

50376
1990
192

N° d'ordre 605

50376
1990
192

**UNIVERSITE des SCIENCES et TECHNIQUES de LILLE
FLANDRE ARTOIS**

Thèse de

Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Haleh CHARIF



**Implication des antigènes de sécrétion
dans la toxoplasmose**

Présentée le 6 novembre 1990 devant la commission d'examen

Membres du Jury: Président: Professeur J. MONTREUIL

Rapporteurs: Professeur G. SPIK

Professeur J.M. PINON

Examineurs: Professeur A. CAPRON

Docteur F. DARCY

Docteur G. TORPIER

L'ensemble de ce travail a été réalisé au centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité mixte INSERM U 167-CNRS 624) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Professeur A. CAPRON.

A mes parents

A Choeib

A toute ma famille et mes amis

en témoignage de mon affection et de ma profonde reconnaissance.

A mon directeur de recherches,
Monsieur le Professeur André CAPRON,

Au terme de ce travail, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accordé le privilège de travailler dans votre laboratoire.

Soyez assuré de ma profonde estime et de ma sincère reconnaissance.

A mon président de Thèse,
Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à vous exprimer mes plus sincères remerciements.

A Madame le Docteur Françoise DARCY,

Vous m'avez accueillie chaleureusement au sein
du groupe de recherches que vous animez
et avez suivi les travaux rapportés dans ce mémoire.
Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur le Docteur Gérard TORPIER,

Votre collaboration m'a été une aide précieuse dans l'aboutissement de ce travail,
C'est avec un plaisir que je vous compte aujourd'hui parmi les membres de ce jury.
Croyez en ma sincère reconnaissance.

**A Monsieur le Professeur Jean Michel PINON
et A Madame le Professeur Geneviève SPIK,**

**Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour avoir accepté de juger cette
thèse.**

Soyez assurés de ma profonde gratitude.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements:

- aux Docteurs: M.F. Cesbron-Delauw, J.Y. Cesbron, J.P. Kusnierz, J.M. Gryzch, C. Verwearde, A. Decoster, G. Ovlaque, F. Santoro, F. Rizvi, J. Khalife et R. Pierce pour leurs conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés au cours de mon travail,
- à S. Laffite, A.M. Schacht, D. Deslée, H. Caron, J.P. Decavel, C. Godin, C. Boutillon, M.P. Fourmaux et A. Jacob qui, par leur compétence technique et leur soutien m'ont particulièrement aidée à la réalisation de ce travail,
- à C. Drolez, J. Derick et l'ensemble du personnel des secrétariats et de l'animalerie, pour leur constant dévouement,
- à tous les membres des groupes "Toxoplasrose" et "Hybridome" pour tous nos échanges sympathiques et en particulier à Isabelle et à Corinne pour l'aide précieuse qu'elles m'ont apportée.

ABREVIATIONS

AES: antigènes excrétés-sécrétés

AcMc: anticorps monoclonal

ADCC: "Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity"

HGPRT: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase

Con A: concanavaline A

Met: méthionine

BSA: sérum albumine bovine

Ig: immunoglobuline

P.M.: poids moléculaire

kDa: kilodalton

PBS: tampon phosphate 0,01 M, NaCl 0,9%

ELISA: "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"

IFI: test d'immunofluorescence indirecte

SDS-PAGE: électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

SRIA: technique radioimmunologique en phase solide

Nos travaux ont donné lieu aux publications et communications suivantes:

PUBLICATIONS

Santoro F., Charif H. et Capron A. (1986) The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **8**: 631.

Darcy F., Deslée D., Santoro F., Charif H., Auriault C., Decoster A., Duquesne V. et Capron A. (1988) Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **10**: 553.

Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M.F., Decoster A., Ridel P.R., Duquesne V., Charif H., Godard I., Pierce R.J., Auriault C. et Capron A. (1989) Antigènes de *Toxoplasma gondii* d'intérêt diagnostique et immunoprophylactique potentiel: nouvelles stratégies d'identification. *Ann. Biol. Clin.* **47**: 451.

Cesbron-Delauw M.F., Guy B., Torpier G., Pierce R.J., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J.P. et Capron A. (1989) Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**: 7537.

Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M.F. et Capron A. (1990) *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* **71**: 114.

Darcy F., Charif H., Caron H., Deslée D., Pierce R.J., Cesbron-Delauw M.F., Decoster A. et Capron A. (1990) Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. *Parasitol. Res.* **76**: 473.

COMMUNICATIONS

Darcy F., Santoro F., Charif H., Deslée D., Hacot C. et Capron A. *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens: first characterization and immunogenicity in human and experimental infections. Joint Meeting of Gesellschaft für Immunologie and the Société Française d'Immunologie, Strasbourg, 1986.

