par Eco RI (contrôle).

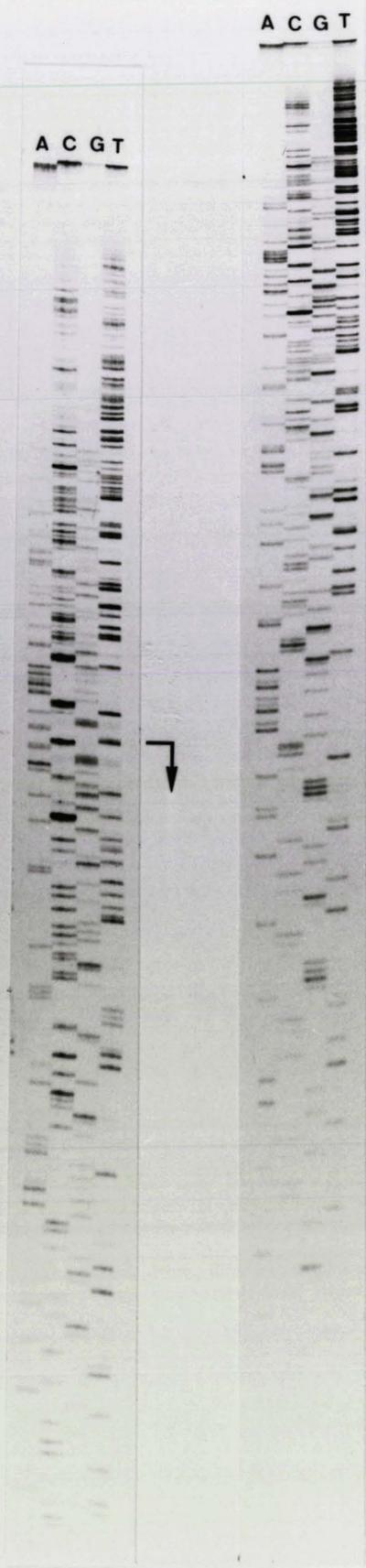


FIGURE 19 : GEL DE SEQUENCAGE DU CLONE P30.8.

└ Sequence du clone P30.8.

comporte pas d'homologies marquées avec des molécules déjà décrites.

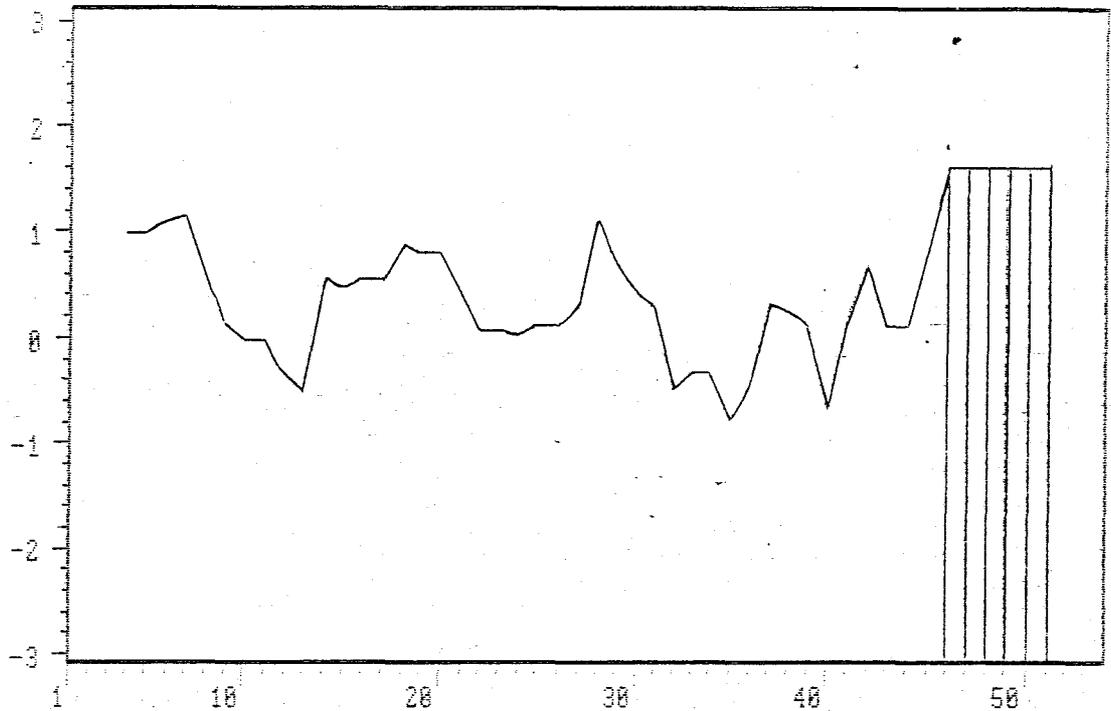
2.6. Synthèse d'un peptide contenant un (des) épitope(s) de l'antigène P30

La production de l'antigène recombinant dans le système d'expression Y1089 étant limitante aussi bien en termes quantitatifs que qualitatifs, nous avons envisagé la substitution de l'antigène P30 par des peptides obtenus à partir de la protéine clonée.

Après analyse informatique de la séquence en acides aminés prédite par la séquence nucléotidique, un peptide a été synthétisé (Fig. 21). Ce peptide a la structure soulignée dans la séquence citée précédemment, mis à part que la thréonine N-terminale est remplacée par un résidu acétylcystéine pour faciliter le couplage aux protéines (Fig. 20).

Après couplage à l'albumine bovine (BSA) par liaison covalente, ce matériel a servi à immuniser des lapins et des souris. En utilisant la technique d'Immunofluorescence Indirecte, il a été possible de démontrer que les sérums ainsi obtenus reconnaissent la surface des tachyzoïtes. Des sérums de lapins et souris sains ont été employés comme contrôles négatifs (Fig. 22).

Parallèlement, le peptide couplé à la BSA a été utilisé pour cribler les sérums de malades infectés par



Hydrophilicity profile of protein sequence P308PEP.
Computed using an average group length of 6 amino acids.

Total number of amino acids is: 53.

=====
A : Profil d'hydrophilicite du polypeptide complet.

=====
* PREDICTION OF ANTIGENIC DETERMINANTS *
=====

Analysis done on protein sequence P308PEP.

Total number of residues is: 53.
The method used is that of Hopp and Woods.
The averaging group length is: 6 amino acids.
-> This is the value recommended by the authors <-

The three highest points of hydrophilicity are:

- (1) Ah= 1.52 : From 43 to 53 : Arg-Lys-Ala-Asu-Glu-Lys-Lys-Glu-Ala-Leu
- (2) Ah= 1.17 : From 25 to 30 : Asp-Pro-Ala-Lys-Val-Lys
- (3) Ah= 1.15 : From 4 to 9 : Gly-Arg-Ser-Arg-Ser-Ser

Ah stands for: Average hydrophilicity.

Note that, on a group of control proteins, only the highest point was in 100% of the cases assigned to a known antigenic group. The second and third points gave a proportion of 33% of incorrect predictions.

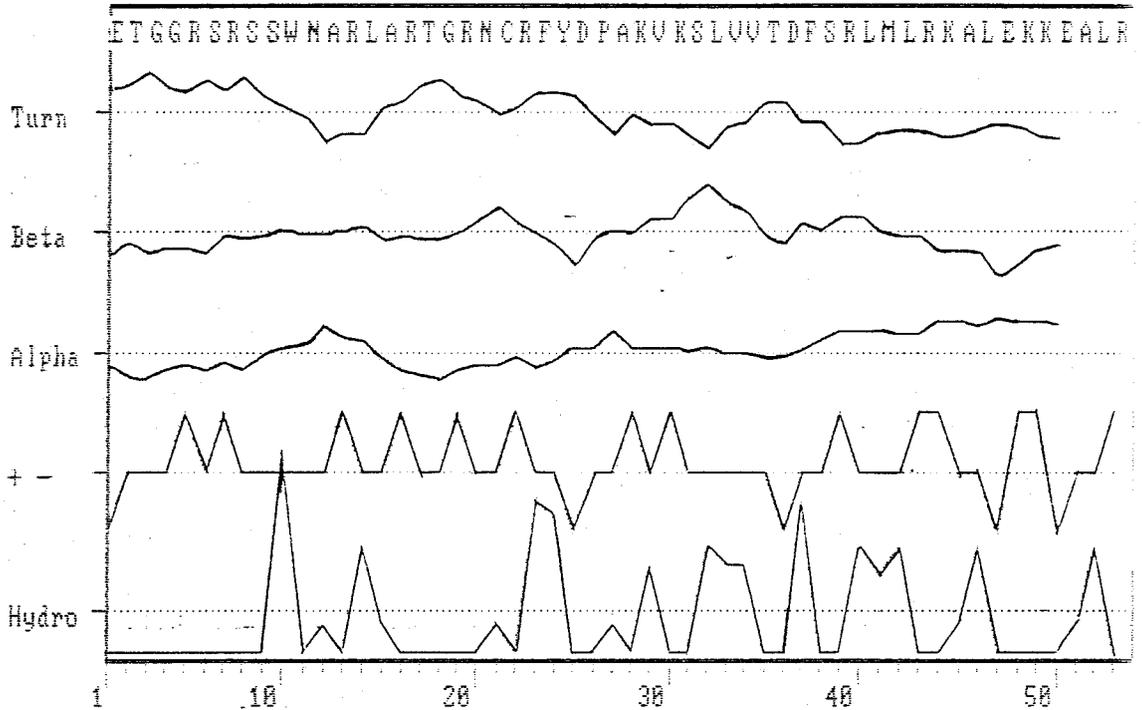
=====
B : Prédiction des déterminants antigéniques.

FIGURE 21 : ANALYSE INFORMATIQUE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DU CLONE P30.8.

Charged residues profile.
 Alpha helix propensity.
 Beta sheet propensity.
 Reverse turn propensity.

For sequence P308PEP.

Total number of amino acids is: 53.



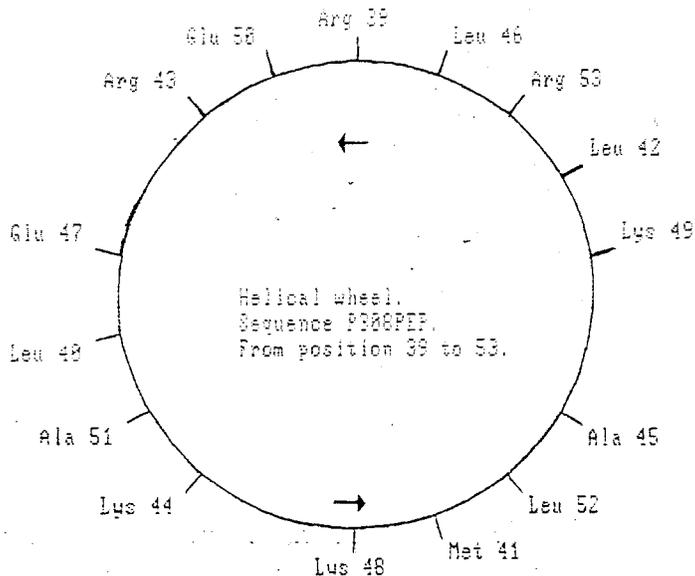
Plot of secondary structure curves for sequence P308PEP.
 From position 1 to 53.

C : Profil d'hydrophobicité du polypeptide complet.

Program HELWHEEL.

Helical wheel representation for sequence P308PEP.

Total number of residues is: 53.

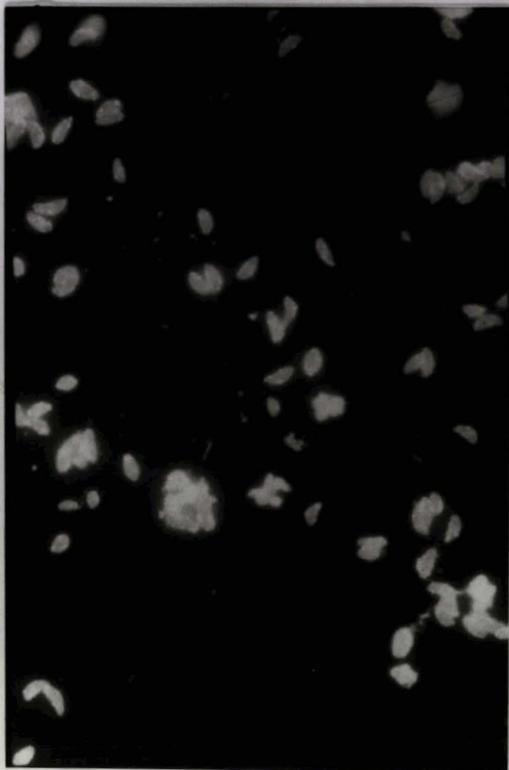


D : Représentation en alpha-hélice de la partie N-terminale du polypeptide.

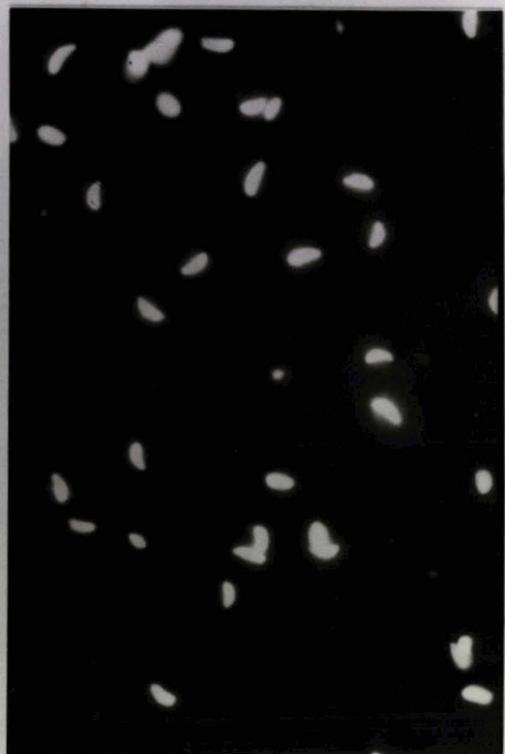
FIGURE 21 : ANALYSE INFORMATIQUE DE LA SEQUENCE PEPTIDIQUE DU CLONE P30.8.



2



1



3

BU
LILLE

FIGURE 22 : RECONNAISSANCE DE LA SURFACE DES TACHYZOITES PAR
LES SERUMS DE LAPIN ET DE SOURIS ANTI-PEPTIDE
CONJUGUE EN IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE.

- 1 : sérum de lapin anti-peptide.
- 2 : sérum de souris saine.
- 3 : sérum de souris anti-peptide conjugué.

T. gondii. Nous avons mis au point la technique de "dot-immunoassay" pour cribler ces sérums. Nous constatons que ce peptide contient un (des) épitope(s) de l'antigène P30 reconnu(s) par les anticorps présents dans le sérum de malades atteints de toxoplasmose (Fig. 23).

2.7. Hybridation avec l'ADN et l'ARN de *T. gondii*

Bien que par des tests d'immunogénicité nous ayons pu mettre en évidence que l'insert cloné possède un épitope de *T. gondii*, il convenait néanmoins de vérifier la présence de cette séquence dans les acides nucléiques du toxoplasme.

Un oligonucléotide de 18 bases, complémentaire de la séquence 5' du brin codant, a été synthétisé. Cet oligonucléotide a la structure soulignée dans la séquence citée précédemment (Fig. 20).

Une sonde a été préparée avec cet oligonucléotide après marquage au $\gamma^{32}\text{P}$ sur l'extrémité 5'OH par Kination, permettant ainsi son utilisation dans des tests d'hybridation.

Des tests d'hybridation ont été réalisés pour comparer le matériel synthétisé à partir du clone P30.8 et les acides nucléiques de *T. gondii*.

L'oligonucléotide marqué au $\gamma^{32}\text{P}$ a été employé comme sonde dans l'hybridation par la technique de "dot-blot" avec l'ADN de *T. gondii* et avec l'insert provenant du clone P30.8, confirmant que la séquence déterminée existe

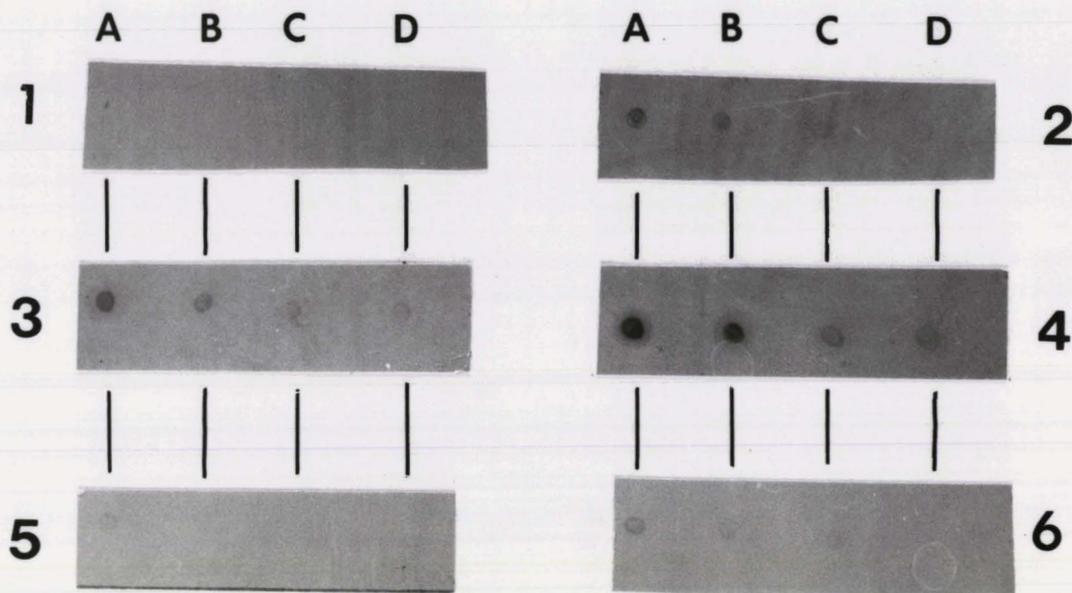


FIGURE 23 : RECONNAISSANCE DU PEPTIDE DE SYNTHÈSE (AcetylCys, Asp, Phe, Ser, Arg, Leu, Met, Leu, Arg, Lys, Ala, Leu, Glu, Lys, Lys, Glu, Ala, Leu, Arg) CONJUGUÉ À LA BSA, PAR DIFFÉRENTS SÉRUMS.