Darcy F., Deslée D., Charif H., Decoster A., Auriault C., Santoro F. et Capron A. Protective antibody-dependent response against toxoplasmosis induced by antigens excreted-secreted *in vitro* by tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Réunion de la Société Française d'Immunologie, Paris, avril 1988.

Darcy F., Charif H., Caron H., Deslée D., Torpier G., Pierce R., Cesbron M.F., Decoster A., Leite P., Ridet P.R. et Capron A. Identification d'antigènes de *Toxoplasma gondii* impliqués dans l'immunité concomitante. Réunion de la Société Française d'Immunologie, Marseille, décembre 1988.

Darcy F., Torpier G., Charif H., Duquesne V., Ridet P.R., Cesbron M.F., Pierce R.J., Auriault C. et Capron A. Protective role and localization of excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. The British Society for Parasitology, Southampton, Angleterre, mars 1989.

Charif H., Darcy F., Torpier G., Kusnierz J.P., Laffite S. et Capron A. Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes d'excrétion-sécrétion de *Toxoplasma gondii*; caractérisation et localisation des antigènes reconnus. Réunion de la Société Française de Parasitologie, Rouen, 2 à 4 mai 1989.

Charif H., Torpier G., Darcy F., Cesbron-Delauw M.F., Lecordier L. et Capron A. Localization of secreted antigens in *T. gondii* tachyzoites and cysts. 7^{ème} Congrès International de Parasitologie (ICOPA VII), Paris, aout 1990.

RESUME

Le but de notre travail a été tout d'abord d'évaluer le rôle des antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) de *Toxoplasma gondii* dans l'immunité au cours de la toxoplasmose, cette catégorie d'antigènes ayant été jusqu'à présent très peu étudiée.

Après avoir mis au point un procédé d'obtention des AES par les tachyzoïtes en milieu acellulaire, puis caractérisé les AES les plus immunogènes (de P.M. 97, 57, 42, 39 et 28,5 kDa) au cours de la toxoplasmose humaine et expérimentale, nous avons démontré l'induction par ces antigènes d'une réponse protectrice anticorps-dépendante, dans le modèle expérimental du rat génétiquement athymique ("Nude").

Selon le concept de l'immunité non stérilisante (prémunition), nous avons recherché des antigènes du tachyzoïte (forme proliférative présente au cours de l'infection aiguë) présentant des épitopes communs avec le bradyzoïte (forme enkystée persistant au cours de l'infection chronique). Les antigènes de P.M. 63, 43, 39, 28,5, 27 et 21 kDa qui répondent à ces critères seraient ainsi des antigènes d'intérêt immunoprophylactique.

Une étude biochimique nous a permis de mettre en évidence la glycosylation des antigènes de 43 et 28,5 kDa ainsi que les propriétés fixatrices de Ca^{2+} de l'antigène de 27 kDa.

Nous avons produit des anticorps monoclonaux (AcMc) dirigés contre les AES. Parmi ceux-ci trois AcMc reconnaissant des AES de P.M. 21, 27 et 28,5 kDa ont permis l'identification de la localisation ultrastructurale de ces antigènes dans les deux stades, tachyzoïte et bradyzoïte. Dans le cadre de l'interaction hôte-parasite, nous avons pu ainsi démontrer le mécanisme de sécrétion de *T. gondii* à partir des organites de réserve du parasite (granules denses) vers le phagosome modifié, la paroi du kyste et même à l'extérieur du kyste dans les tissus de l'hôte. Un tel mécanisme de sécrétion du bradyzoïte, forme parasitaire à métabolisme ralenti, n'avait auparavant jamais été décrit.

L'AcMc dirigé contre l'antigène de 27 kDa a permis d'établir l'identité de ce dernier avec l'antigène recombinant P24 (Cesbron-Delauw et coll., 1989). Le séquençage partiel en acides aminés de l'antigène natif purifié par immunoadsorption à l'aide de cet AcMc a alors

permis de confirmer la séquence nucléotidique du gène codant pour P24. Le criblage des banques d'ADNc par l'AcMc dirigé contre l'antigène de 28,5 kDa a conduit à l'isolement de plusieurs clones recombinants. Nos observations mettant en évidence l'intérêt potentiel de l'antigène de 21 kDa dans l'immunologie de la toxoplasmose ont conduit au clonage, actuellement en cours, de cet antigène.

Enfin, après avoir mis en évidence la présence de l'antigène sécrété de 27 kDa dans les sérums d'infection aiguë chez la souris, nous avons mis au point une technique radioimmunologique pour la détection de cet antigène circulant par utilisation de sondes peptidiques et de l'AcMc.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire répandu dans le monde entier et capable d'infecter toutes les espèces de mammifères. Alors que chez les individus immunocompétents l'infection par *Toxoplasma gondii* est bénigne et conduit à une immunité protectrice totale et définitive, chez les enfants infectés *in utero* et chez les sujets immunodéprimés (à l'occasion de traitement immunosuppresseur ou d'infection par le virus VIH) elle entraîne souvent des complications graves, pouvant même leur être fatales. Ceci explique la mise en oeuvre d'un nombre important d'études à but immunoprophylactique et diagnostique. Cependant les travaux visant à la recherche d'antigènes protecteurs étant en grande partie centrés sur les antigènes cytoplasmiques et membranaires de la forme proliférative, le tachyzoïte, n'ont pas encore permis de mettre en évidence de protection efficace contre les souches très virulentes de *T. gondii*.

Nous avons alors basé notre étude sur deux hypothèses émises par Capron et Dessaint (1988):

1/ Les molécules d'excrétion-sécrétion parasitaires, qui contiennent une grande variété d'activités enzymatiques et dont l'immunogénicité a été démontrée dans plusieurs infections naturelles ou expérimentales, pourraient constituer de meilleurs candidats à l'immunoprophylaxie que les antigènes somatiques.

2/ Dans le contexte d'infections caractérisées par une immunité non stérilisante, comme la toxoplasmose, une réponse protectrice efficace ne peut être maintenue que si des épitopes communs sont exprimés à la fois par le stade parasitaire persistant durant l'infection chronique et responsable de l'immunité protectrice, et par le stade parasitaire prolifératif présent au cours de l'infection aiguë et inducteur de la réponse immune, ou au cours de la réinfection et donc cible des mécanismes effecteurs; ces épitopes communs doivent être les principaux responsables de la réponse immune protectrice.

Le but de notre travail a été de caractériser les antigènes excrétés-sécrétés par les toxoplasmes, d'étudier leur rôle protecteur, d'identifier les antigènes communs aux deux stades de *T. gondii* présents au cours de l'infection humaine, le tachyzoïte (forme proliférative caractéristique de l'infection aiguë) et le bradyzoïte (forme enkystée persistant au cours de l'infection chronique) et enfin, de mettre en évidence dans ces deux stades, la localisation des antigènes sécrétés afin de démontrer les mécanismes de sécrétion de *T. gondii*.

Ce travail comporte trois volets:

I/ L'obtention d'antigènes excrétés-sécrétés en milieu acellulaire, l'identification de ces antigènes, l'étude de leur immunogénicité dans la toxoplasmose humaine et expérimentale et la démonstration de leur rôle protecteur dans un modèle expérimental, le rat génétiquement athymique ou "Nude" (Nu/Nu).

II/ L'identification des antigènes des stades tachyzoïte et bradyzoïte présentant des épitopes communs.

III/ La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes excrétés-sécrétés afin de caractériser les antigènes cibles et d'étudier leur topographie au niveau des tachyzoïtes et des bradyzoïtes.

GENERALITES

1. LE TOXOPLASME ET LA TOXOPLASMOSE

1.1. Historique

Toxoplasma gondii est un protozoaire intracellulaire découvert en 1908, par Nicolle et Manceaux, à l'Institut Pasteur de Tunis. Ces auteurs isolèrent ce parasite chez un rongeur sauvage, le gondi (*Ctenodactylus gondi*) et le dénommèrent *Toxoplasma* par référence à sa forme arquée. La même année, Splendore au Brésil, décrivit indépendamment le toxoplasme chez un lapin de laboratoire.

Ce parasite est longtemps resté une simple curiosité de laboratoire, jusqu'à ce qu'il soit retrouvé dans les yeux d'un enfant autopsié par Janku (1923). La transmission intra-utérine et les premiers cas d'encéphalites néonatales chez l'homme furent décrits par Wolf et coll. (1937, 1939). Cinq ans plus tard, l'ensemble des aspects cliniques de la toxoplasmose congénitale fut caractérisé par Sabin (1942). Cependant, la fréquence réelle de la toxoplasmose n'a commencé à être appréciée qu'après la mise au point, par Sabin et Feldman (1948), d'un test sérologique de lyse complément-dépendante à la fois sensible et spécifique, le "dye test".

Bien que ce parasite soit largement répandu de par le monde, dans de nombreuses espèces animales, son mode de transmission était inconnu. En 1960 (a), Jacobs et coll. démontrèrent la résistance à la digestion protéolytique de la forme enkystée de *T. gondii*. Desmonts et coll. (1965) ont alors suggéré que la viande contaminée et consommée crue ou saignante pouvait être la source d'infection la plus importante. Cependant, rien n'indiquait alors comment les herbivores pouvaient s'infester.