Quantité de peptide conjugué déposé (A:120ng, B:60ng, C:30ng, D:15ng)

Révélation par :

- 1 : sérum de lapin sain (1/100)
- 2 : sérum de lapin anti-P30 purifiée par HPLC (1/100)
- 3 : sérum humain chronique I (1/100)
- 4 : sérum humain chronique II (1/100)
- 5 : sérum humain sain I (1/100)
- 6 : sérum humain sain II (1/100)

Remarque : les mêmes quantités de BSA pure ont montré une réponse négative avec les mêmes sérums.

dans l'ADN de *T. gondii* et que la séquence de l'insert est correcte (Fig. 24).

L'insert marqué au $\alpha^{32}\text{P}$ par le système des amorces hexamériques d'ADN, a été employé comme sonde dans l'hybridation avec l'ADN de *T. gondii* par "dot-blot" pour démontrer qu'elle est la fraction d'ADN qui contient une copie du gène codant pour la P30 (Fig. 25).

L'ADN de souris a été employé comme contrôle négatif.

L'insert a aussi été employé comme sonde radioactive pour déterminer la taille de l'ARN messager codant pour la P30 (selon la méthode de "Northern blot"). La détection d'ARN n'a pas été possible étant donné sa faible quantité parmi les ARN totaux de *T. gondii*.

3. RECHERCHE DE LA COPIE DU GENE CODANT POUR

L'ANTIGENE P30

Pour essayer de trouver la copie complète du gène codant pour l'antigène P30, nous avons construit une banque génomique de *T. gondii*. Pour limiter le criblage des clones, la banque a été construite à partir d'un fragment génomique contenant le ou une partie du gène d'intérêt.

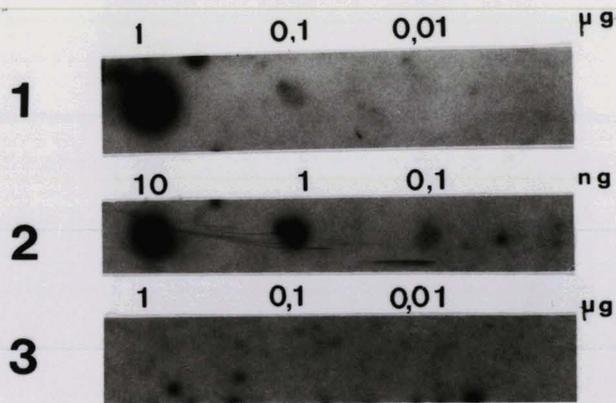


FIGURE 24 : RECONNAISSANCE PAR "DOT-BLOT" DE L'ADN DE T. GONDII PAR L'OLIGONUCLEOTIDE (CCTGGACCGTCCACCGGT) MARQUE AU ^{32}P .

L'oligonucléotide marqué au ^{32}P a été hybridé avec :

- 1 : ADN de T.gondii
- 2 : insert du clone P30.8
- 3 : ADN de souris

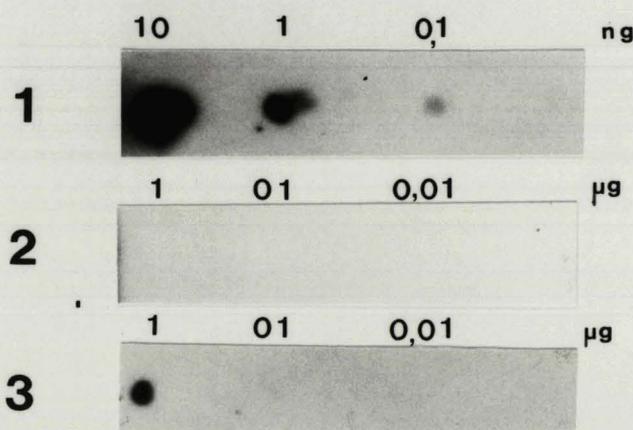


FIGURE 25 : RECONNAISSANCE PAR "DOT-BLOT" DE L'ADN DE T. GONDII PAR L'INSERT DU CLONE P30.8 MARQUE AU ^{32}P .

L'insert marqué au ^{32}P a été hybridé avec :

- 1 : insert du clone P30.8
- 2 : ADN de souris
- 3 : ADN de T. gondii

3.1. Détermination d'une fraction d'ADN génomique codant pour l'antigène P30

Dans un premier temps, l'ADN de *T. gondii* a été digéré par les endonucléases EcoRI, HindIII et Sal I.

Après séparation en gel d'agarose 1 % et transfert sur nitrocellulose, une hybridation a été effectuée en utilisant l'insert du clone P30.8 comme sonde radioactive (selon la méthode de SOUTHERN, 1977).

L'analyse autoradiographique démontre que la copie du gène codant pour l'antigène P30 se trouve dans la fraction de 1600 paires de base après digestion par EcoRI, de 3500 paires de base après digestion par HindIII et 5620 paires de base après digestion par SalI (Fig. 26).

La fraction issue de la digestion par EcoRI nous est apparue la plus intéressante selon le critère "taille", pour la construction d'une banque génomique.

L'ADN digéré par EcoRI a été déposé sur gel d'agarose 1 % et le gel a été coloré au Bromure d'éthidium.

3 fractions de cette digestion ont été extraites de l'agarose : de 500 à 1000 pb, de 1000 à 2000 pb et de 2000 à 5000 pb. Ces fractions sont ensuite testées par "dot-blot" en utilisant l'insert du clone P30.8 comme sonde radioactive (Fig. 27). L'ADN de souris a été employé comme contrôle négatif.

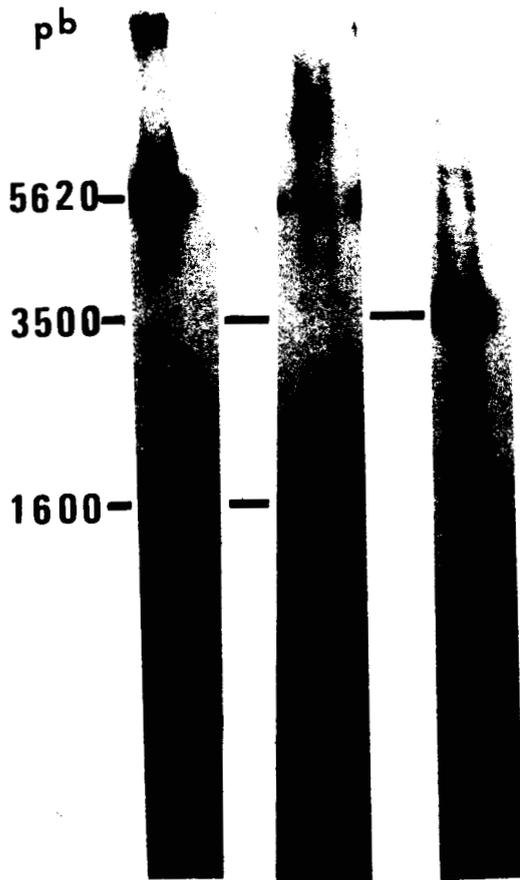


FIGURE 26 : ANALYSE PAR "SOUTHERN BLOT" DE L'ADN DE T. GONDII APRES DIGESTION TOTALE PAR Eco RI, Sal I et Hind III ET HYBRIDATION AVEC L'INSERT DU CLONE P30.8 MARQUE AU ^{32}P .

- 1 : Digestion par Sal I
- 2 : Digestion par Eco RI
- 3 : Digestion par Hind III

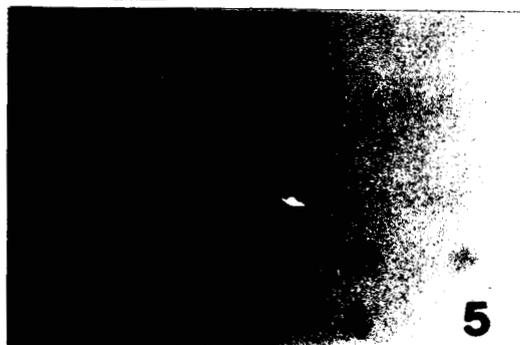


FIGURE 27 : RECONNAISSANCE PAR "DOT-BLOT" DE LA FRACTION ENTRE 1000 ET 2000 pb DE L'ADN DE T. GONDII DIGERE PAR Eco RI PAR L'INSERT DU CLONE P30.8 MARQUE AU ^{32}P .

L'insert marqué au ^{32}P a été hybridé avec 1 μg d'ADN de :

- 1 : insert du clone P30.8
- 2 : fraction 5000-2000pb
- 3 : fraction 2000-1000pb
- 4 : fraction 1000-500pb
- 5 : ADN de souris

La fraction entre 1000 et 2000 paires de base est retenue pour la construction de la banque génomique.

3.2. Préparation d'une banque génomique de la fraction de 1000 à 2000 pb de l'ADN de *T. gondii* dans le phage λ gt10

La fraction EcoRI de 1000 à 2000 paires de base de l'ADN de *T. gondii* a été insérée dans le site EcoRI du phage λ gt10. La banque ainsi obtenue a été inoculée sur la souche *E. coli* C600 Hfl à une dilution e 10^4 phages/boîte de 90 mm de diamètre. 10^7 phages recombinants ont été ainsi obtenus.

Un aliquot de 10^5 recombinants a été étalé sur des boîtes et les phages obtenus ont été transférés sur membrane de nitrocellulose par simple contact avec la boîte.

3.3. Criblage de la banque génomique

Les clones obtenus dans la banque génomique sont criblés après hybridation des membranes de nitrocellulose contenant une portion de l'ADN des phages λ gt10 recombinants, en présence de l'insert du clone P30.8 marqué au α^{32} P utilisé comme sonde radioactive.

Après analyse autoradiographique, 70 clones positifs ont été reconnus par la sonde. Après amplification, l'ADN phagique des 70 clones a été isolé puis digéré par EcoRI. Une électrophorèse en gel d'agarose 1 % suivie d'un

transfert sur nitrocellulose a été effectuée et l'insert est visualisé par autoradiographie, après hybridation en présence de l'insert du clone P30.8 marqué au $\alpha^{32}\text{P}$ utilisé comme sonde radioactive (Fig. 28).

20 clones sont ainsi retenus.

3.4. Détermination de la carte de restriction

Pour pouvoir séquencer l'ADN du clone obtenu dans la banque génomique, il fallait obtenir des fragments bien déterminés.

Trois clones parmi les 20 clones obtenus ont été sélectionnés (G11, G36 et G42). Les phages sont purifiés et amplifiés (Fig. 29). Après extraction, les inserts sont sous-clonés dans le site EcoRI du vecteur plasmidique pUC19. Ces inserts ont été comparés par cartes de restriction.

Les profils de digestion par les enzymes ont montré que les 3 inserts étaient identiques et insérés dans le même sens (Fig. 30).

Le clone G42 a été choisi et la carte de restriction a été établie après digestion de l'ADN par les enzymes : AccI, AvaI, AspI, BamHI, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, SacI, SacII, SalI, SmaI, SphI, XbaI (absence de sites de coupure) et AccI, HincII, PstI, PvuI, PvuII, SstI, XhoI (présence de sites de coupure) (Fig. 31 et 32).

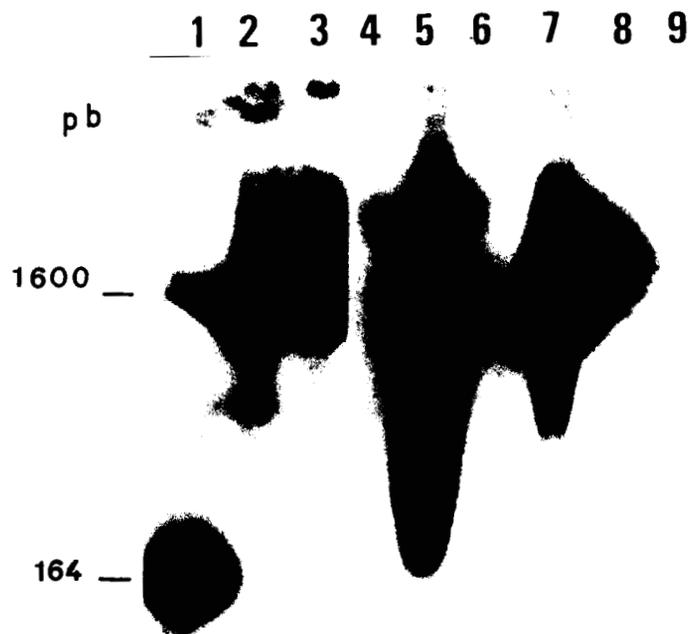


FIGURE 28 : DETECTION PAR "SOUTHERN BLOT" DES CLONES GENOMIQUES CONTENANT UNE COPIE DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE P30 APRES DIGESTION PAR Eco RI DES ADNs DE PHAGES λ gt 10 RECOMBINANTS. LES INSERTS SONT REVELES PAR L'INSERT P30.8 MARQUE AU 32 P.

1 : Clone P30.8 (contrôle positif) (λ gt 11)

2, 3, 5 et 7 : Clones contenant une partie du gène codant pour l'antigène P30 (λ gt 10)

4, 6, 8 et 9 : Clones négatifs (λ gt 10)

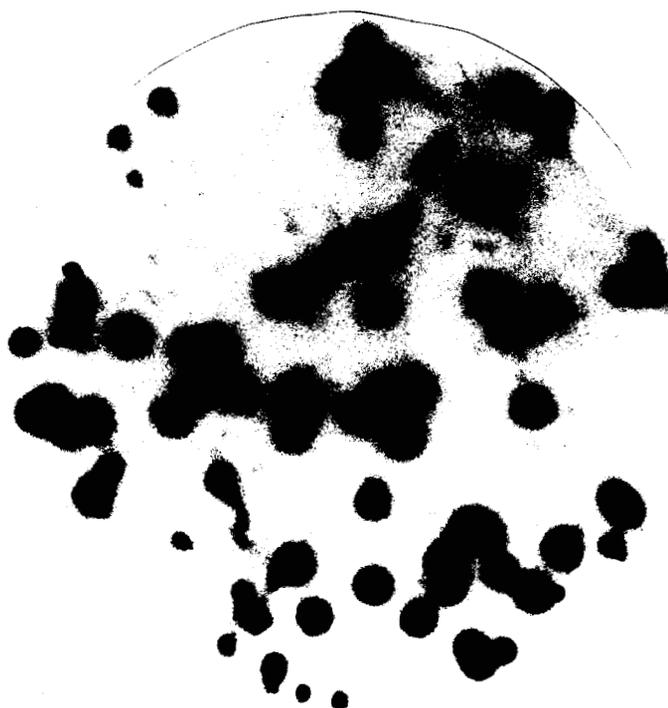
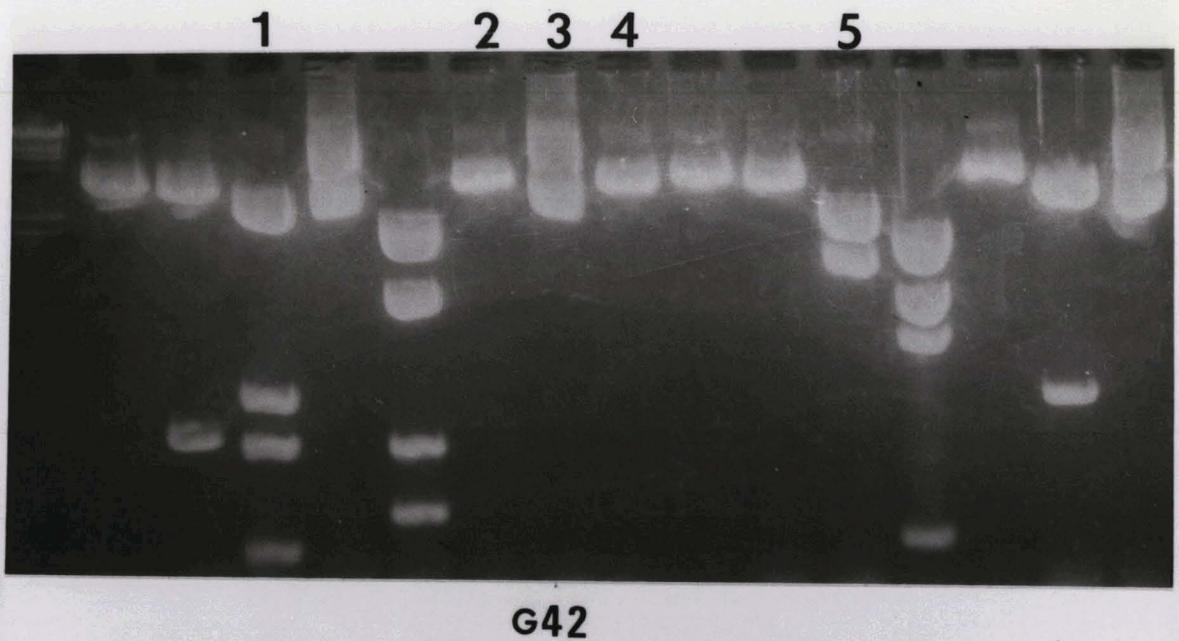


FIGURE 29 : PURIFICATION DU CLONE GENOMIQUE G42 REVELE PAR L'INSERT P30.8 MARQUE AU 32 P.



BU
LILLE

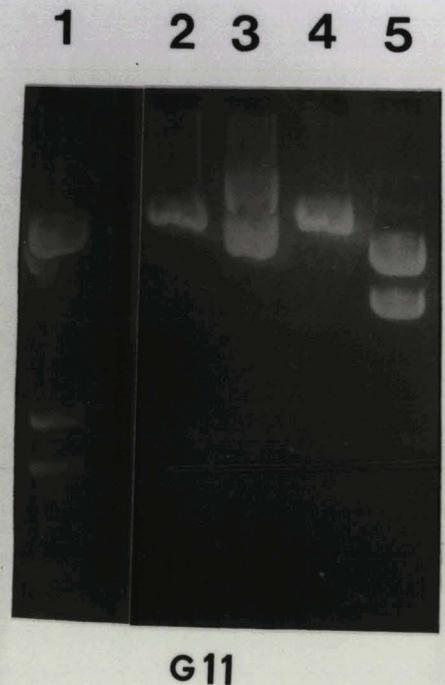
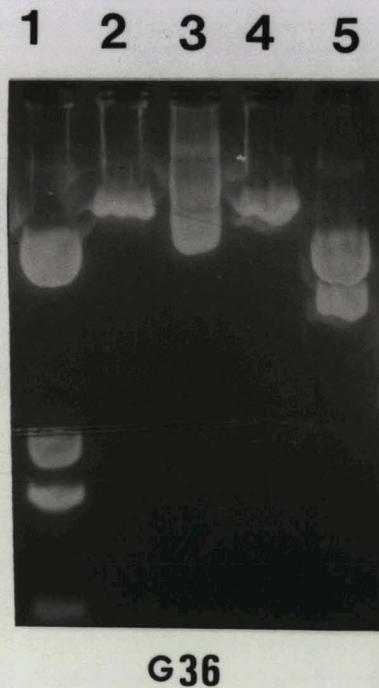


FIGURE 30 : ANALYSE SUR GEL D'AGAROSE 1% COLORE AU BrEt DES CLONES G42, G36 ET G11 APRES DIGESTION PAR DIFFERENTS ENZYMES DE RESTRICTION.