En 1967, Hutchison affirme que les toxoplasmes sont transmis par les oeufs d'un ascaris du chat, *Toxocara cati*. Ce résultat est ensuite retrouvé par différents auteurs jusqu'à ce que des toxoplasmes soient finalement isolés de selles de chats non porteurs d'ascaris (Frenkel et coll., 1969; Sheffield et Melton, 1969).

En 1969, Work et Hutchison découvrirent, dans les selles d'un chat infesté par *T. gondii*, une forme kystique infectieuse pour la souris et résistante dans le milieu extérieur. Kuhn et Weiland (1969) ont évoqué la ressemblance de cette forme avec l'oocyste des

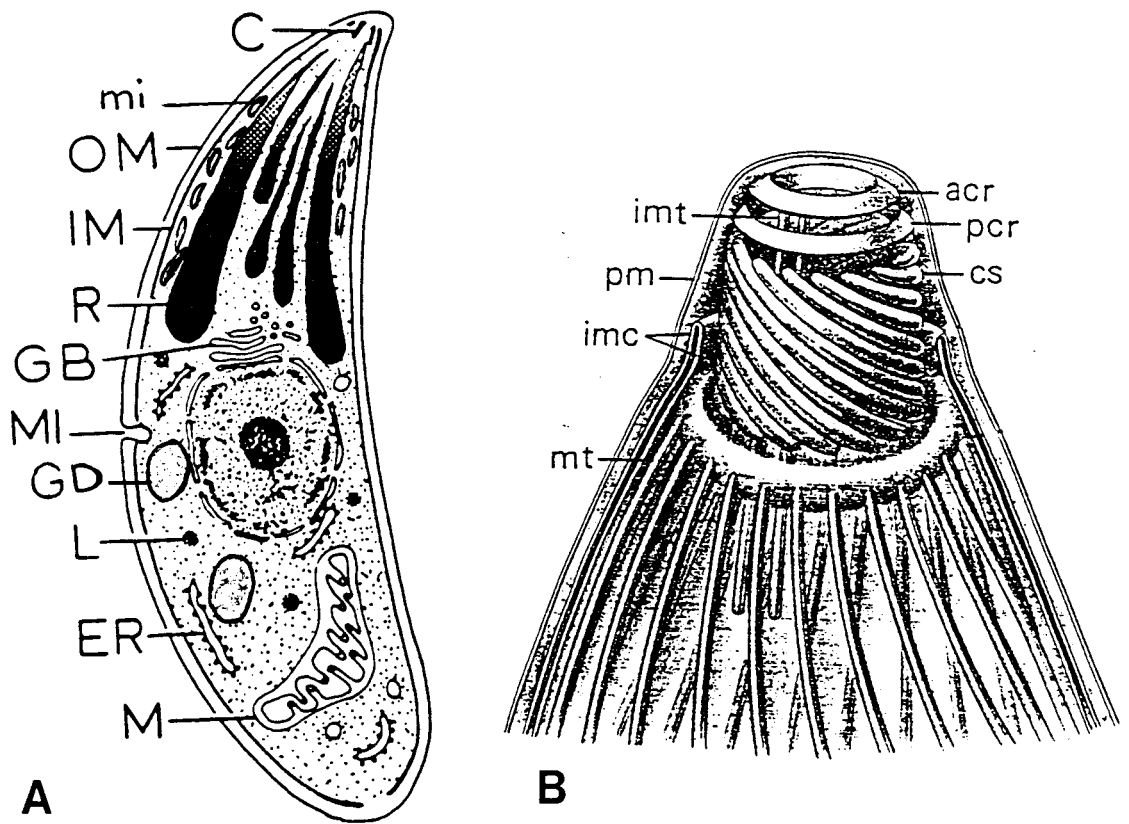


FIGURE 1.

A/ Structure schématique d'un tachyzoïte: mi, micronème; GD, granule dense; C, conoïde; ER, réticulum endoplasmique; GB, appareil de Golgi; IM, complexe membranaire interne; L, lysosomes; M, mitochondrie; MI, micropore; N, noyau; OM, membrane externe (plasmalemma); R, rhoptrie (schéma modifié, d'après Dubey et Beattie, 1988).

B/ Schéma détaillé de la région antérieure de *Toxoplasma*: imc, complexe membranaire interne; pm, membrane plasmique; mt, microtubule; imt, microtubule interne; acr, ceinture préconoïdale antérieure; pcr, ceinture préconoïdale postérieure; cs, unité de conoïde (d'après Nichols et Chiappino, 1987).

coccidies.

Finalement, en 1970, la totalité du cycle de *T. gondii* fut élucidé; l'existence de la phase sexuée du cycle de cette coccidie hétéroxène fut confirmée chez les félidés, par plusieurs auteurs (Frenkel et coll., 1970; Hutchison et coll., 1970; Sheffield et Melton, 1970).

1.2. Le parasite et son cycle (Dubey et Beattie, 1988)

Le cycle évolutif de *T. gondii* comporte une phase sexuée qui se déroule chez l'hôte définitif, le chat et une phase asexuée qui se développe aussi bien chez les hôtes intermédiaires que chez le chat. Les trois principaux stades infectieux du cycle sont les formes tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte.

1.2.1. Morphologie des différents stades infectieux du toxoplasme (Dubey et Beattie, 1988)

Le tachyzoïte (précédemment appelé trophozoïte), forme proliférative intracellulaire du parasite, est observé pendant la phase aiguë de l'infection. Il est caractérisé par sa multiplication rapide par endodyogénèse qui s'opère dans toutes les cellules de l'hôte intermédiaire ou de l'hôte définitif, excepté les hématies (Schupp et coll., 1978).

Le tachyzoïte a une forme en croissant, mesure de 6 à 7 microns de long et 2 à 3 microns de large (Fig 1). Son extrémité postérieure est plus arrondie que l'extrémité antérieure. Son noyau se situe près du pôle postérieur, alors que le pôle antérieur, effilé, présente un appareil de pénétration complexe, le conoïde. Les rhoptries, organites sécrétoires, se situent au niveau du pôle antérieur et déversent leur contenu par le conoïde, lors de la pénétration du parasite dans la cellule hôte (Nichols et coll., 1983). Le complexe membranaire est composé d'une membrane externe (plasmalemme) et d'un complexe membranaire interne formé de vésicules aplaties (Vivier et Petitprez, 1969; Porchet-Henneré et Torpier, 1983) en dessous duquel un réseau de 22 microtubules organise le cytosquelette du parasite (Nichols et Chiappino, 1987). Le tachyzoïte comporte également des micronèmes, des granules denses ainsi qu'un appareil de Golgi, des mitochondries, des ribosomes et du réticulum endoplasmique.

Le bradyzoïte, parfois appelé cystozoïte, forme enkystée à multiplication lente, est caractéristique de la phase chronique de l'infection.

Morphologiquement peu différents des tachyzoïtes mais caractérisés par des granules polysaccharidiques, les bradyzoïtes sont enfermés à l'intérieur des kystes persistant souvent toute la vie, dans les tissus musculaires et nerveux de l'hôte (Jacobs et coll., 1960b; Remington et Cavanaugh, 1965).

Les kystes intracellulaires se forment au fur et à mesure que les bradyzoïtes se multiplient par endodyogénèse et leur paroi se développe à partir de la membrane de la vacuole parasitophore (Ferguson et Hutchison, 1987a). Ces kystes atteignent des dimensions allant jusqu'à 100 microns de diamètre et peuvent contenir des milliers de bradyzoïtes. Pourtant les kystes ne sont jamais extracellulaires et ne sont entourés d'aucune réaction inflammatoire (Ferguson et Hutchison, 1987b). Les kystes sont résistants à des températures de 45°C et ne sont détruits que par une congélation prolongée. Dans les conditions physiologiques, de faibles quantités d'antigènes toxoplasmiques pourraient être libérées par une fuite continue à travers la paroi (Huldt, 1971) ou par la rupture accidentelle de la paroi du kyste (Frenkel, 1973), apportant ainsi un stimulus antigénique répété qui pourrait être à l'origine de l'immunité protectrice, totale et définitive, existant dans la toxoplasmose (Remington et Krahenbuhl, 1982).

Les sporozoïtes, provenant de la maturation de l'oocyste en sporocystes, résultent de la phase sexuée du cycle de développement de *T. gondii* qui se déroule chez le chat.

Les oocystes, ovoïdes, mesurant 9 x 14 microns, sont rejetés dans le milieu extérieur avec les excréments du chat. Ils contiennent deux sporocystes qui, après maturation, renferment chacun 4 sporozoïtes. Entourés d'une double paroi, les oocystes sont des éléments extrêmement résistants. Ils demeurent infestants plus d'un an lorsqu'ils sont enterrés dans un sol humide et résistent plusieurs mois à des températures glaciales.

Les sporozoïtes ressemblent morphologiquement aux tachyzoïtes mais ils contiennent plus de micronèmes et de rhoptries (Sheffield et Melton, 1970).