1 : Pst I; 2 : Hind III; 3 : Ava I; 4 : Sal I; 5 : Eco RI

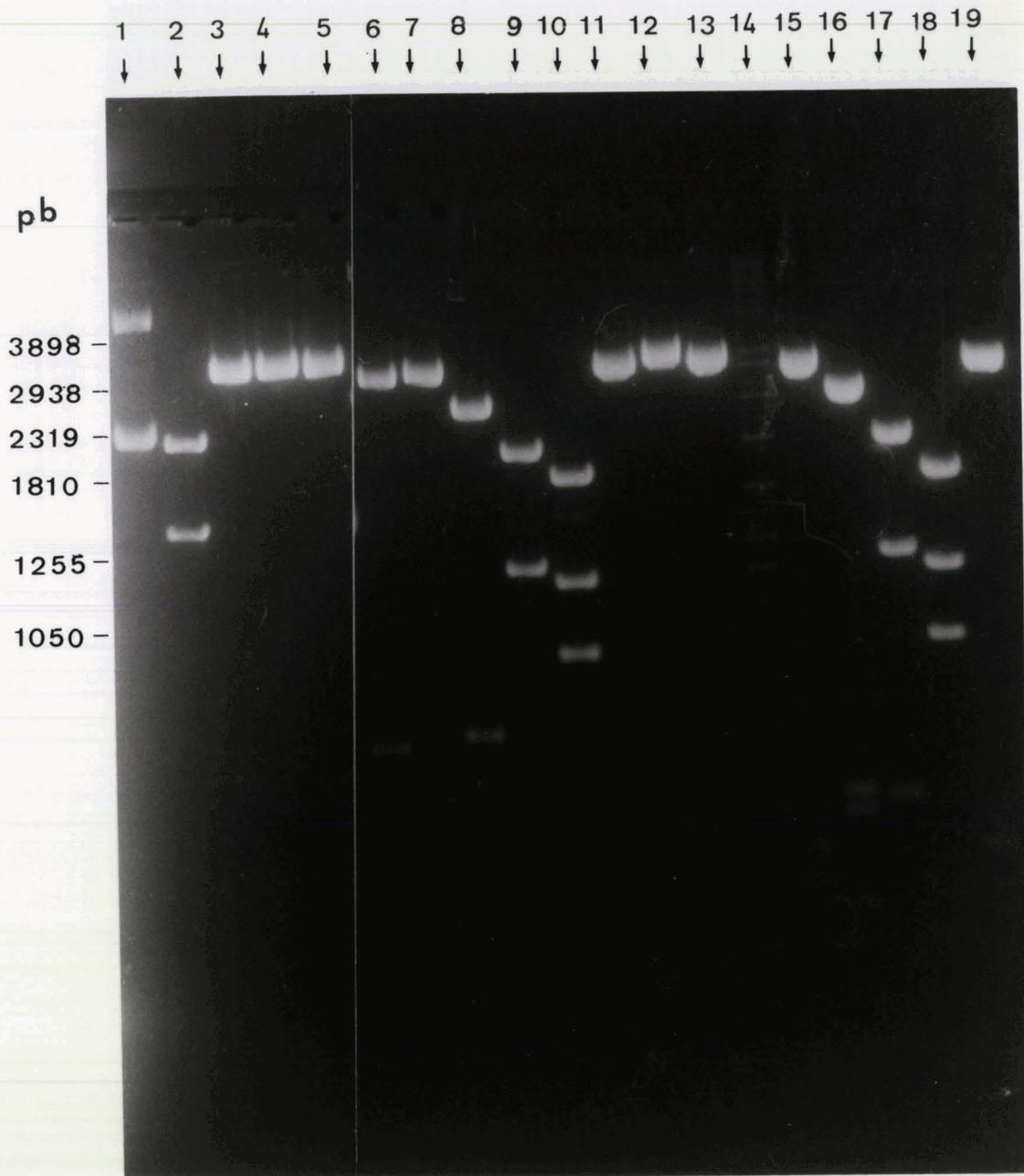


FIGURE 31 : ANALYSE SUR GEL D'AGAROSE 1% COLORE AU BrEt DU CLONE G42 APRES DIGESTION PAR DIFFERENTS ENZYMES DE RESTRICTION.

1 : Plasmide non coupé; 2 : Eco RI; 3 : Hind III; 4 : Xho I
 5 : Sst I; 6 : Hinc II; 7 : Acc; 8 : Pst I; 9 : Pvu II; 10 : Pvu I
 11 : Hind III + Xho I; 12 : Hind III + Sst I; 13 : Sst I + Xho I
 14 : Poids moléculaires; 15 : Hinc II + Xho I; 16 : Pst I + Xho I
 17 : Pvu II + Xho I; 18 : Pvu I + Xho I; 19 : Acc I + Xho I

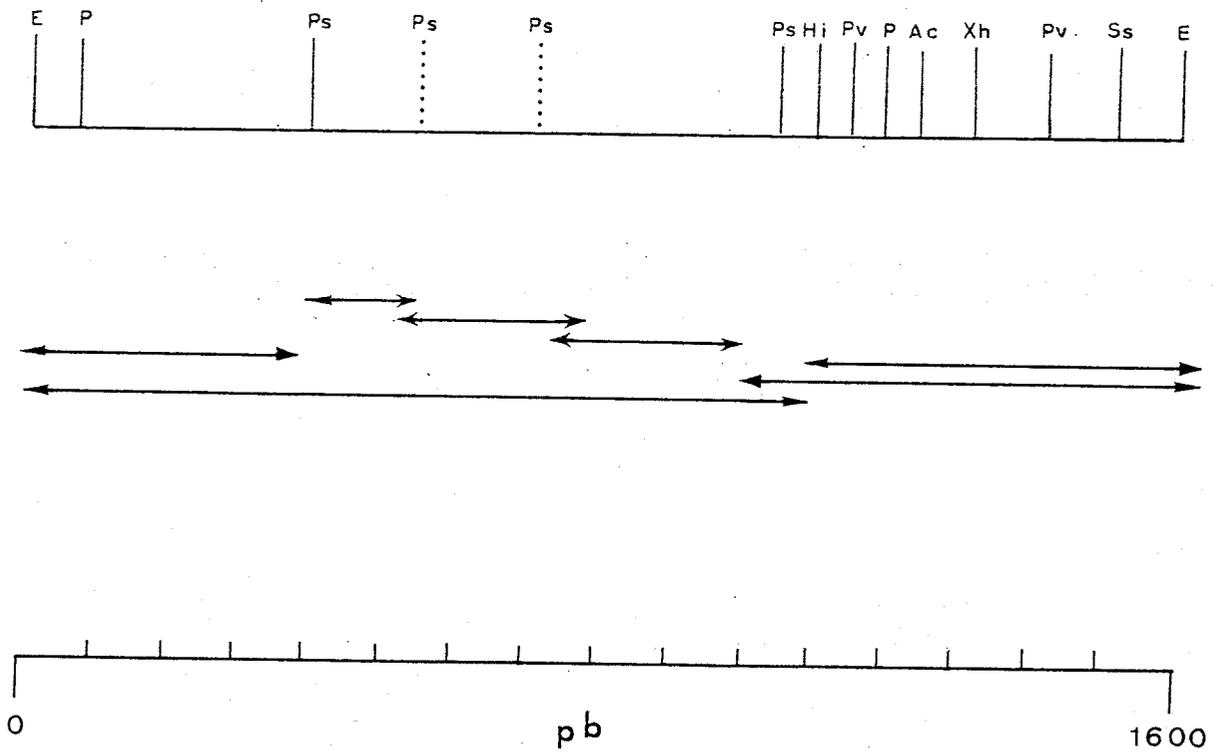


FIGURE 32 : CARTE DE RESTRICTION DE L'ADN GENOMIQUE CONTENANT LE GENE CODANT POUR L'ANTIGENE P30 ET STRATEGIE DE SEQUENCAGE.

Ac : Acc I; E : Eco RI; Hi : Hinc II; P : Pvu I; Ps : Pst I
 (.....:sites non positionnés); Pv : Pvu II; Ss : Sst I;
 Xh : Xho I.

3.5. Sous-clonage des fragments de digestion

La stratégie de séquençage a été établie après analyse de la carte de restriction (Fig. 32).

Les fragments EcoRI-PstI et PstI-PstI ont été choisis en raison de leur taille et de leur distribution dans l'insert G42. Les fragments EcoRI-HincII ont été choisis de façon à pouvoir séquencer la partie interne de l'insert G42 et recouvrir la séquence déterminée par les fragments PstI-PstI.

L'ADN plasmidique contenant l'insert G42 est digéré par les différentes enzymes.

Après une électrophorèse en gel d'agarose 1,2 %, les fragments sont visualisés aux ultraviolets après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium. Les fragments obtenus sont d'environ : EcoRI-HincII 1100 pb et 500 pb, EcoRI-PstI 500 pb et 420 pb, PstI-PstI 350 pb, 200 pb et 100 pb.

Ces fragments ont été ensuite extraits de l'agarose et sous-clonés dans les sites adéquats des phages M13 mp10, M13 mp11, M13 mp18 et M13 mp19. La présence des fragments dans l'ADN des cellules hôtes prouve l'efficacité du clonage (Fig. 33).

L'hybridation des fragments de la digestion par les enzymes EcoRI et PstI avec l'insert du clone P30.8 marqué au $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP selon la méthode de SOUTHERN (1977) a révélé

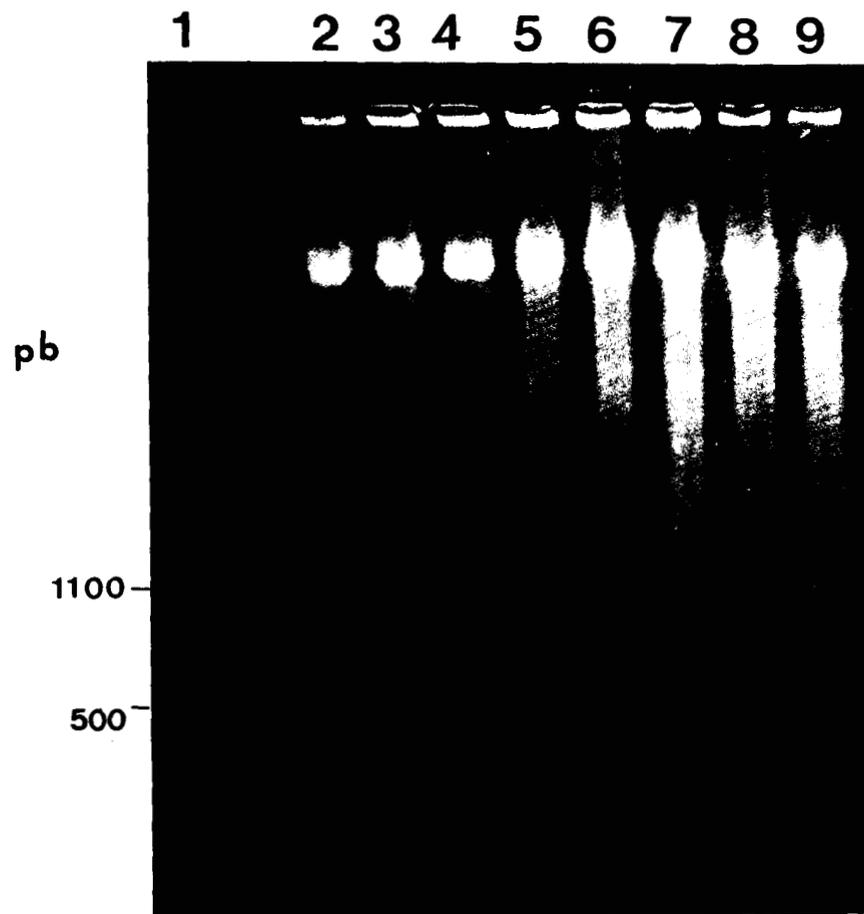


FIGURE 33 : VERIFICATION SUR GEL D'AGAROSE 1% COLORE AU BrEt DE LA PRESENCE D'INSERT DANS LE CULOT BACTERIEN (E. COLI JM 107) APRES INFECTION PAR LE PHAGE M13 AVANT LE SEQUENCAGE. L'ADN BACTERIEN A ETE DIGERE PAR LES ENDONUCLEASES Eco RI ET Hinc II.

1 : Plasmide pUC 19 contenant l'insert du clone génomique digéré par Eco RI et Hinc II (contrôle).

2 à 5 : Phages M13 mp18 contenant le fragment de digestion Eco RI + Hinc II de 1100pb.

6 à 9 : Phages M13 mp18 contenant le fragment de digestion Eco RI + Hinc II de 500pb.

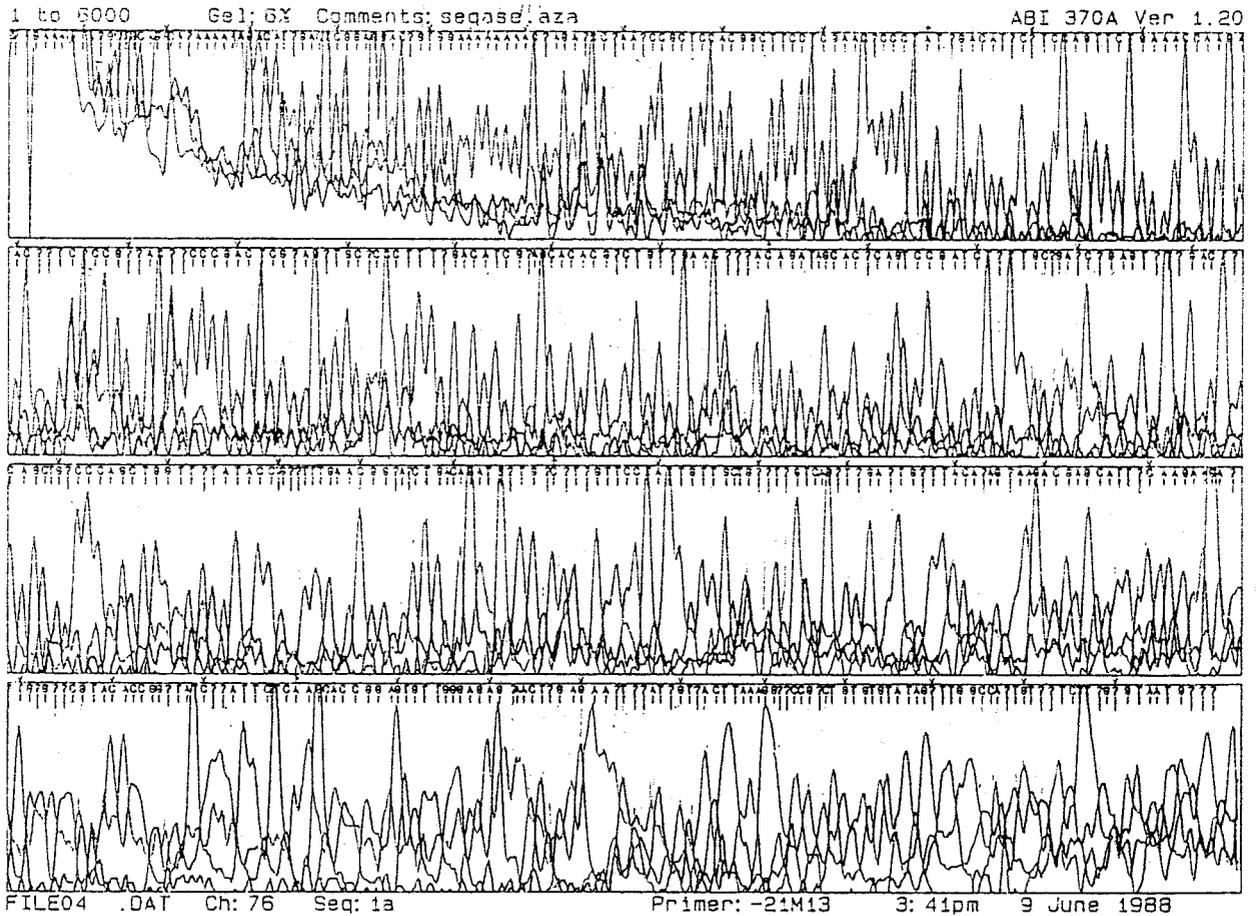


FIGURE 34 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA LECTURE DU GEL DE SEQUENCAGE DANS LE SYSTEME APPLIED.