1.2.2. Cycle évolutif (Fig 2), (Dubey et Beattie, 1988)

Les stades tachyzoïte et bradyzoïte sont les constituants essentiels de la **phase asexuée** du cycle de développement de *T. gondii* qui s'opère aussi bien chez l'hôte définitif, le chat, que chez les hôtes intermédiaires (tous les animaux à sang chaud). Le parasite se multiplie par endodyogénèse, de façon rapide et indéfinie (tachyzoïte) ou par des divisions lentes (bradyzoïte) à l'intérieur des kystes dans les tissus nerveux et musculaires.

La phase sexuée se déroule uniquement chez l'hôte définitif, le féliné.

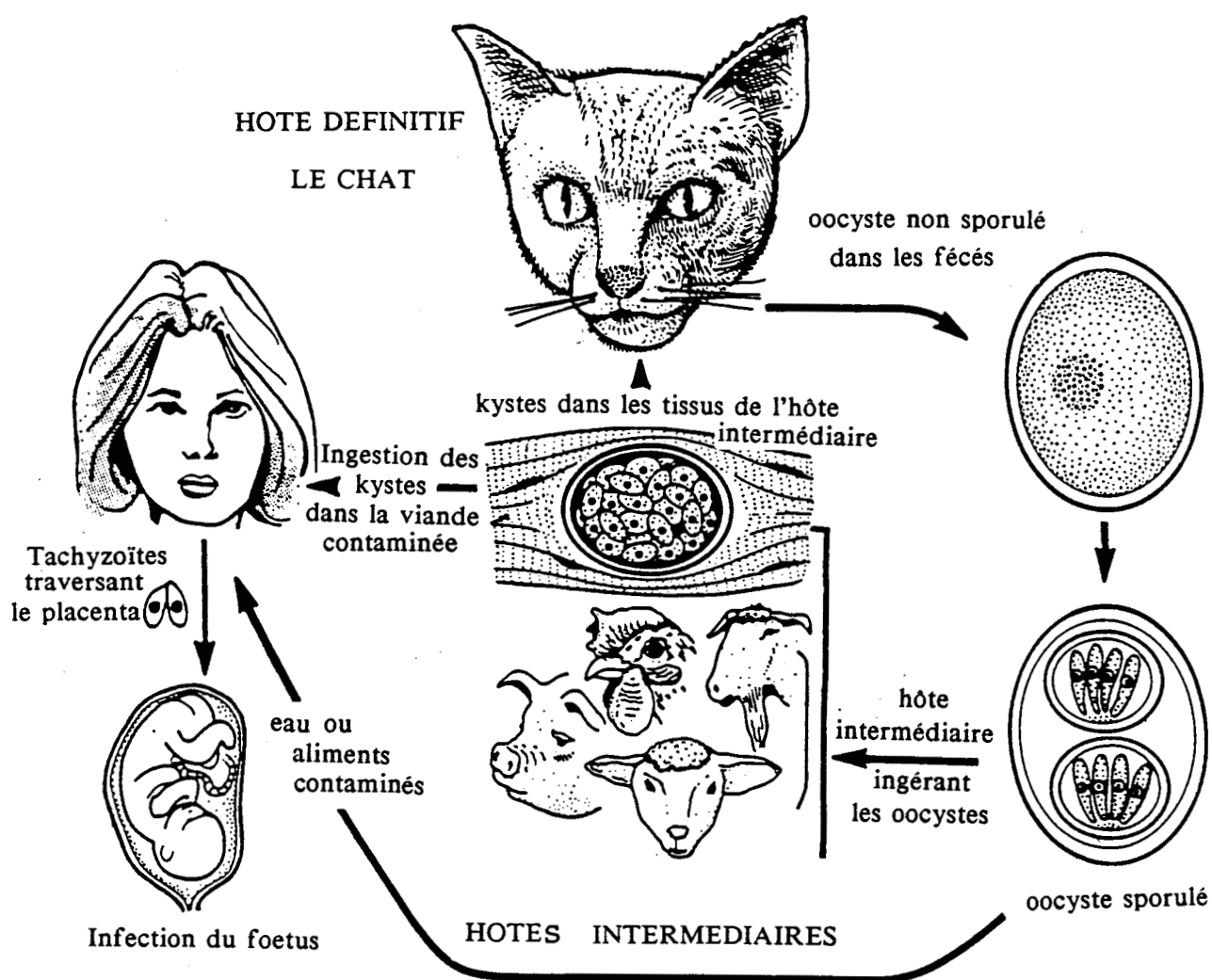
Après ingestion des kystes par le chat, leur paroi est détruite sous l'effet des protéases de l'estomac et de l'intestin grêle, libérant ainsi les bradyzoïtes qui pénètrent alors dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ils subissent plusieurs multiplications schizogoniques, produisant des formes multinucléées, les schizontes, qui après division de leur cytoplasme, donnent naissance à une quinzaine de mérozoïtes. Après éclatement de la cellule-hôte, chacun de ces mérozoïtes peut pénétrer dans une autre cellule de l'épithélium intestinal. Les mérozoïtes évoluent alors en gamétocytes, éléments sexués: les microgamétocytes (éléments mâles sphériques, d'environ 10 microns de diamètre) subissent des divisions nucléaires qui aboutissent à la formation de 12 à 32 microgamètes falciformes biflagellés et les macrogamétocytes de 5 à 7 microns de diamètre deviennent des macrogamètes (éléments femelles) demeurant sous la couche des microvillosités de la cellule-hôte. Après fécondation par un microgamète, chaque macrogamète donne naissance à un oocyste.

La période de latence conduisant à l'élimination des oocystes est variable suivant l'infestation du chat. Elle est de 3 à 6 jours suite à l'ingestion de nombreux kystes, de 4 à 10 jours par ingestion de rares kystes et de 20 à 40 jours par ingestion d'oocystes (Frenkel, 1988).

1.3. La toxoplasmose

La toxoplasmose résulte de deux modes de contamination différents. L'infestation peut s'effectuer par voie orale, conduisant alors à **deux formes de toxoplasmose acquise cliniquement distinctes chez les sujets immunocompétents et chez les immunodéprimés** ou par voie transplacentaire, entraînant la **toxoplasmose congénitale**.

FIGURE 2

CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE *TOXOPLASMA GONDII*

(d'après Dubey et Beattie, 1988)

1.3.1. La toxoplasmose acquise

L'infestation s'opère par voie orale; elle résulte de l'ingestion de viandes crues ou saignantes contenant des kystes ou d'aliments souillés par des oocystes éliminés avec les déjections de chats parasités.

Les bradyzoïtes ou les sporozoïtes issus des oocystes pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin. Ils se multiplient en donnant naissance à des tachyzoïtes qui sont disséminés dans tout l'organisme par voie lymphatique et sanguine. Ils sont capables d'infecter toutes les cellules excepté les hématies (Wolfson, 1941; Schupp et coll., 1978). A ce stade de la maladie, la toxoplasmose, généralement asymptomatique, peut s'accompagner d'un état fébrile et de fatigue générale avec parfois des lymphadénopathies localisées le plus souvent au niveau de la chaîne cervicale postérieure (Revol, 1964). Des manifestations d'hépatomégalie ou de splénomégalie sont très rares et l'évolution est toujours favorable.

Progressivement, au fur et à mesure de l'apparition des anticorps spécifiques, les formes circulantes disparaissent et la parasitémie diminue. Les tachyzoïtes sont lysés dès qu'ils sont libérés de leur cellule-hôte. Cependant, dans certains organes pauvres en anticorps (muscles striés et cardiaque, cerveau, rétine), le stade enkysté de la vie du parasite se développe parallèlement à l'installation de l'immunité. La toxoplasmose chronique remplace alors la phase aiguë de la maladie.

La présence des kystes qui peuvent persister durant toute la vie de l'hôte, est habituellement asymptomatique. Chez les individus immunocompétents, lorsqu'un kyste se rompt, les bradyzoïtes libérés sont immédiatement détruits par les anticorps spécifiques et les macrophages immuns (Ferguson et coll., 1989).

Par contre, chez les patients présentant un déficit immunitaire, dû à un traitement immunosupresseur (Ruskin et Remington, 1976; Shepp et coll., 1985) ou au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Luft et coll., 1984; Araujo et Remington, 1987; Holliman, 1988), une toxoplasmose latente peut conduire à de graves complications pouvant leur être fatales. Chez ces patients les bradyzoïtes peuvent en effet reprendre activement leur multiplication sous forme de tachyzoïtes, suite à une rupture des kystes (Israelski et Remington, 1988).

D'après McCabe et Remington (1988), 30 % des patients atteints du SIDA et ayant des anticorps anti-toxoplasme développeraient une encéphalite toxoplasmique, causée par la réactivation de foyers d'infection latente. Chez la plupart de ces patients, il n'y a pas d'augmentation de la réponse humorale typique qui serait caractéristique d'une infection aiguë, ce qui rend le diagnostic sérologique difficile et indéterminé (Luft et coll., 1984). Selon Luft et Remington (1988), en 1991, le nombre des cas d'encéphalite par toxoplasme, chez les patients atteints du SIDA, sera compris entre 20 000 et 40 000, aux Etats-Unis seulement. Des encéphalites toxoplasmiques peuvent de même se développer suite aux traitements immunosuppresseurs chez les receveurs de greffes de moelle osseuse ou de transplantations d'organes (Araujo et Remington, 1987). En outre, d'autres organes peuvent être affectés par le toxoplasme chez les immunodéprimés. Ainsi, des cas de toxoplasmose pulmonaire sont souvent observés (Catterall et coll., 1986a; Derouin et coll., 1989) avec présence de toxoplasmes dans le liquide broncho-alvéolaire. Des toxoplasmes ont été également isolés à partir du fluide péritonéal d'un malade atteint du SIDA (Israelski et coll., 1988).