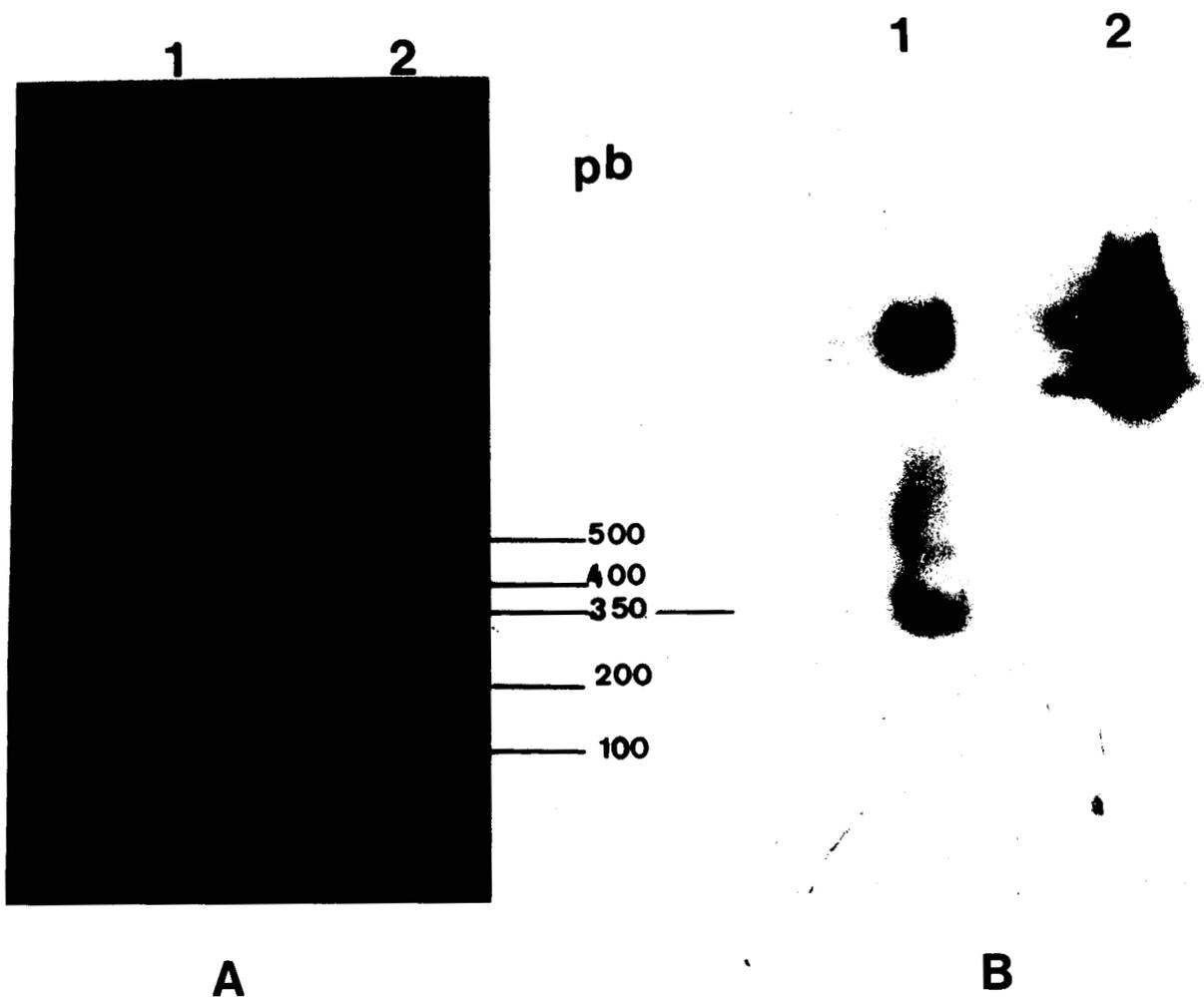


FIGURE 35 : RECHERCHE DE LA LOCALISATION DU CLONE P30.8 DANS LES FRAGMENTS DE DIGESTION Eco RI + Pst I DU CLONE GENOMIQUE G42.

A : Gel d'agarose 1% coloré au BrEt des fragments de digestion.

B : Identification par "Southern-blot" du fragment de la double digestion Eco RI + Pst I qui contient la séquence nucléotidique de l'insert du clone P30.8 par hybridation avec cet insert marqué au 32 P.

1 : pUC 19 contenant l'insert du clone génomique digéré par Eco RI + Pst I

2 : pUC 19 contenant l'insert du clone génomique digéré par Eco RI (contrôle).

une seule bande, le fragment PstI-PstI de 350 pb (Fig. 35).

3.6. Séquençage des fragments de digestion

La séquence partielle du gène codant pour l'antigène P30 obtenu dans la banque génomique est ainsi déterminée.

Le séquençage de l'insert G42 a été effectué par la méthode des didéoxynucléotides terminateurs de chaîne (SANGER *et al.*, 1977) (Fig. 34).

La déduction de la séquence du clone G42 a été obtenue. Les cadres de lecture établis ont été comparés à celui du clone P30.8 (Fig. 36).

Un cadre de lecture probable pour la séquence peptidique de l'antigène P30 est établi.

Le résultat ainsi obtenu permettra l'obtention d'autres épitopes de l'antigène P30 ainsi que la détermination de la localisation du gène codant pour cet antigène dans le génome de *T. gondii*.

FIGURE 36 : SEQUENCE DU CLONE GENOMIQUE.

Cette séquence est actuellement soumise en annexe du brevet "Clonage et séquence de la P30 de T.gondii" déposé en France le 24 Juin 1988, sous le numéro 8808535.

DISCUSSION

Notre travail a demandé une approche multidisciplinaire. Il a été nécessaire à la fois de recourir à des approches biochimiques pour étudier l'antigène P30 afin d'aboutir à sa purification et à une meilleure caractérisation, à des approches immunologiques pour la production de sondes anticorps et d'étudier la réponse humorale contre les molécules recombinantes produites, et à des approches de biologie moléculaire qui ont abouti à l'obtention de clones contenant une partie du gène codant pour l'antigène P30 et qui ont permis d'étudier la production et l'expression de protéines recombinantes.

1. L'ANTIGENE P30

Différentes études ont montré l'existence d'une molécule de masse moléculaire apparente située entre 27 et 35 kDa appelée P30, représentant l'antigène majeur de surface de *Toxoplasma gondii* (HANDMANN and REMINGTON, 1980b ; SETEI et al., 1980 ; JOHNSON et al., 1981b ; KASPER et al., 1983 ; RODRIGUEZ et al., 1985 ; COUVREUR et al., 1988).

Les résultats présentés dans ce travail montrent, par analyse électrophorétique bidimensionnelle de l'antigène P30 purifié par HPLC que deux molécules de

même poids moléculaire apparent (30 kDa) mais de pI voisins (7,84 et 8,07) sont observées.

Après immunoprécipitation des produits du marquage métabolique avec des sérums de lapin hyperimmun, des sérums de lapin anti-P30 (purifiée par immunoabsorption ou par HPLC) et par l'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54, on observe la reconnaissance des deux mêmes molécules trouvées dans l'antigène P30 purifié par HPLC. La présence de plusieurs molécules dans l'antigène P30 a également été démontrée par HANDMAN et REMINGTON (1980b) et KASPER (1987).

La reconnaissance des deux molécules de l'antigène P30 par l'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54 démontre la présence d'épitopes identiques sur ces deux molécules. Ceci indique qu'il s'agit probablement d'une même partie peptidique avec différents degrés de glycosylation ou de phosphorylation, quoique de tels "processings" post-traductionnels restent à étudier. Ce polymorphisme pourrait également être attribué à une différence de quelques acides aminés dans la composition de la partie peptidique ou à la formation de ponts disulfures dans une proportion telle qu'il pourrait y avoir un changement de pI mais pas de poids moléculaire apparent de la molécule.

La présence de ces deux molécules pourrait expliquer l'observation de RODRIGUEZ et al. (1985) qui ont montré par un test "double-site" avec l'anticorps

monoclonal anti-P30 G5-54 que l'antigène P30 contient une région immunodominante composée de deux ou plusieurs épitopes identiques.

2. LE TRAVAIL DE CLONAGE

L'obtention des produits de traduction à partir de l'ARN de *T. gondii* a nécessité le recours à plusieurs méthodes différentes d'obtention du parasite, puis de stimulation *in vitro* des tachyzoïtes. Néanmoins, le produit de la traduction de l'antigène P30 à partir d'un système de traduction *in vitro* de réticulocytes de lapin n'a pas pu être détecté par nos sondes anticorps.

PRINCE *et al.* (1985) ont traduit l'ARNm de *T. gondii* en utilisant un extrait de germe de blé comme système de traduction. Ils ont démontré la présence d'un produit de traduction antigénique majeur de 24 kDa et ont suggéré qu'il pourrait s'agir de la partie protéique de l'antigène majeur de surface, P30. Néanmoins, nous savons aujourd'hui que le produit de traduction de 24 kDa correspond en réalité à la protéine native excrétée-sécrétée de 23 kDa clonée dans notre laboratoire (CESBON-DELAUW *et al.*, 1988).

Pour ce qui concerne l'absence d'un produit de traduction correspondant à l'antigène P30, nous pensons que l'ARN messager codant pour cette molécule (dans nos conditions d'isolement des ARNs) est très minoritaire. En effet, nous avons pu isoler après un criblage de

500.000 recombinants qu'un seul clone exprimant une partie de cet antigène. D'autre part, il a été démontré dans notre travail que l'ARN messager codant pour l'antigène P30 ne pouvait être mis en évidence par les techniques de "Northern Blot" classiques. Cette observation est contraire à celle de BOOTHROYD (1988) (communication personnelle) qui affirme avoir isolé de nombreux clones correspondant à l'antigène P30, à partir d'une banque d'ADNc (1/200 recombinants).

Les produits issus de notre travail de clonage, c'est-à-dire soit la protéine recombinante de 6 kDa, soit le peptide synthétisé à partir de la séquence nucléotidique, sont reconnus par des sérums anti-*T. gondii*. De plus, les anticorps produits contre ces molécules sont détectés à condition d'utiliser des techniques très sensibles où l'antigène se trouve dans sa forme native et où une très petite quantité d'anticorps suffit pour le mettre en évidence. Ainsi, les techniques d'immunofluorescence indirecte et de microscopie électronique nous ont permis d'observer une reconnaissance de la surface des tachyzoïtes, ce qui correspond à la localisation de l'antigène P30 natif. Là encore, nos observations sont contraires à celles de BOOTHROYD (1988) (communication personnelle) en ce qui concerne le sérum produit contre sa protéine de fusion qui ne reconnaît pas la surface des tachyzoïtes.

La difficulté dans la détection de ces anticorps s'explique dans le cas de la protéine de fusion par le fait qu'il y a également production d'une quantité importante d'anticorps contre la β -galactosidase et contre le lysat bactérien d'*E. coli* contaminant.

Ceci souligne la nécessité d'utiliser des vecteurs plus performants pour l'expression des protéines de fusion comme par exemple le vecteur développé par la Société Transgène qui contient une protéine exprimée fusionnée avec les 14 premiers acides aminés de la protéine phagique CII sous le contrôle du promoteur P_L. Ceci diminue les encombrements stériques provoqués par une protéine de fusion trop grande qui devient la réponse immune envers une protéine recombinante très minoritaire. L'efficacité de ce système dans le cas de la protéine recombinante P24 a été démontrée par M.F. CESBRON-DELAUW (1988) (communication personnelle) dans notre laboratoire. En ce qui concerne la purification de la protéine de fusion du lysat bactérien, d'autres vecteurs peuvent être employés. Dans le vecteur PRITT11, la β -galactosidase est remplacée par la protéine A dans la protéine de fusion qui pourra être purifiée sur colonne de IgG Sépharose (Pharmacia). Le vecteur PMS code pour une β -galactosidase active, qui peut être purifiée à partir d'une colonne greffée avec un inhibiteur de β -galactosidase.

Dans le cas des peptides de synthèse, la difficulté de production d'anticorps plus facilement détectables pourrait s'expliquer par le fait qu'il peut y avoir une différence de présentation entre les épitopes du peptide de synthèse conjugué ou non à une protéine porteuse et de l'antigène natif. Un ensemble de peptides différents est envisageable pour la production d'anticorps.

L'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54 ne reconnaît pas les épitopes présentés dans la protéine recombinante ni dans le peptide synthétisé. Le fait que ce même anticorps ne reconnaît pas par la technique d'immunoélectrotransfert la protéine native après réduction au β -mercaptoéthanol suggère que cet anticorps est dirigé contre un épitope conformationnel. Il n'est donc pas surprenant que cet anticorps monoclonal ne puisse pas reconnaître la protéine de fusion ni le peptide de synthèse. D'une part, l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal pourrait ne pas être présent chez la protéine de fusion et le peptide, et d'autre part, s'il existe, il pourrait être présenté sous une configuration très différente de celle existant dans l'antigène natif.

La séquence nucléotidique du clone exprimant une partie du gène codant pour l'antigène P30 est correcte et présente chez *T. gondii* car les résultats d'hybridation soit avec l'insert de 164 pb marqué, soit

avec l'oligonucléotide synthétisé à partir de cette séquence reconnaissent l'ADN de *T. gondii* dans des conditions très drastiques de lavage.

Dans le but de l'obtention d'un clone plus complet, le recours à une banque génomique de *T. gondii* a été nécessaire et nous a permis de progresser dans le séquençage du gène codant pour l'antigène P30. Le clone de 1600 pb obtenu à partir de la digestion complète de l'ADN de *T. gondii* suggère que le gène codant pour l'antigène P30 est présent dans une seule copie. Il reste à déterminer si tout le gène codant pour cet antigène est présent dans ce fragment de 1600 pb. Il reste également à vérifier la présence d'introns dans ce gène. Par ailleurs, le clonage des gènes codant pour l'alpha et la bêta-tubuline de *T. gondii* par NAGEL et BOOTHROYD (1988) a permis de démontrer la présence d'introns multiples avec des signaux de sites d'épissage 5' et 3' conservés. Ceci indique que le clonage de protéines de *T. gondii* utilisant des banques construites à partir de l'ADN génomique est, bien qu'envisageable, beaucoup plus aléatoire que par exemple dans le cas de *Plasmodium falciparum*, pour lequel les rares introns ont toujours été uniques pour un gène donné et situés près de l'extrémité 5' du gène (FARANDO et al., 1986).

Quelques acides aminés de la partie N-terminale de l'antigène P30 ont été déterminés par A. TARTAR (1988)

(communication personnelle) il faudra trouver la séquence nucléotidique correspondante à ce peptide dans le clone génomique.

3. APPLICATIONS DE NOTRE TRAVAIL

Il est maintenant clairement établi par des tests E.L.I.S.A. (enzyme-linked immunosorbent assay) que tous les sujets atteints d'une toxoplasmose récente ou plus lointaine ont des taux significatifs d'anticorps anti-P30 d'isotypes IgG et/ou IgM (REMINGTON *et al.*, 1968 ; CAMARGO *et al.*, 1976, 1978 ; NAOT and REMINGTON, 1980 ; DESMONTS *et al.*, 1981 ; RODRIGUEZ *et al.*, 1985 ; SANTORO *et al.*, 1985 ; CESBRON *et al.*, 1985).

Le développement d'un test diagnostique d'immunocapture des anticorps de classe IgM dirigés contre l'antigène P30 présents dans tous les sérums de sujets atteints de toxoplasmose aiguë a été réalisé dans notre laboratoire par CESBRON *et al.* (1985). Ce test, très important chez les femmes enceintes à risque de toxoplasmose congénitale, est commercialisé sous le nom de PLATELIA-TOXO IgM par Diagnostics Pasteur (France) (Fig. 37).

Les produits de clonage de l'antigène P30 pourraient, après un marquage enzymatique direct, être utilisés dans un test diagnostique de nouvelle génération. Ce test, basé également sur l'immunocapture des IgM sériques, serait d'une part plus fiable et

spécifique, permettant de s'affranchir des nécessités de préparation d'un extrait antigénique de toxoplasmes et de production de l'anticorps monoclonal (Fig. 38).

Récemment, dans notre laboratoire, DECOSTER *et al.* (1988) ont décrit l'existence d'anticorps de classe IgA dirigés contre l'antigène P30 et démontré la possibilité d'utilisation de ces anticorps comme marqueurs de toxoplasmose aiguë et congénitale. A la suite de ces travaux, un test d'immunocapture IgA basé sur le test d'immunocapture IgM de CESSBROUN *et al.* (1985) sera développé. Là aussi, les produits du clonage de l'antigène P30 seraient utiles pour les raisons citées ci-dessus (Fig. 38).

L'association de nos différentes recherches pourra servir à l'amélioration de la fiabilité des tests diagnostiques de la toxoplasmose chez la femme enceinte, indispensable pour éviter d'une part les graves conséquences d'une toxoplasmose congénitale chez le fœtus et le nouveau-né, et d'autre part les avortements thérapeutiques non nécessaires, basés sur des indications insuffisamment établies.

La recherche d'un vaccin contre la toxoplasmose est une autre préoccupation majeure. Les propriétés potentiellement protectrices de l'antigène P30 ont déjà été démontrées premièrement chez la souris par SHARMA *et al.* (1984) et dans notre laboratoire par SANTORO *et al.* (1985) qui ont démontré l'augmentation du temps



Des anticorps anti-IgM humains sont adsorbés à la plaque .(Δ)



Le sérum humain est ajouté. Les anticorps d'isotype IgM adhèrent aux anti-IgM. (▼)



Addition de l'extrait antigénique de T.gondii contenant l'antigène P30.(▼) Les antigènes reconnus par les IgM anti-toxoplasme (notamment l'antigène P30) sont retenus.



Addition de l'anticorps monoclonal G5.54 anti-P30 conjugué à un enzyme qui se fixe de façon spécifique sur l'antigène P30.(▼^E)



Addition du substrat de l'enzyme (:•:), production d'une réaction colorée et lecture au spectrophotomètre.

FIGURE 37 : TEST DIAGNOSTIQUE DE LA TOXOPLASMOSE AIGUE (PLATELIA TOXO IgM-DIAGNOSTICS PASTEUR).



Des anticorps anti-IgM (ou anti-IgA) humains sont adsorbés à la plaque.(Δ)



Le sérum humain est ajouté. Les anticorps d'isotype IgM (ou IgA) adhèrent aux anti-IgM (ou anti-IgA).(▼)



Addition de la protéine recombinante P30 ou des peptides de synthèse conjugués à un enzyme(▼^E) qui se fixent de façon spécifique sur les IgM (ou IgA) anti-P30 présents dans le sérum.



Addition du substrat de l'enzyme (:•:), production d'une réaction colorée et lecture au spectrophotomètre.

FIGURE 38 : TEST DIAGNOSTIQUE DE NOUVELLE GENERATION POUR LA TOXOPLASMOSE (DETECTION D'IgM OU D'IgA) UTILISANT LA PROTEINE RECOMBINANTE P30 OU LES PEPTIDES DE SYNTHESE.

de survie de rats athymiques (Nu/Nu) qui ont reçu un transfert passif d'anticorps monoclonal anti-P30 G5-54 avant l'infection par *T. gondii*. De plus, F. SANTORO et D. DESLÈS (communication personnelle) ont protégé de façon significative la souris Balb/C contre une infection par *T. gondii*, après l'immunisation préalable des souris avec 50 µg d'antigène P30 purifié par immunoabsorption.

Après confirmation des propriétés immunoprophylactiques de P30, l'utilisation des produits du clonage de cet antigène pourrait être envisagée lors de l'élaboration d'un vaccin anti-*T. gondii*.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos études concernaient le clonage et le séquençage du gène codant pour l'antigène majeur de surface des tachyzoïtes P30.

Les travaux expérimentaux ont abouti aux résultats suivants :

- l'obtention de l'antigène P30 purifié
- l'observation que l'antigène P30 est constitué de deux molécules de même poids moléculaire et de pI voisins
- la production de sérums de lapin polyclonaux monospécifiques anti-P30
- la construction des banques d'ADNc et génomique de *T. gondii*
- l'obtention d'un clone d'ADNc exprimant une partie de l'antigène P30
- l'obtention d'une protéine de fusion contenant un (des) épitope(s) de l'antigène P30 reconnu par des sérums humains d'infection
- l'obtention de sérums dirigés contre cette protéine de fusion qui reconnaissent la surface des tachyzoïtes
- le séquençage d'une portion du gène codant pour l'antigène P30
- la synthèse d'un peptide également reconnu par des sérums humains d'infection

- l'obtention d'un clone génomique contenant une copie plus complète du gène codant pour l'antigène p30.

L'utilisation soit de la protéine recombinante obtenue chez *E. coli*, soit du peptide de synthèse dans des tests diagnostiques de la toxoplasmose peut être envisagée. Les perspectives issues du présent travail concernent d'une part l'amélioration des tests sérologiques de la toxoplasmose, et d'autre part la mise en évidence directe des parasites par une nouvelle génération de tests diagnostiques basés sur les techniques d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes oligonucléotidiques.

La caractérisation de la molécule P30 par microséquençage de ses acides aminés constitutifs et par séquençage complet du gène codant pour cet antigène devra être poursuivie en vue d'établir une cartographie peptidique complète des épitopes immunodominants de l'antigène P30.

L'utilisation des peptides ou protéines recombinantes issus de cette caractérisation dans les tests de diagnostic (notamment le test d'immuno-capture mis au point dans notre laboratoire) nécessitera avant tout une analyse fine de la reconnaissance de ces produits par les anticorps surtout de classe IgM et de classe IgA. Ainsi, ces peptides pourraient être employés dans la fabrication d'un réactif plus fiable

et moins coûteux pour le diagnostic sérologique de la toxoplasmose.

Une technologie nouvelle d'amplification de séquences d'ADN, la réaction en chaîne de l'ADN polymérase (PCR) est envisagée actuellement (WONG et al., 1987). Par cette méthode, il sera possible de détecter la présence d'ADN provenant de *T. gondii* parmi l'ADN extrait de cellules infectées, même à très faible taux, en utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques, comme celle déterminée par notre travail. Cette technique devrait permettre le diagnostic précoce et spécifique d'une toxoplasmose active chez le fœtus atteint d'une toxoplasmose congénitale et chez les malades atteints de SIDA, pour lesquels le diagnostic sérologique n'est pas applicable.

Les propriétés immunoprophylactiques de cette molécule ne sont pas à exclure. Les produits du clonage de l'antigène P30 pourront également être employés dans plusieurs modèles d'immunisation expérimentaux en vue de la détermination de leur pouvoir vaccinant.

APPENDICE TECHNIQUE

1. PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. EXTRACTION DES ANTIGENES MEMBRANAIRES DE TACHYZOITES

La souche virulente RH de *Toxoplasma gondii* est maintenue par des passages bihebdomadaires dans la souris Swiss. Les parasites sont récoltés à partir du péritoine des souris infectées trois jours auparavant. Ils sont passés sur filtres de polycarbonate, 3 µm (Nucleopore) et lavés trois fois avec du PBS (tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM). Le culot final est remis en suspension avec du PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,2) contenant 0,5 % de Nonidet NP40 (Sigma) et 100 U/ml d'aprotinine (Sigma). Après une incubation pendant 1 h à 4°C, l'extrait est centrifugé à 10.000 g pendant 20 min. à 4°C. Le surnageant est utilisé par la suite comme source d'antigène P30.

1.2. EXTRACTION DES ANTIGENES MARQUES DE TACHYZOITES

Après marquage, le culot de tachyzoïtes est repris dans une solution de SDS 2 %, Tris 5 mM, pH 7.2 et chauffé à 100°C pendant 3 min. Les antigènes extraits sont dilués avec du TNTE (Tris 5 mM pH 7,2, NaCl 0,15 M, Triton 1,7 %, EDTA 2 mM) jusqu'à une concentration finale de SDS de 0,3 %. Cette préparation est utilisée par la suite dans la technique d'immunoprécipitation.

1.3. PURIFICATION DE L'ANTIGENE P30 PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE RESOLUTION (HPLC)

L'extrait total de tachyzoïtes (500 µl) est injecté sur une colonne Vydac C₁₈ (4,6 x 250 mm) avec une porosité de 300 Å et des microbilles de 5 µm. L'élution est effectuée avec un mélange de CH₃CN/H₂O/CF₃COOH (5/95/0,05 par volume) pendant 12 min., puis pendant 180 min. avec un gradient linéaire 5-80 % de CH₃CN, cette concentration maximale étant maintenue pendant 5 min. Le pic contenant l'antigène P30 est élué à une concentration en CH₃CN de 34,4 % après 90 min.

1.4. PURIFICATION DE L'ANTIGENE P30 PAR CHROMATOGRAPHIE D'IMMUNOAFFINITE

L'antigène P30 a été purifié exactement comme décrit par SANTORO *et al.* (1985). L'anticorps monoclonal (mAb) est fixé au support d'affinité (Protéine A-Sépharose CI-4B, Pharmacia) activé par la glutaraldéhyde (Boehringer) suivant les recommandations du fabricant. Brièvement, l'adsorbant d'affinité (1 g) est remis en suspension dans du NaCl 0,9 % (5 ml) contenant le mAb à 20 mg/ml. Après une incubation de 4 h à température ambiante sous agitation, le gel est transvasé dans la colonne chromatographique et lavé avec du NaCl 1,5 % jusqu'à ce que la D.O. de l'éluat

soit inférieure à 0,005. Les groupements aldéhydes libres résiduels sont saturés avec de l'éthanolamine-HCl 0,3 M (pH 7,5) pendant 1 h. Après des lavages successifs avec 50 ml de NaCl 0,9 %, 50 ml de glycocolle 0,5 M, pH 3,75 et 100 ml de NaCl 0,9 %, l'immunoabsorbant est stocké à 4°C.

La purification de la P30 est effectuée pendant une nuit à 4°C en faisant circuler 10 ml d'un extrait total de tachyzoïtes de *T. gondii* (200 mg) sur la colonne d'immunoabsorbant en circuit fermé avec un débit de 2 ml/h. Le système chromatographique est ensuite ouvert et la colonne est lavée avec du NaCl 0,9 %. L'antigène lié spécifiquement à l'immunoabsorbant est élué à l'aide de la triéthylamine 0,1 M (pH 11,5) et neutralisé rapidement avec du HCl 1M. Le matériel est dialysé pendant 16 h dans 1 l de PBS pH 7,2. La P30 pure est stockée à -70°C.

1.5. OBTENTION DES ARN MESSAGERS DE TACHYZOÏTES

L'ARN total est d'abord extrait suivant la méthode d'AUFFRAY et ROUGEON (1980). Les tachyzoïtes sont lysés par addition d'une solution de LiCl 3M, Héparine 200 µg/ml, acétate de sodium 10 mM pH 5, SDS 0,1 %.

Après homogénéisation dans un appareil de Potter-Elvehjem et conservation toute la nuit à 4°C pour précipiter les ARNs, le lysat est centrifugé à 16.300 g pendant 40 min. à 4°C. Le culot est lavé deux fois par

remise en suspension dans une solution de LiCl 4M, Urée 3M puis de nouveau centrifugé à 16.300 g pendant 40 min. à 4°C. Le culot est ensuite dissous dans de l'eau, la solution est amenée à 0,1 M en acétate de sodium pH 5 et à 0,1 % en SDS, et extraite successivement avec un volume de phénol saturé en eau et un volume de phénol-chloroforme. La phase aqueuse est finalement amenée à 0,2 M en acétate de sodium pH 5, puis l'ARN est précipité par 2,5 volumes d'éthanol à -20°C pendant une nuit.

Les ARNs messagers poly A⁺ sont séparés de l'ARN total par deux chromatographies successives sur oligo (dT) cellulose, (Type 7, Pharmacia) selon ARNEMANN *et al.* (1977).

1.6. OBTENTION DE L'ADN DE TACHYZOITES

L'ADN de tachyzoïtes est obtenu suivant la méthode de JOHNSON *et al.* (1986a). 1 à 5 x 10⁹ tachyzoïtes sont lysés dans 10 ml d'un tampon TRIS-HCl pH 8 7,5 mM, EDTA 7,5 mM, SDS 1 %, protéinase K 20 µg/ml pendant 3 h à 50°C.

2 ml de perchlorate de sodium 6M sont additionnés et le DNA est obtenu après extraction avec une solution de phénol/chloroforme/alcool-isoamylique suivi d'une précipitation à l'éthanol.

L'ADN de tachyzoïtes est séparé de l'ADN de souris contaminant après ultracentrifugation à 18 000 g

pendant 16 h à 20°C dans un gradient isopycnique de Chlorure de Césium contenant un colorant fluorescent (HOECHST 33258). L'ADN de *T. gondii* se distingue comme une bande en-dessous de la bande d'ADN de souris.

1.7. SOUCHES BACTERIENNES

La souche utilisée comme hôte pour le phage lambda gt11 est *E. coli* Y1090 (*E. coli* lac U169 proA⁺ lon ara D139 strA sup F [trpC22 ::Tn10] (pMC9)).

Pour l'obtention de souches lambda gt11 lysogènes, on utilise *E. coli* Y1089 (*E. coli* lac U 169 pro A⁺ lon ara D139 str A hfl A 150 [chr::Tn10] (pMC9)).

La souche *E. coli* JM107 (*E. coli* lacpro, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17, sup E44, rel A1, F', tra D36, pro AB⁺, lac 1^o M15) a été choisie pour la transformation par les plasmides pUC13 et pUC19.

La souche *E. coli* C600 hfl : sup E44, thi-1, leuB6, lac Y1, lon A21, thr 1, hfla A150, Chr : Tn10 a été choisie pour l'obtention de souches lambda gt10.

1.8. VECTEURS DE CLONAGE

Le phage lambda gt10 (λ srl λ 1^ob527srl λ 3^oimm434 (srl 434⁺) srl λ 4^osrl λ 5^o) est utilisé comme vecteur pour la construction de la banque génomique.

Pour la construction de la banque de cDNA, le phage lambda gt11 (lac 5 (Shind III 2-3) srl λ 3^ocI857 srl λ 4^o nin 5 srl λ 5^o Sam 100) a été choisi.

Pour l'obtention de l'ADN monocaténaire, pour le séquençage, les bactériophages M13 mp10, M13 mp11, M13 mp18, et M13 mp19 ont été utilisés.

Pour l'amplification des fragments clonés, les plasmides pUC13 (lac Z Amp^r pMB1) et pUC19 (lacZ Amp^r pMB1) ont été utilisés.

1.9. ENZYMES DE RESTRICTION

Les endonucléases de restriction, l'ADN ligase du phage T4, l'ADN polymérase de Klenow, l'ADN polymérase I, la Séquenase (ADN Polymérase de T₇), la T₄ polynucléotide kinase, la désoxyribonucléase libre d'activité ribonucléasique, les ribonucléases, la protéinase K et le lysozyme proviennent de chez Amersham, Appligène, Biolabs, Boehringer, BRL ou Touzart Matignon, et sont utilisés selon les recommandations prescrites par le fabricant.

2. SYNTHESE DE PEPTIDES

Le peptide correspondant à la séquence C-terminale du clone est synthétisé en phase solide (MERRIFIELD, 1963) et les groupements actifs sont protégés. Après clivage avec du HF, le peptide est purifié par gel filtration sur Fractogel TSK-HWUO-S⁻ (Merck) en présence de HCl pH2 puis lyophilisé. La pureté du peptide est vérifiée par chromatographie en couche mince et par HPLC en phase

inverse. L'identité du peptide est vérifiée par analyse des acides aminés après hydrolyse acide.

Le peptide est conjugué à l'albumine bovine avec de la glutaraldéhyde : le peptide (1,5 μ mole) est dissous avec la protéine porteuse (2 mg) dans un tampon phosphate de sodium pH 7 et le pH est ensuite ajusté à 8 avec du bicarbonate de sodium. Une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % (20 μ l) est ajoutée quotidiennement pendant trois jours sous agitation constante. Après quatre jours, le mélange est dialysé contre du NaCl 0,15 M.

3. SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES

La synthèse des sondes oligonucléotidiques a été réalisée sur l'appareil BIOSEARCH DNA SYNTHESIZER 8600 utilisant la méthode aux cyanoéthyl-phosphoramidines (GANT, 1984).

L'oligonucléotide synthétisé est séparé de ces contaminants sur gel de polyacrylamide-urée (cf. 5.1.3) après élimination du groupe diméthoxytrityl en milieu acétique. L'oligonucléotide est visualisé sous ultraviolets et ensuite extrait de l'acrylamide par trituration et agitation pendant 16 h dans du tampon TrisHCl 0,1 M, EDTA 50 mM pH 8. Le matériel est dialysé, précipité à l'éthanol et conservé à -20°C.

4. TECHNIQUES DE MARQUAGE

4.1. MARQUAGE METABOLIQUE PAR LA ³⁵S METHIONINE

Après filtration sur membrane Nucleopore (3 µm) et lavages en milieu RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute), les tachyzoïtes sont mis en suspension, à raison de $12 \cdot 10^8$ tachyzoïtes/ml, dans du milieu RPMI 1640 sans méthionine ni cystéine, contenant 10 % de sérum décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min., dialysé une nuit à 0°C contre une solution de NaCl 9 % et filtré sur membrane Millipore (0,22 µm).

La suspension de tachyzoïtes est répartie sous un volume de 1,5 ml dans des tubes à hémolyse placés à 37°C et soumis pendant 30 min. à une agitation douce.

On ajoute ensuite au milieu de cette culture la méthionine marquée (225 µCi par tube) et on incube à nouveau à 37°C sous agitation douce. Au bout de 1 h, on ajoute dans chaque tube 15 µl de méthionine et 15 µl de cystéine froide avant de replacer les tubes à 37°C sous agitation pendant 1 h 30 min.. Après centrifugation à 3000 g pendant 10 min., on récupère les culots contenant les parasites entiers et on les traite comme décrit précédemment (cf.1.2).

4.2. MARQUAGE DES ANTIGENES MEMBRANAIRES DE TACHYZOITES

PAR LE ^{125}I

La méthode de marquage utilisée est une modification de la méthode utilisant le IODOGEN décrite par HOWARD et al. (1978). Les tachyzoïtes sont lavés deux fois par du PBS 0,01 M pH 7,2.

On dissout 1 mg de IODOGEN (PIERCE Chemical Co.) dans 10 ml de chloroforme et on transfère 625 μl de cette solution dans un tube en verre. On évapore alors le solvant sous courant d'azote et on ajoute 10^8 tachyzoïtes dans 1 ml de PBS. Après 10 min. de contact à 4°C, on transfère le mélange dans un autre tube contenant du PBS 0,1 M, pH 7,2, NaI 10 mM pour arrêter la réaction. On lave ensuite trois fois les tachyzoïtes en PBS 0,1 M, pH 7,2, NaI 100 mM. Les antigènes sont ensuite extraits comme décrit précédemment (cf.1.2).

4.3. MARQUAGE D'UN FRAGMENT D'ADN (INSERT) PAR LE α ^{32}P

Le système de marquage à partir d'amorces d'ADN est utilisé (Amersham). Des hexamères d'ADN, s'hybrident le long de la sonde dénaturée servant d'amorce à la fraction Klenow de l'ADN polymérase I en présence des 4 nucléotides, dont le dCTP est marqué au $\alpha^{32}\text{P}$ (3000 Ci/mme). 25 ng d'ADN et 50 μCi de nucléotides radioactifs suffisent pour un temps de réaction de 5 h à température ambiante. L'activité

spécifique du marquage obtenu après précipitation à l'éthanol est d'environ 10^9 dpm/ μ g d'ADN. La sonde est dénaturée dans 1/10 volume NaOH 3M, 5 min., neutralisée avec 1/5 volume Tris-HCl pH 7,5 et 1/10 volume HCl 3M avant l'hybridation.

4.4. MARQUAGE D'UN OLIGONUCLEOTIDE PAR LE γ^{32} P

Cette méthode consiste à marquer au phosphore 32 l'extrémité 5' OH de l'ADN simple brin par transfert d'un γ phosphate de l'ATP (γ^{32} PATP) par la T4 Polynucléotide kinase. 15 pmol d'ADN, 15 pmol de γ^{32} ATP (5000 Ci/mmol) et 9U de T4 Polynucléotide kinase sont mis en contact dans le tampon Tris HCl pH 7,5 60 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM dans un volume final de 20 μ l. Le mélange est placé à 37°C pendant 30 min. L'enzyme est ensuite inactivé à 65°C pendant 10 min.

1 μ l de matériel marqué est repris dans le tampon échantillon (cf.9.9.,A) et l'efficacité du marquage est vérifiée sur gel de polyacrylamide-SDS à 20 % (cf.5.1.1) dans le tampon TBE (cf.5.1.3) suivi par autoradiographie pendant 15 min. à température ambiante sans écrans.

5. TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES ET D'HYBRIDATION SUR MEMBRANE

5.1. ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

5.1.1. Electrophorèse monodimensionnelle :

La séparation des protéines est effectuée selon la méthode de tampons discontinus de LAEMMLI (1970) dans un gel homogène de polyacrylamide 13 % ou 8 % contenant 0,1 % de SDS dans du tampon Tris-HCl 0,375 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 125 mM à pH 6,8 contient 0,1 % de SDS. Chaque échantillon est solubilisé dans 30 μ l de tampon Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 3 %, glycérol 10 %, β -mercaptoéthanol 2,5 % (V/V), bleu de bromophenol 1 %. Le β -mercaptoéthanol est utilisé comme agent réducteur des ponts disulfures.

La migration dure de 16 à 18 h à 7 mA dans le tampon Tris glycine pH 8,3 contenant du SDS à 0,1 %.

5.1.2. Electrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle est effectuée selon la méthode de GARRELLS (1979). La focalisation isoélectrique est réalisée dans des tubes capillaires de diamètre 1,3 mm dans un gradient d'ampholines pH 3-10 (LKB). Les molécules sont séparées pour la 2ème dimension dans un gel de polyacrylamide 13 %

(cf.5.1.1). Dans cette technique, le gel de concentration est supprimé car il n'est pas utile, compte-tenu du faible diamètre des gels de première dimension.

5.1.3. Electrophorèse des chaînes d'ADN

L'électrophorèse des chaînes d'ADN pour le séquençage d'un clone selon la méthode de terminaison des chaînes (cf.9.9) est effectuée sur un gel homogène de polyacrylamide 6 %, urée 50 %, dans le tampon T.B.E. (TRIS-BASE 89 mM, Acide Borique, 89 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8.3).

Dans cette technique, les chaînes d'ADN monocaténaire dénaturées migrent en fonction de leur taille.

Les dimensions du gel sont de 40 x 33 cm et 0,4 mm d'épaisseur et l'électrophorèse est effectuée à 1.500-1900 V, 30-45 mA et 60 W pendant 4 h, dans le système BRL modèle S2.

Dans le système Applied Biosystem 370A, les dimensions du gel sont de 30 x 40 cm et 0,6 mm d'épaisseur et l'électrophorèse est effectuée à 2000 V, 25 mA et 21 W pendant 14 h.

5.2. IMMUNOELECTROTRANSFERT

Les composants d'un extrait-détergent sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Elles sont, ensuite, transférées

électrophorétiquement suivant la méthode décrite par TOWBIN *et al.* (1979) sur une membrane de nitrocellulose (14 x 16 cm) : deux feuilles de papier Whatman 3M (14 x 18 cm) ainsi que la feuille de nitrocellulose sont immergées quelques minutes dans le tampon de transfert (Tris 20 mM, glycine 150 mM et méthanol 20 %). Le gel est placé sur une feuille de papier Whatman 3M et mis en contact direct avec la feuille de nitrocellulose recouverte de la deuxième feuille de papier Whatman 3M. Le tout est placé dans un support plastique. L'ensemble est mis dans l'appareil de transfert de manière à ce que la membrane de nitrocellulose soit vers l'électrode positive. Le transfert est réalisé pendant 3 h à 60 V et 0,2 A à 4°C.

La membrane de nitrocellulose est découpée en plusieurs bandes ; les bandes contenant les marqueurs de poids moléculaires témoins précolorés sont conservées à part. Pour éviter les phénomènes d'adsorption non spécifique, les membranes sont saturées pendant 1 h en PBS 0,01 M, pH 7,4 contenant 5 % de lait écrémé (Gloria). Les bandes sont ensuite incubées avec les différents sérums dilués, pendant 2 h à 20°C ou une nuit à 4°C, puis lavées 4 fois pendant 10 min. en PBS, 0,01 M, Tween 20 0,05 % (PBS-Tween). Pour révéler les antigènes reconnus par des anticorps spécifiques, les bandes de nitrocellulose sont incubées

pendant 1 h à 20°C en présence de l'antisérum spécifique marqué à la peroxydase (Institut Pasteur Productions). Après 4 lavages en PBS-Tween, les bandes sont révélées en quelques minutes par la solution contenant le substrat enzymatique, 60 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 20 ml de méthanol froid et 80 ml de PBS 0,01 M pH 7,4, 100 µl d'H₂O₂ à 30 %.

Lors des réactions positives, apparaissent des bandes de couleur violet correspondant à l'antigène reconnu. Les membranes de nitrocellulose sont rincées à l'eau distillée et photographiées.

5.3. DOT IMMUNOASSAY

C'est une méthode plus rapide d'analyse d'un complexe antigénique.

Les échantillons contenant les antigènes sont déposés directement sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'une pipette.

Après séchage, les membranes sont saturées, incubées avec les différents sérums et révélées comme en 5.2.

5.4. DOT-BLOT D'ACIDES NUCLEIQUES

C'est une méthode rapide d'analyse qualitative et/ou quantitative de l'ADN ou de l'ARN.

Les échantillons d'ADN ou d'ARN, sont déposés directement sur une membrane de nitrocellulose à l'aide d'une pipette et ensuite dénaturés.

Après séchage, les membranes sont portées à 80°C pendant 2 h et sont traitées comme en 5.5.2. pour les dot-blot d'ARN, et comme en 5.5.3. pour les dot-blot d'ADN.

5.5. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE

5.5.1. Isolement de fragments d'ADN

La concentration du gel d'agarose varie de 0,6 à 2 %, selon la taille du fragment d'ADN à isoler. L'ADN est mélangé avec $\frac{1}{5}$ du volume de tampon échantillon (bleu de bromophénol 0,05 %, sucrose 50 %, phosphate de sodium 10 mM à pH 6,5), déposé sur le gel contenant du Bromure d'Ethidium (Br Et) (cf.7.3) et l'électrophorèse est effectuée dans du tampon Tris 4 mM, acétate de Sodium 2 mM, EDTA 0,2 mM, pH 7,9, entre 100 V et 20 V pendant 1 h à 16 h.

5.5.2. Electrophorèse de transfert d'ARN (Northern blot)

La technique utilisée est celle décrite par THOMAS (1980) : 10 µg d'ARN total de tachyzoïte ont été dénaturés en présence de glyoxal et 50 % de DMSO dans les conditions suivantes : 5 µl de solution d'ARN total sont incubés 1 h à 50°C en présence de 4 µl de glyoxal

désionisé (par passage sur résine AG 501-X8 D de Bio-rad) ; de 3 µl d'une solution de phosphate de sodium 10 mM et de 12 µl de DMSO. Les échantillons sont refroidis dans la glace, puis 5 µl de tampon d'échantillon sont ajoutés. Les ARNs de chaque échantillon sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % à 50 V pendant 4 à 5 h. Le tampon utilisé pour la migration est du phosphate de sodium 10 mM à pH 6,5. L'électrophorèse étant terminée, l'ARN est transféré sur membrane de nitrocellulose pendant 16 h selon la méthode de SOUTHERN (1975). Ce transfert est réalisé en tampon SSC x 20 (SSC x 1 NaCl 0,15 M, citrate de trisodium 0,015 M). La membrane de nitrocellulose est rincée dans du SSC x 2, séchée et portée à 80°C pendant 2 h.

Durant cette étape, la plupart du glyoxal est déplacée. La membrane ainsi traitée est prête pour les étapes de préhybridation et d'hybridation. Le tampon de préhybridation comprend : 50 % de formamide, du SSCx5 ; du phosphate de sodium 50 mM à pH 6,5 ; 12 µg/ml d'ADN de sperme de hareng et de la solution de Denhardt's x 10 (sérumalbumine bovine 0,2 %, ficoll 0,2 %, polyvinylpyrrolidone 0,2 %). La membrane de nitrocellulose est incubée en présence de ce tampon, 3 h à 42°C dans un sachet plastique.

Lors de l'hybridation, on utilise le même tampon auquel la sonde radioactive dénaturée 2 min. à 100°C est ajoutée. La durée d'hybridation est de 24 h à 42°C.

Après ces étapes, des lavages (20 min. à 60°C) sont nécessaires afin d'éliminer les réactions d'hybridation non spécifique. Durant ces lavages, la concentration en sels est progressivement abaissée.

- * 3 lavages dans du SSCx2 et du SDS 0,1 %

- * 2 lavages dans du SSCx1 et du SDS 0,1 %

- * 2 lavages dans du SSCx0,2 et du SDS 0,1 %

La membrane encore humide, entourée d'un film plastique, est exposé à -70°C en autoradiographie (cf.6).

5.5.3. Electrophorèse de transfert d'ADN

(Southern Blot)

Les fragments de restriction, obtenus après digestion de l'ADN par des endonucléases, sont séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose selon 5.3.1.

Après l'électrophorèse, le gel est immergé durant 60 min. dans un tampon de dénaturation (NaOH 0,2 M, NaCl 0,6 M). Le gel est ensuite immergé pendant 45 min. dans un tampon de neutralisation (Tris HCl 1M pH 7,4, NaCl 0,6 M). Une membrane de nitrocellulose, préalablement trempée dans du SSC 20 x est ensuite déposée sur gel. L'ADN est transféré sur cette membrane pendant 16 h, selon la méthode de SOUTHERN (1975). Les

Le gel est coloré selon la méthode de MORRISSEY (1981). Le gel est trempé successivement pendant

D'ARGENT

7.1. COLORATION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE AU NITRATE

7. COLORATION DES GELS

Tous les gels ou membranes de nitrocellulose contenant des échantillons radioactifs sont exposés sur des films X-OMAT AR5 KODAK (Eastman Kodak, Co) entre deux écrans renforceurs (Dupont de Nemours). Le temps d'exposition varie d'un à 8 jours à -70°C.

6. AUTORADIOGRAPHIE

membranes sont rincées dans une solution de SSC x 2, séchées et portées à 80°C pendant 2 h. Après une préhybridation de 4 h à 65°C, dans le milieu d'hybridation (SSC x 6, sérumalbumine bovine 0,1%, polyvinylpyrrolidone 0,1%, Ficoll 0,1%), les membranes sont placées à 65°C pendant 16 h à 48 h dans des sacs en plastique soudés contenant un volume minimum de ce milieu, 1,2 µg/ml d'ADN de sperme de hareng et la sonde marquée au $\alpha^{32}P$, dénaturée préalablement par une incubation de 10 min. à 100°C. Après hybridation, les membranes sont lavées à 65°C avec une solution de SSC x 0,1. La membrane, encore humide, entourée d'un film plastique, est exposée à -70°C en autoradiographie (cf. 6).

antérieurement.

Le gel est ensuite photographié ou séché comme décrit
solution de 8 % d'acide acétique, et 20 % de méthanol.
d'acide acétique. La décoloration est faite dans une
bleu de Coomassie R-250 (Merck), 50 % de méthanol, 8 %
Le gel est coloré dans une solution à 0,04 % de

COOMASSIE

7.2. COLORATION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE AU BLEU DE

photographié et séché par évaporation sous vide.
dans une solution de carbonate de Sodium 0,03 %,
Le gel lavé à l'eau déminéralisée est conservé
une solution d'acide citrique 2,3 M pendant 10 min.

Le développement de la coloration est arrêté dans
contenant du Formaldéhyde 0,018 %.
développée dans une solution de carbonate de Sodium 3 %
dans de l'eau déminéralisée, la coloration est
Nitrate d'Argent 0,1 % pendant 30 min. Après rinçage
30 min. Le gel est ensuite trempé dans une solution de
réduites dans une solution de DTT à 5 µg/ml pendant
l'eau déminéralisée pendant 16 h. Les protéines sont
Glutaraldéhyde 10 %. Ensuite, le gel est rincé dans de
Méthanol 5 %, Acide Acétique 7 % ; Fixateur 3 :
Méthanol 50 %, Acide Acétique 10 % ; Fixateur 2 :
30 min. dans les solutions suivantes : Fixateur 1,

7.3. COLORATION DES GELS D'AGAROSE AU BROMURE D'ETHIDIUM (BrEt)

Le gel est coloré soit après immersion dans une solution à 0,5 µg/ml de BrEt, soit par incorporation de la même quantité de BrEt directement à l'agarose chaude avant la gélification.

8. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

8.1. PREPARATION DES SERUMS D'ANIMAUX

8.1.1. Sérum anti-*T. gondii*

Le sérum de lapin hyperimmun est produit par immunisation avec un homogénat de tachyzoïtes par la méthode de VAITUKAITIS *et al.* (1971).

8.1.2. Sérum anti-P30

L'immunisation de lapins avec 150 µg de l'antigène P30, purifié soit par immunoabsorption, soit par HPLC, est réalisée selon la technique de VAITUKAITIS *et al.* (1971). Une injection de rappel de 30 µg est effectuée un mois plus tard par voie intramusculaire.

8.1.3. Sérum anti-protéine de fusion

Des sérums dirigés contre la protéine de fusion sont obtenus en injectant par voie sous-cutanée les lysats bactériens induits par les phages lysogènes, à des lapins en présence d'adjuvant complet de Freund. Des rappels sont réalisés toutes les deux semaines avec le même matériel par voie intramusculaire.

8.1.4. Sérum anti-peptide

Les sérums de lapin et de souris anti-peptide sont obtenus en injectant (comme décrit cf.8.1.3.), 50 µg de peptide synthétisé correspondant à la séquence C-terminale du clone (cf.2).

8.2. PREPARATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-P30

Des hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux anti-P30 ont été produits chez la souris dans notre laboratoire par RODRIGUEZ (1984). Parmi ces hybridomes, nous avons utilisé le clone G5-54 produisant un anticorps monoclonal d'isotype IgG2b.

8.3. SÉRUMS HUMAINS

Les sérums humains utilisés pour réaliser nos expériences proviennent du Laboratoire Saint-Camille, à Lille. Il s'agit de sérums de phase aiguë, subaiguë, chronique et sains.

8.4. REACTION D'IMMUNOFLOUORESCENCE INDIRECTE (IFI)

Des toxoplasmes préalablement séchés sur lames et conservés par congélation à -20°C sont fixés dans l'acétone à -20°C pendant 10 min. Après incubation avec des sérums dilués pendant 30 min. à 37°C, ces lames sont rincées en PBS et de nouveau incubées 30 min. à 37°C avec une solution contenant l'antisérum spécifique marqué à la fluorescéine (Institut Pasteur Production)

et du Bleu-Evans au 1/10.000e. Après un lavage de 10 min. à l'obscurité par du PBS, les lames sont observées au microscope à fluorescence. Les photographies sont prises sur film Kodak Ektachrome 400.

8.5. IMMUNOPRECIPITATION

8.5.1. Formation d'immuncomplexes

Les immuncomplexes sont obtenus, après une incubation d'une nuit à 4°C des protéines solubilisées de chacun des antigènes marqués (environ 100.000 cpm) auxquels est additionné l'anticorps à étudier dans 1 ml de tampon d'adsorption (TNTE + 0,3 % SDS) (cf.1.2).

Les différents témoins de la réaction sont traités dans les mêmes conditions.

8.5.2. 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 al.*, 1970).

Les immuncomplexes sont mélangés avec 10 mg (poids sec) de protéine A sépharose CL-HB, (Pharmacia) incubée préalablement avec 10 µl d'antisérum spécifique des immunoglobulines de souris (Nordic). Après 3 h 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 (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 3 %, sucrose 10 %, Bleu de Bromophénol 0,005 %) 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 (cf. 5.1.1, 5.1.2).

9. TECHNIQUES GENETIQUES

9.1. CULTURE DES PHAGES

Les cellules bactériennes (Y1089 ou Y1090) sont cultivées dans du milieu LB + 75 μ g/ml d'ampicilline jusqu'à ce que la DO_{600} soit égale à 0,7. Après une centrifugation, les cellules sont reprises dans 1/3 de volume de $MgSO_4$ 10 mM et incubées 1 h à 37°C. Les cellules Y1090 et les phages dans un rapport phage/bactérie de 10/1 sont mis en contact 20 min à température ambiante. Mélangées à 3 ml d'agarose molle (milieu LB + 0,8 % agarose + $MgCl_2$ 10 mM) la solution phagique est étalée sur des boîtes contenant le milieu LB-agar (milieu LB + 4,5 % bacto-agar). Les boîtes sont incubées 16 h à 37°C.

9.2. PREPARATION DE LA BANQUE DE cDNA A PARTIR DE L'ARNm DE TACHYZOITES

La synthèse du cDNA est réalisée à partir d'un "kit" fabriqué par Amersham selon la méthode de GUBLER et HOFFMANN (1983). Le premier brin d'ADN complémentaire est synthétisé par l'action de la transcriptase réverse de AMV. L'ADN, rendu double brin par l'action conjointe de la RNase H et de l'ADN polymérase I, est ensuite traité à la T₄ DNA polymérase pour rendre ses extrémités franches. Après méthylation par l'enzyme *EcoRI* méthylase, on ajoute des "linkers" *EcoRI* aux extrémités des cDNAs par l'action de la T₄ DNA ligase. Les cDNAs sont ensuite digérés par l'enzyme *EcoRI* et sont purifiés par chromatographie sur une colonne AcA 34 Ultrogel (0,2 x 30 cm) selon la méthode de WATSON et JACKSON (1985). On insère ensuite les cDNAs (500 à 7000 paires de bases) dans le site *EcoRI* du phage lambda gt₁₁ (YOUNG and DAVIS, 1983). Après ligation, les phages recombinants sont empaquetés *in vitro*. Une banque de 3 x 10⁶ phages est ainsi constituée.

9.2.1. Criblage de la banque et sélection des candidats "P30"

Selon la méthode décrite par HUYNH *et al.* (1985), un échantillon de la banque en lambda gt₁₁ est inoculé sur la souche *E. coli* Y1090 à une dilution représentant 10⁴ phages par boîte de 90 cm de diamètre.

Les phages sont cultivés comme en 9.1. Les boîtes sont incubées à 42°C pendant 3 h-4 h, ensuite des membranes de nitrocellulose saturée en Isopropylthio- β -galactoside (IPTG) 10 mM sont déposées sur les boîtes de culture. Les boîtes recouvertes par les membranes sont incubées de nouveau à 37°C pendant 3 h. Les protéines synthétisées sont adsorbées sur cette membrane et sont ensuite incubées en présence d'anticorps de lapin anti-P30. Les anticorps fixés sont détectés par un second anticorps anti-IgG de lapin marqué à la peroxydase ; ce complexe est ensuite révélé par une coloration avec le 4-chloro-1-naphthol, en présence de H₂O₂. Cette détection permet d'identifier les phages recombinants dont l'insertion de cDNA dirige la synthèse d'une protéine ou fraction de protéine portant les épitopes reconnus par les anticorps anti-P30.

9.3. PREPARATION DES LYSOGENES

(HUYNH et al., 1985)

Les cellules *E. coli* Y1089 sont cultivées dans du milieu LB + 75 μ g/ml ampicilline jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit égale à 0,7. Après une centrifugation, les cellules sont reprises dans 1/3 de volume de MgSO₄ 10 mM et incubées 1 h à 37°C. Les cellules Y1089 et les phages recombinants dans un rapport phage/bactérie de 10/1 sont mis en contact 20 min. à température

ambiante. 3 ml d'agarose molle sont ajoutés et 10^3 cellules sont ensuite étalées sur boîte. Les colonies obtenues sont repiquées en double, une boîte étant incubée à 32°C, l'autre à 42°C. Les clones lysogènes se développent à 32°C mais non à 42°C (avec une fréquence de 1 pour 10).

Une colonie lysogène est mise en culture dans 5 ml de milieu LB en présence d'ampicilline jusqu'à obtention d'une DO_{600} de 0,5-0,7. La température est alors élevée à 42°C pendant 20 min. Lorsque l'IPTG 10 mM est additionné, la culture est alors incubée 1 h à 37°C. Après centrifugation à 3.000 g pendant 10 min. à 4°C, le culot est repris par 0,1 ml de tampon de lyse (Tris 10 mM à pH 7,4 ; SDS 0.1 %, Déoxyribonucléase à 100 ng/ml et du lysozyme à 200 ng/ml). On laisse 30 min. sur la glace, puis on ajoute le PMSF (Phényl méthyl sulfonyl fluoride) 1 mM. On congèle le lysat à -20°C.

9.4. IDENTIFICATION DE LA PROTEINE DE FUSION PRODUITE PAR LES PHAGES RECOMBINANTS

Les constituants du lysat bactérien des lysogènes induits est séparé sur gel de polyacrylamide 8 % en utilisant le système de tampon discontinu de LAEMMLI (1970) (cf. 5.1.1).

Les protéines séparées peuvent être visualisées au bleu de Coomassie (cf. 7.2).

Ces protéines sont aussi transférées et la protéine de fusion est visualisée sur membrane de nitrocellulose par la technique d'immunoélectro-transfert (cf. 5.2) (TOWBIN et al., 1979).

9.5. PREPARATION DE LA BANQUE GENOMIQUE DE TACHYZOITES

Une fraction de la digestion de l'ADN de *T. gondii* par *EcoRI* contenue entre 1000 et 2000 paires de base est insérée dans le site *EcoRI* du phage lambda gt10 (YOUNG and DAVIS, 1983). 1 µg d'ADN phagique, 200 ng d'ADN de *T. gondii* et 1 U de T4 DNA ligase sont mis en contact pendant 16 h à 16°C dans le tampon de ligation. Après ligation, les phages recombinants sont empaquetés *in vitro*. Une banque de 10⁷ phages est ainsi constituée.

9.5.1. Criblage de la banque génomique avec une sonde spécifique

Pour détecter les plages de lyse possédant les phages avec l'insert spécifique du gène recherché, un échantillon de la banque génomique est inoculé sur la souche C600 Hfl à une dilution représentant 10⁴ phages lambda gt 10 par boîte de 90 cm de diamètre.

Les phages sont cultivés comme en 9.1. Après incubation, les boîtes sont recouvertes de membranes de nitrocellulose, pendant quelques secondes. Les membranes sont enlevées des boîtes et sont déposées

successivement sur 1,5 ml de tampon (NaOH 0,2 M, NaCl 3M) pendant 10 min, sur 1,5 ml de tampon (Tris HCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 3M) pendant 10 min. et sur 1,5 ml de tampon SSC x 2 pendant 5 min.

Les membranes sont préséchées sur papier absorbant pendant une heure à température ambiante puis portées à 80°C pendant 2 h. Puis elles sont préhybridées et hybridées comme en 5.5.3. et les lavages sont effectués dans une solution de SSC x 2.

Les membranes encore humides, entourées d'un film plastique, sont exposées à -70°C en autoradiographie (cf. 6).

Les plages de lyse contenant les phages recombinants sur lesquels la sonde s'est hybridée sont purifiées et l'ADN phagique est extrait selon 9.6.

9.6. OBTENTION DE L'ADN PHAGIQUE

Les bactériophages recombinants sélectionnés sont mis en présence de *E. coli* Y1090 20 min. à température ambiante. Mélangée à de l'agarose molle (milieu LB + 0,8 % agarose) et du MgCl₂ (10 mM), la solution phagique est étalée sur des boîtes LB-agar (milieu LB + 4,5 % Bacto-agar) en présence d'ampicilline. Après incubation des boîtes, 16 h à 37°C, les bactériophages sont élués pendant 3 h dans du milieu SM (NaCl 100 mM, MgSO₄ 7 H₂O 8 mM, Tris 50 mM pH 7,5, Gélatine 0,01 %). L'éluat est d'abord traité au chloroforme puis à la

ribonucléase et à la désoxyribonucléase (1 µg/ml) pour éliminer les constituants bactériens. Les phages sont ensuite précipités dans du PEG 10 % et NaCl 1,25 M pendant 30 min. à 4°C. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 min, le culot est repris dans 50 µl de SM et une extraction au chloroforme est alors réalisée. Pour 1 ml d'éluat 0,75 g de CsCl est ajouté. Une ultracentrifugation à l'équilibre en gradient de CsCl est effectuée pendant 24 h à 108.000 g. La bande phagique est récupérée à l'aide d'une seringue. Les phages sont dialysés deux fois pendant 1 h dans 1 l de Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM. L'ADN phagique est ensuite isolé par traitement avec EDTA 20 mM, SDS 0,5 %, protéinase K 50 µg/ml pendant 1 h à 65°C puis par extraction au phénol-chloroforme. L'ADN est précipité avec 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 2,5 volumes d'éthanol à froid. Après centrifugation à 12.000 g, 30 min. à 4°C, le culot est lavé par de l'éthanol 70 %, séché et dissout dans de l'eau.

Les inserts sont obtenus par digestion *EcoRI* de l'ADN phagique et migration sur gel d'agarose à bas point de fusion 1 %. L'électrophorèse est réalisée en tampon TBE (Tris-HCl 0,089 M, acide borique 0,089 M, EDTA 2 mM). L'ADN cloné est extrait de l'agarose par passage de la bande de gel correspondante sur une colonne NACS prépac (BRL) d'après THOMPSON *et al.* (1983).

9.7. SOUS-CLONAGE ET AMPLIFICATION D'UN FRAGMENT D'ADN
(INSERT) DANS LES PLASMIDES pUC 13 ET pUC 19

9.7.1. Sous-clonage

Les plasmides pUC 13 ou pUC 19 sont linéarisés par digestion en présence d'EcoRI. Pour minimiser la recircularisation du plasmide, l'extrémité 5' phosphate du plasmide est déplacée par la phosphatase alcaline bactérienne. La réaction de ligation entre pUC 13 ou pUC 19 et l'insert est effectuée en utilisant l'ADN ligase du phage T4 (1 U) avec un rapport molaire vecteur/insert de l'ordre de 1/10 dans un volume réactif de 10 µl. Le temps de réaction est de 4 h à température ambiante dans le tampon suivant : Tris 50 mM pH 7,8, ATP 1 mM, Dithiothréitol 20 mM, MgCl₂ 10 mM. La solution plasmidique est alors diluée 4 fois avec de l'eau et utilisée pour la transformation de *E. coli* JM 107.

Les bactéries sont cultivées, sous agitation à 37°C, dans 30 ml de milieu LB. Quand la culture atteint une DO₅₈₀ de 0,6, elle est centrifugée à 6.000 g 10 min., à 4°C. Les bactéries sont lavées deux fois dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M. Le culot bactérien, repris dans 20 ml de CaCl₂ 0,1 M est laissé 20 min. à 4°C, puis centrifugé une dernière fois.

Les bactéries sont resuspendues dans 0,5 ml de CaCl₂ 0,1 M et réparties en aliquotes de 0,1 ml. Chaque

aliquote est mise en contact avec 25 μ l d'une solution d'ADN transformant. Après 20 min. dans la glace, cinq chocs thermiques (37°C - 4°C) sont effectués ; la suspension est conservée 15 min. à 4°C. 40 μ l d'une solution de 5-chloro-4-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) à 20 mg/ml (BRL) et 24 μ l d'IPTG à 24 mg/ml (BRL) sont ajoutés à chacun des deux tubes contenant 3,5 ml d'agarose molle (LB + 7 g/l d'agarose) à 56°C. 10 μ l de bactéries compétentes sont alors ajoutés dans un tube et 110 μ l dans l'autre tube. A chaque tube, sont additionnés 200 μ l de milieu LB contenant la JM 107 (DO_{590} 0,3). Le contenu des tubes est mélangé et coulé uniformément sur une boîte de Pétri contenant du LB-agar. Après solidification du milieu, les boîtes sont conservées 18 h à 37°C.

On repère les colonies blanches pour lesquelles l'ADN cloné est inséré dans le plasmide. L'efficacité de transformation est d'environ 10^6 colonies/ μ g de plasmide natif.

9.7.2. Amplification et purification de l'ADN plasmidique

Les clones sélectionnés sont mis en suspension dans 30 ml de milieu LB contenant 50 μ g/ml d'ampicilline pendant 3 h à 37°C, sous agitation. 10 ml de suspension sont ajoutés à 200 ml de milieu LB et incubés à 37°C pendant 18 h, sous agitation. La suspension est centrifugée 10 min. à 6.000 g, à 4°C et

le culot resuspendu dans 3,0 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, saccharose 25 %. Les bactéries sont conservées à 4°C et 1,0 ml d'une solution de lysozyme à 10 mg/ml est ajoutée. Après 5 min., 1,0 ml d'EDTA 0,2 M est additionné et les bactéries sont alors conservées pendant une période égale dans la glace. 5 ml d'une solution Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, Triton 0,01 % sont ajoutés et les débris cellulaires sont sédimentés par centrifugation à 150.000 g pendant 45 min., à 4°C. 8,6 ml de surnageant sont ajoutés à 8,6 g de CsCl et 86 µl d'une solution à 5 mg/ml de BrEt. Après une centrifugation de 300.000 g pendant 20 h, à 16°C la bande d'ADN plasmidique est récupérée, le BrEt est éliminé par extraction à l'isopropanol et les plasmides sont dialysés contre du tampon TE (Tris-HCl 0,1 M pH 8, EDTA 50 mM). L'ADN plasmidique est précipité dans l'éthanol à -20°C puis dissout de nouveau dans du TE.

9.8. PREPARATION DE L'ADN SIMPLE BRIN, A PARTIR DU PHAGE M13

9.8.1. Obtention des phages

10 µg de plasmide contenant l'insert sont coupés par différents enzymes. Après électrophorèse sur gel d'agarose, des fragments d'ADN sont récupérés par découpage de l'agarose et trois cycles de congélation (-70°C) - décongélation (37°C) sont effectués.

L'agarose est filtré sur filtre "millex" (20 µm) et minicolonne "elutip" (SCHLEICHER et SCHUELL), cette dernière ayant été préalablement équilibrée à l'aide de tampons : haute force ionique (NaCl 1 M, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) et basse force ionique (NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). L'ADN élué dans le tampon à haute force ionique est précipité à l'éthanol.

La forme répliquative de l'ADN des bactériophages M13 mp18 et M13 mp19, coupée par les mêmes enzymes, est précipitée à l'éthanol avec les fragments précédemment obtenus. L'ADN est centrifugé 30 min. à 12.000 g, à 4°C, séché et resuspendu dans 40 µl d'eau. Une dialyse de 20 min. est effectuée sur membrane Millipore (20 µm) ; ensuite sont ajoutés 4 µl de tampon ligase X10 (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4, MgCl₂ 0,1 M, dithiothreitol 0,1 M, spermidine 10 mM, ATP 10 mM, BSA 1 mg/ml) et 1 U d'ADN Ligase du bactériophage T4. L'ADN est conservé à 16°C pendant 18 h et servira par la suite à la transformation de la souche bactérienne *E. coli* JM107 (cf. 9.6.1.). On sélectionne les plages de lyse incolores.

9.8.2. Sélection et amplification des phages

Les plages transparentes sont prélevées et mises en suspension dans 1,0 ml de tampon SM (NaCl 10 mM, MgSO₄ 8 mM, Tris-HCl 50 mM pH 7,0, gélatine 0,1 g/l).

2 ml de milieu LB contenant les bactéries JM 107 (DO_{580} 0,3) sont ajoutés, et la suspension est mise en agitation 4 h à 37°C. Cette suspension est ensuite centrifugée 10 min. à 8.000 g, à 4°C et le surnageant est récupéré et conservé à 4°C. 200 µl du surnageant sont mélangés à 30 µl d'une solution : SDS 2 %, EDTA 0,2 M, Bleu de bromophénol 0,2 %, glycérol 50 %. Après agitation et incubation à 65°C pendant 10 min., le lysat est déposé sur gel d'agarose à 0,6 % et l'électrophorèse conduite en TBE à 30 V pendant 18 h. Une vérification de la taille de l'ADN simple brin est ainsi effectuée.

Le culot de bactéries est resuspendu dans 1,0 ml de la solution suivante : sucrose 8 %, triton X100 0,5 % EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, additionnée de 35 µl de lysozyme à 10 mg/l, puis les échantillons sont mis à 100°C pendant 60 sec. Après une centrifugation de 10 min. à 12.000 g, le surnageant est précipité à l'isopropanol, centrifugé 20 min. à 12.000 g et séché. Après dissolution, l'ADN est dialysé et analysé à l'aide d'endonucléases de restriction (HOLMES and QUIGLEY, 1981). On effectue ainsi la vérification de la présence d'insert dans l'ADN bactérien.

L'amplification des phages sélectionnés est obtenue par infection de la souche JM107 (DO_{580} 0,1) avec le reste du surnageant conservé à 4°C dans 200 ml de milieu LB et la culture est laissée 18 h à 37°C sous

agitation. Les bactéries sont centrifugées à 6.000 g 10 min., à 4°C et l'ADN simple brin contenu dans le surnageant est précipité par du polyéthylèneglycol 6000 à 4 % et NaCl 0,5 M final. Après 1 h à 4°C, la solution est centrifugée 30 min à 12.000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon TE, deux cycles d'extraction au phénol-chloroforme puis éther sont effectués, suivis d'une précipitation à l'éthanol (EGGERDING and PIERCE, 1983).

9.9. DETERMINATION DE LA CARTE DE RESTRICTION DU CLONE GENOMIQUE

L'ADN plasmidique contenant le clone génomique purifié (cf. 9.7.2) est digéré par différentes enzymes de restriction (AccI, AvaI, AspI, BamHI, EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII, KpnI, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SacII, SalI, SmaI, SphI, SstI, XbaI, XhoI). La carte de restriction est établie après l'analyse des fragments de digestion, visualisés aux ultraviolets après une électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 % (cf. 5.5.1) coloré au BrEt (cf. 7.3).

9.10. SEQUENCAGE DES FRAGMENTS D'ADN CLONES

Les fragments clonés sont séquencés par la méthode de terminaison des chaînes de MESSING *et al.* (1977) ; SANGER *et al.* (1977).

Deux procédés ont été employés :

A) A partir d'un "kit" fabriqué par Amersham, l'ADN cloné dans le phage M13 est mélangé avec la solution d'hybridation (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl₂ 5 mM) et une amorce ("primer"). Le mélange est placé 2 h à 55°C, puis 20 µCi de α³²PdCTP sont additionnés. Le mélange est réparti dans 4 tubes et la réaction est faite à la température ambiante en présence d'un mélange de désoxynucléotides - didésoxynucléotides et l'ADN polymérase de Klenow. A la fin de la réaction, l'ADN est repris dans 4 µl de tampon échantillon (Xylène cyanol FF 0,1 g, bleu de bromophénol 0,1 g, EDTA 500 mM 4 ml, Formamide déionisé 100 ml) puis dénaturé 2 min. à 90-95°C et l'électrophorèse effectuée sur gel de polyacrylamide 6 %, urée 50 % dans le système BRL Modèle S2.

Après l'électrophorèse, le gel est entouré d'un film plastique et exposé à température ambiante en autoradiographie (cf. 6).

B) A partir du système Séquenase ABI 370A développé par Applied Biosystems, l'ADN cloné dans le phage M13 est mélangé avec le tampon de polymérisation (Tris-HCl, pH 7,5 10 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM). Cette solution est ensuite répartie en quatre tubes : dans chacun on ajoute une amorce ("primer") fluorescente spécifique aux différentes bases puriques

ou pyrimidiques. Le mélange est placé 6 min à 55°C. On laisse ensuite refroidir 30-40 min. à température ambiante puis la réaction est effectuée à 37°C pendant 5 min. en présence d'un mélange de désoxynucléotides-didésoxynucléotides et l'enzyme Séquenase (12,5 U/ μ l) (Touzart-Matignon). A la fin de la réaction, l'enzyme est inactivée à 65°C pendant 10 min. Pendant ces réactions, les échantillons sont à l'abri de la lumière.

Le contenu des quatre tubes est transféré en un seul tube, l'ADN synthétisé est précipité, le culot obtenu après centrifugation est lavé, séché et conservé à -20°C à l'abri de la lumière.

Le matériel est repris dans le tampon échantillon (EDTA 500 mM 4 ml, Formamide 100 ml) puis dénaturé 2 min. à 90°C, et l'électrophorèse est effectuée sur gel de polyacrylamide 6 %, urée 50 % (cf. 5.1.3).

Le résultat est exprimé sous forme de graphique dans un système informatisé (Vectra Hewlett-Packard) où chaque pic représente un nucléotide terminateur de chaîne.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

AMBROISE-THOMAS P., CAGNARD M.Y., ROUMIANTZEFF M. & COLOMBET G. (1982) Détection de l'immunité toxoplasmique par intradermo-réactions à l'aide d'exoantigènes de *Toxoplasma gondii*. Lyon Méd., 248 : 78.

ANDERSON S.E., BAUTISTA S.C. & REMINGTON J.S. (1976) Specific antibody dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. Clin. exp. Immunol., 26 : 375.

ARAUJO F.G. & REMINGTON J.S. (1980) Antigenemia in recently acquired acute Toxoplasmosis. J. Infect. Dis., 141 : 144.

ARAUJO F.G. & REMINGTON J.S. (1984) Partially purified antigen preparations of *Toxoplasma gondii* protect against lethal infection in mice. Infect. Immun., 45 : 122.

ARNEMANN J., BARREL H. & BEATO M. (1977) Purification and properties of rabbit uterus preuteroglobin. Nucleic Acids Res., 4 : 4023.

AUFFREY C. & ROUGEON F. (1980) Purification of mouse immunoglobulin heavy chain messagers RNAs from total myeloma tumor RNA. Eur. J. Biochem., 107 : 303.

BENEX J. (1974) Les réactions de fixation du complément. Diagnostic Immunologique des Parasitoses à Protozoaires et Helminthes, (Maloine S.A., Edr.), p 220.

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

BOOTHROYD J.C., BURG J.L., NAGEL S.D., PERELMAN D., KASPER L.H., WARE P.L., PRINCE J.B., SHARMA S.D. & REMINGTON J.S. (1987) Antigen and tubulin genes of *Toxoplasma gondii*. Molecular Strategies of Parasitic Invasion, p. 237.

BORST P., OVERDULE J.P., WEIJERS P.J., FASE-FOWLER F. & VAN DEN BERG M. (1984) DNA circles with cruciforms from *Isospora (Toxoplasma) gondii*. Biochim. Biophys. Acta, 781 : 100.

CAMARGO M.E., FERREIRA A.W., MINEO J.R., TAKIGUTI C.K. & NAKAHARA D.S. (1978) Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect. Immun., 21 : 55.

CAMARGO M.E., LESER P.G. & LESER W.S. (1976) Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 18 : 215.

CAPRON A. & DESSAINT J.P. (1988) Vaccination against parasitic diseases : some alternative concepts for the detection of protective antigens. Ann. Inst. Pasteur/Immunol., 139 : 109.

CAPRON A., WATTRE P., VERNES A. & DELAUNOY, G. (1974) Le diagnostic immunologique de la toxoplasmose. Lille Médical, 19 : 147.

CATTERALL J.R., HOFFLIN J.M. & REMINGTON J.S. (1986) Pulmonary toxoplasmosis. Ann. Rev. Respir. Dis., 133 : 704.

CESBRON J.Y., CAPRON A., OVLAQUE G. & SANTORO F. (1985) Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). J. Immunol. Methods, 83 : 151.

CESBRON J.Y., CARON A., SANTORO F., WATTRE P., OVLAQUE G., PIERCE R.J., DELAGNEAU J.F. & CAPRON A. (1986) Une nouvelle méthode ELISA pour le diagnostic de la toxoplasmose : dosage des IgM sériques par immunocapture avec un anticorps monoclonal anti-*Toxoplasma gondii*. La Presse Médicale, 15 : 737.

CESBRON-DELAUW M.F., GUY B., TORPIER G., LENZEN G., CESBRON J.Y., PIERCE R.J., FOURMAUX M.P., LEITE P., DARCY F., LECOQ J.P. & CAPRON A. (1988) Molecular cloning and characterization of a major secreted antigen (P23) of *Toxoplasma gondii*. Nature (soumis à publication).

CHUMPITAZI B., AMBROISE-THOMAS P., CAGNARD M. & AUTHEMAN J.M. (1987) Isolation and characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from *in vitro* culture in MRC5 and vero cells. Int. Parasitol. 17 : 829.

CHUMPITAZI B., AMBROISE-THOMAS P., CAGNARD M. & COLOMBET G. (1983) Exo-antigènes toxoplasmiques produits en culture *in vitro* : détermination des poids moléculaires. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 1 : 89.

COHEN S. & WARREN K.S. (1976) Serodiagnosis of Toxoplasmosis. Immunology of Parasitic Infections, (Blackwell Scientific Publications), p 94.

COUVREUR G., SADAK A., FORMER B. & DUBREMETZ J.F. (1988) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitology, 97 : 1.

DARCY F., DESLEE D., SANTORO F., CHARIF H., AURIAULT C., DECOSTER A. & CAPRON A. (1988) Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted-secreted antigens from tachyzoites of *T. gondii*. Parasite Immunol., sous presse.

DECOSTER A., DARCY F. & CAPRON A. (1988a) Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis. Identification of markers of acute and chronic infection. Clin. exp. Immunol., sous presse.

DECOSTER A., DARCY F., CARON A. & CAPRON A. (1988b) IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. Lancet, soumis à publication.

DESGEORGES P.T., BILLAULT X., AMBROISE-THOMAS P. & BOUTTAZ M. (1980) Mise en évidence et cinétique d'apparition d'exo-antigènes produits par *Toxoplasma gondii* en culture *in vitro*. Lyon Méd., 243 : 737.

DESMONTS G. (1972) Diagnostic biologique de la toxoplasmose humaine. Pharm. Biol., 6 : 43.

DESMONTS G., NAOT Y. & REMINGTON J.S. (1981) An immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases : diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. J. Clin. Microbiol., 14 : 486.

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

DUBEY J.P. (1977) *Toxoplasma*, *Hammondia*, *Besnoitia*, *Sarcocystis* and other tissues cyst-forming coccidia of man and animals. III. Parasitia Protozoa, Julius Kreier, Edr., Academic Press, New-York, San Francisco, London, pp. 101-237.

DUBREMETZ J.F., RODRIGUEZ C. & FERREIRA E. (1985) *Toxoplasma gondii* : redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. Exp. Parasitol., 59 : 24.

DUBREMETZ J.F. & TORPIER G. (1978) Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, coccidia). J. Ultrastruct. Res., 62 : 94.

EGGERDING F.A. & PIERCE W.C. (1983) Construction of a cloned library of adenovirus DNA fragments in bacteriophage M13. J. Biol. Chem., 258 : 10090.

FARANDO J.M., COPPEL R.L., CORCORAN L.M., BROWN G.V., ANDERS R.F. & KEMP D.J. (1986) Structure of the RESA gene of *Plasmodium falciparum*. N.A.R., 14 : 8265.

FOSTER B.G. & McCULLOCH W.F. (1968) Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. Can. J. Microbiol., 14 : 103.

FRENKEL J.K. (1967) Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol., 98 : 1309.

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

FRENKEL J.K. (1971) *Toxoplasmosis*. Pathology of protozoal and helminthic diseases with clinical correlation, Rojas R.A.M., Edr., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 254-290.

FRENKEL J.K. (1973) *Toxoplasmosis : Parasite life cycle, pathology and immunology. The Coccidia*, Hammond D.M. & Long P.L., Edrs., University Park Press, Baltimore, Butterworth, London, pp. 343-410.

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

GAIT M.J. (1984) Oligonucleotide synthesis. A practical approach (IRL Press Oxford, Washington, D.C.), p. 217.

GARRELLS J.I. (1979) Two-dimensional gel electrophoresis and computer analysis of proteins synthesized by clonal cell lines. J. Biol. Chem., 254 : 7961.

GILL H.S. & PRAKASH O. (1970) A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. Indian J. Med. Res., 58 : 1157.

GOLDMAN M., CARVER R.K. & SULZER A.J. (1958) Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. J. Parasitol., 44 : 161.

GOLVAN Y.J. (1983) *Eléments de Parasitologie Médicale* (Flammarion, Paris, 4e Ed.) p 571.

GOLVAN Y.J. & AMBROISE-THOMAS P. (1984) *Les nouvelles techniques en Parasitologie et en Immunoparasitologie* (Flammarion, Paris) p. 298.

GUBLER U. & HOFFMANN B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene, 25 : 263.

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

HANDMAN E. & REMINGTON J.S. (1980b) Serological and immunological characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. Immunology, 40 : 579.

HAUSER W.E.Jr. & REMINGTON J.S. (1981) Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. Infect. Immun., 32 : 637.

HAUSER W.E.Jr., SHARMA S.D. & REMINGTON J.S. (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic Toxoplasmosis infection. Cell. Immunol., 69 : 330.

HAUSER W.E.Jr. & VAN TSAI (1986) Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *Toxoplasma gondii* *in vitro*. J. Immunol., 136 : 313.

HINDBERG R.E. & FRENKEL J.K. (1977) Toxoplasmosis in nude mice. J. Parasitol., 63 : 219.

HOLMES D.S. & QUIGLEY M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem., 114 : 193.

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

HUGHES H.P.A. (1985) Toxoplasmosis : the need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment. Curr. Topics Microbiol. Immunol., 120 : 105.

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. (1966) Experimental toxoplasmosis. Effect of inoculation of *Toxoplasma* in seropositive rabbits. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 68 : 592.

HUTCHINSON W.M. (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. Nature, 206 : 961.

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

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

HUTCHINSON 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.

HUYNH T.V., YOUNG R.A. & DAVIS R.W. (1985) DNA cloning : a practical approach, Gloven D., Edr., IRL Press, p. 49.

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

JACOBS L. & LUNDE M.N. (1957) A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol., 43 : 308.

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

JOHNSON A.M. (1985) The antigenic structure of *Toxoplasma gondii* : a review. Pathology, 17 : 9.

JOHNSON A.M., DUBEY J.P. & DAME J.B. (1986a) Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 64 : 351.

JOHNSON A.M., ILLANA S., DUBEY J.P. & DAME J.B. (1987a) *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* : DNA comparison using cloned rRNA gene probes. Exp. Parasitol., 63 : 272.

JOHNSON A.M., McDONALD P.J. & ILLANA S. (1986b) Characterization and *in vitro* translation of *Toxoplasma gondii* ribonucleic acid. Mol. Biochem. Parasitol., 18 : 313.

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

JOHNSON A.M., McDONALD P.J. & NEOH S.H. (1981a) Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of *Toxoplasma gondii*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 100 : 934.

JOHNSON A.M., McNAMARA P.J., NEOH S.H., McDONALD P.J. & ZOLA H. (1981b) Hybridomas secreting monoclonal antibody to *Toxoplasma gondii*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 59 : 303.

JOHNSON A.M., MURRAY P.J., ILLANA S. & BAVERSTOCK P.J. (1987b) Rapid nucleotide sequence analysis of the small subunit ribosomal RNA of *Toxoplasma gondii* : evolutionary implications for the Apicomplexa. Mol. Biochem. Parasitol., 25 : 239.

JOURNES K. (1979) Dépistage de la toxoplasmose chez la femme enceinte et le nouveau-né. Thèse de Doctorat en Médecine, Université Claude Bernard, Lyon.

KASPER L.H. (1987) Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. Parasit. Immunol., 9 : 433.

KASPER L.H., CRABB J.H. & PFEFFERKORN E.R. (1982) Isolation and characterization of monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 129 : 1696.

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.

KASPER H.L., CURRIE K.M. & BRADLEY M.S. (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 134 : 3436.

KHAN I.A., ECKEL M.E., PFEFFERKORN E.R. & KASPER L.H. (1988) Production of gamma interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*. J. Infect. Dis., 157 : 979.

KRAHENBUHL J.L., BLAZKOVEC A.A. & LYSENKO M.G. (1971) *In vitro* and *in vivo* studies of delayed type hypersensitivity to *Toxoplasma gondii* in guinea pigs. Infect. Immunol., 3 : 260.

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

KRAHENBUHL J.L. & REMINGTON J.S. (1982) The immunology of *Toxoplasma* and toxoplasmosis. Immunology of Parasitic Infections, 2nd Ed., S. Cohen and K.S. Warren (eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edimburg, Boston, Melbourne, p 356.

KRAHENBUHL J.L., RUSKIN J. & REMINGTON J.S. (1972) The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite : *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 108 : 425.

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 ubertragung non *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 heard of bacteriophage T4. Nature, 227 : 680.

LE FICHOUX Y., MARTY P. & CHAN H. (1987) Les IgA spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. Ann. Pédiatr., 34 : 375.

LEVINE N.D., CORLISS J.O., COX F.E.G., DEROUX G., GRAIN J., HONIGBERG B.M., LEEDALE G.F., LOEBLICH A.R., LOM J., LYNN D., MERINFELD E.G., PAGE F.C., POLJANSKY G., SPRAGUE V., VAVRA J. & WALLACE F.G. (1980) A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool., 27 : 37.

LEVY R.M., PONS V.G. & ROSENBLUM M.L. (1984) Central nervous system man lesions in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). J. Neurosurg., 61 : 9.

LUFT B.J., BROOKS R.G., CONLEY F.K., McCABE R.E. & REMINGTON J.S. (1984) Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. JAMA, 252 : 913.

LUFT B.J. & REMINGTON J.S. (1988) Toxoplasmic encephalitis. J. Infect. Dis., 157 : 1.

MASIHI R.N. & WERNER H. (1978) The effect of passively transferred heterologous serum on *Toxoplasma gondii* in NMRI mice : influence of the treatment on course of infection and cyst formation. Zentralbl. Bakteriol. (orig. B) 240 : 135.

McCABE R. & REMINGTON J.S. (1988) Toxoplasmosis : the time has come. N. Engl. J. Med., 318 : 313.

MERRIFIELD R.B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J. Am. Chem. Soc., 85 : 2149.

MESSING J., GRONENBORN B., MULLER-HILL B. & HOFSCHEIDER P.H. (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle : insertion of a Hind II fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 3642.

MORRISSEY J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Anal. Biochem., 117 : 307.

NAGEL S.D. & BOOTHROYD J.C. (1988) The α -and β -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. Mol. Biochem. Parasitol., 29 : 261.

NAKAYAMA I. (1965) Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis. Keio J. Med., 14 : 63.

NAOT Y. & REMINGTON J.S. (1980) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies of *Toxoplasma gondii* : use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis., 142 : 757.

NEIMARK H. & BLAKER M.G. (1967) DNA base composition of *Toxoplasma gondii* grown *in vivo*. Nature, 216 : 600.

NICOLLE C. & MANCEAUX L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du *gondii*. C.R. Acad. Sci. (Paris), 147 : 763.

PARTANEN P., TURUNEN H.J., PASIVUO R.T.A. & LEINIKKI P.O. (1984) Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M and A antibodies at different stages of infection. J. Clin. Microbiol., 20 : 133.

PAVIA C.S. (1986) Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. J. Immunol., 137 : 2985.

PFEFFERKORN E.R. & PFEFFERKORN L.C. (1976a) Arabinosynucleosides inhibit *Toxoplasma gondii* and allow the selection of resistant mutants. J. Parasitol., 62 : 993.

PFEFFERKORN E.R. & PFEFFERKORN L.C. (1976b) *Toxoplasma gondii* : isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. Exp. Parasitol., 39:365.

PFEFFERKORN E.R. & PFEFFERKORN L.C. (1981) *Toxoplasma gondii* : growth in the absence of host cell protein synthesis. Exp. Parasitol., 52 : 129.

PFEFFERKORN E.R., SCHWARTZMAN J.D. & KASPER L.H. (1983) *Toxoplasma gondii* : use of mutants to study host-parasite relationship. Cytopathology of Parasitic Disease, D. Evered & G. Collins (eds.), Ciba Symposium n°99, Pitman Books, London, p 74.

PINON J.M., POIRRIEZ J., LEROUX B., THOANES H., DUPOUY D., GARI M., JEZIERSKI J. & QUEREUX C. (1986a) Diagnostic précoce, surveillance et bilan thérapeutique de la toxoplasmose congénitale. Indications des profils immunologiques comparés E.L.I.F.A. Rev.Intern.Pediatr., 157 : 11.

PINON J.M., THOANNES H., POULETTY P.H., POIRRIEZ J., DAMIENS J. & PELLEMER P. (1986b) Detection of IgA specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzymatic IgA capture assay. Diagn.Immunol., 4 : 223.

PORCHET E. & TORPIER G. (1977) Etude du germe infectieux de *Sarcocystis terrella* et *Toxoplasma gondii* par la technique du cryodécapage. Z. Parasitenk., 54 : 101.

PRINCE J.B., KOVEN-QUINN M.A., REMINGTON J.S. & SHARMA S.D. (1985) Cell-free synthesis of *Toxoplasma gondii* antigens. Mol. Biochem. Parasitol. 17 : 163.

REMINGTON J.S., BLOOMFIELD M.M., RUSSELL E.Jr & ROBINSON W.S. (1970) The RNA of *Toxoplasma gondii*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 133 : 623.

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

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

REMYINGTON 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.

REVOL L. (1964) Toxoplasmosse ganglionnaire acquise et mononucléose infectieuse. J. Méd. Lyon, 1054 : 901-911.

REYES L. & FRENKEL J.K. (1987) Specific and non-specific mediation of protective immunity to *Toxoplasma gondii*. Infect. Immunol., 55 : 856.

RIDEL P.R., AURIAULT C., DARCY F., PIERCE R.J., LEITE P., SANTORO F., NEYRINCK J.L., KUSNIERZ J.P. & CAPRON A. (1988) Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. J. Immunol., 141 : 978.

RODRIGUEZ C. (1984) Contribution à l'étude des antigènes de surface des tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii*. Thèse de Doctorat de 3ème cycle, Université des Sciences et Techniques de Lille I.

RODRIGUEZ C., AFCHAIN D., CAPRON A., DISSOUS C. & SANTORO F. (1985) Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. Eur. J. Immunol., 15 : 747.

ROQUES C., BESSIERES M.H. & SEQUELA J.P. (1986) Caractérisation immunochimique des protéines des exoantigènes provenant de différentes souches de *Toxoplasma gondii*. Bull. Soc. Fr. Parasitol., 4 : 79.

SABIN A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc., 116 : 801.

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

SANGER D., NICKLEN S. & COULSON A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 74 : 5463.

SANTORO F., AFCHAIN D., PIERCE R., CESBRON J.Y., OVLAQUE G. & CAPRON A. (1985) Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). Clin. exp. Immunol., 62 : 262.

SANTORO F., AURIAULT C., LEITE P., DARCY F. & CAPRON A. (1987) Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. C.R. Acad. Sc. Paris, 11 : 297.

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

SEGUELA J.P., BESSIERES M.H., FOISY C., LAUNAIS B., POZET S., RECCO P. & LINAS M.D. (1976) Application de la réaction d'hémagglutination indirecte au sérodiagnostic de la toxoplasmose. Utilisation d'un antigène soluble. Méd. Mal. Infect., 6 : 268.

SETHI K.K., ENDO T. & BRANDIS H. (1980) Hybridomas secreting monoclonal antibody with specificity for *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol., 6 : 192.

SHARMA S.D., ARAUJO F.G. & REMINGTON J.S. (1984) *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 133 : 2818.

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.

SIBLEY L.D., KRAHENBUHL J.L., ADAMS G.M.W. & WEIDNER E. (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. J. Cell. Biol., 103 : 867.

SIBLEY L.D., KRAHENBUHL J.L. & WEIDNER E. (1985) Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 49 : 760.

SNIDER W.D., SIMPSON D.M., NEILSEN S., GOLD J.W.M., METROKA C.E. & POSNER J.B. (1983) Neurological complications of the acquired immunodeficiency syndrome : analysis of 50 patients. Ann. Neurol., 14 : 403.

SOUTHERN E.M. (1975) Detection of specific sequence among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98 : 503.

SUZUKI Y., ORELLANA M.A., SCHREIBER R.D. & REMINGTON J.S. (1988) Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science, 240 : 516.

THOMAS P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 5201.

THOMPSON J.A., BLAKESLEY R.W., DORAN K., HOUGH C.J. & WELLS R.D. (1983) Purification of Nucleic Acids by RPC-S analog chromatography : peristaltic and gravity-flow applications. Methods in Enzymology, 100 : 368.

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

TURUNEN H., VUORIO K.A. & LEINIKKI P.O. (1983) Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Scand. J. Infect. Dis., 15 : 307.

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. & ROSS G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr., 33 : 988.

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

VIVIER E. & PETITPREZ A. (1969) Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus fils chez *Toxoplasma gondii*. J. Cell. Biol., 43 : 329.

VOLLER A., BIDWELL D.E., BARLETT A., FLECK D.G., PERKINS M. & OLADHEIN B.A. (1976) A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasme antibody. J. Clin. Path., 29 : 150.

WARE P.L. & KASPER L.H. (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun., 55 : 778.

WATSON C.J. & JACKSON J.F. (1985) DNA cloning : a practical approach, Gloven, D., Edr., IRL Press, p 70.

WEISS L.M., VDEM S.A., TANO-WILTZ H. & WITTNER M. (1988) Western Blot Analysis of the Antibody Response of Patients with AIDS and Toxoplasma Encephalitis : Antigenic Diversity among Toxoplasma strains. J. Infect. Dis., 157 : 7.

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

WONG C., DOWLING C.E., SAIKI R.K., HIGUCHI R.G., ERLICH H.A. & KAZAZIAN H.H.Jr (1987) Characterization of β -Thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature (London), 330 : 384.

WORK K. & HUTCHINSON W.M. (1969) A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 75 : 191.

YOUNG R.A. & DAVIS R.W (1983) Yeast RNA polymerase II genes : Isolation with antibody probes. Science, 222 : 778.