1.3.2. La toxoplasmose congénitale (Ambroise-Thomas et Garin, 1984)

Quand l'infestation par *T. gondii* survient en cours de grossesse, elle peut se transmettre au fœtus par la voie transplacentaire.

En théorie, le passage des parasites à travers la barrière placentaire n'est possible qu'à partir de la mise en place de la circulation foetale (21ème jour) et dans la mesure où il existe des anomalies placentaires, mêmes minimes, indépendantes de la toxoplasmose. Ceci explique qu'environ 40 % seulement des toxoplasmoses maternelles soient transmises au fœtus. Par ailleurs, le risque de transmission materno-foetale est d'autant plus grand que le placenta est développé. Ce risque augmente au-delà du 4ème mois de grossesse alors qu'au contraire, la transmission est rare durant le premier trimestre.

Si la transmission se produit pendant le premier quadrimestre, la toxoplasmose congénitale peut aboutir à un avortement spontané, ou causer des atteintes très graves chez l'enfant, au niveau du système neuro-oculaire (hydrocéphalie, calcifications intracrâniennes,

retard psychomoteur, microphthalmie, chorioretinite, cataracte). Suite à une contamination plus tardive, au-delà du 4ème mois, le nouveau-né peut être atteint d'encéphalomyélite dont les signes cliniques existent ou non à la naissance, de retard psychomoteur et d'apparition souvent tardive d'un foyer de chorioretinite pigmentaire à tendance récidivante. On observe surtout à la naissance des formes de toxoplasmose inapparentes ou infra-cliniques dont la traduction est uniquement sérologique. Il est important de les dépister très précocement et de les traiter afin d'éviter une évolution ultérieure.

2. L'IMMUNITE DANS LA TOXOPLASMOSE

2.1. Les antigènes de *T. gondii*

L'identification et la caractérisation des antigènes responsables de la réponse immunitaire sont importantes à la fois pour le diagnostic et pour la réalisation d'un vaccin. Au cours des années précédentes, l'utilisation d'anticorps monoclonaux et l'universalisation des techniques telles que l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, les radiomarquages et l'immunoélectrotransfert ont abouti à l'identification d'un grand nombre d'antigènes de *T. gondii* dont les poids moléculaires (P.M.) varient de 4000 à 800 000 daltons.

Les antigènes du stade tachyzoïte sont les plus étudiés et peuvent être classés en antigènes solubles, antigènes membranaires et antigènes d'excrétion-sécrétion.

2.1.1. Les antigènes solubles

Ces antigènes sont souvent obtenus et caractérisés à partir de la fraction soluble issue du traitement par les ultra-sons ou par des cycles de congélation et de décongélation des tachyzoïtes.

Par électrophorèse en gel de polyacrylamide d'un extrait soluble de tachyzoïtes de la souche virulente RH, Johnson et coll. (1981) ont identifié 9 polypeptides de P.M. 20, 22, 23, 29, 66, 69, 90, 98 et 133 kDa. Plus tard, cette même équipe décrit l'obtention d'un anticorps monoclonal (FMC 20) qui ne réagit pas en immunofluorescence indirecte avec les parasites intacts, mais réagit avec l'extrait soluble de tachyzoïtes dans un test d'hémagglutination

indirecte (Johnson et coll., 1983a). Cet anticorps monoclonal reconnaît un antigène cytoplasmique de 98 kDa (Johnson et coll., 1983b).

En 1980, Handman et Remington ont rapporté l'obtention d'un anticorps monoclonal (F3G3), incapable de se fixer au complément et sans pouvoir agglutinant, apparemment dirigé contre un antigène cytoplasmique. Le transfert passif de cet anticorps monoclonal ainsi que l'immunisation avec l'antigène correspondant protègent les souris contre l'infestation avec les tachyzoïtes d'une souche moyennement virulente (C56) de *T. gondii* (Sharma et coll., 1984). Cet anticorps monoclonal reconnaît deux protéines de 28 et 58 kDa (Sibley et Sharma, 1987); le gène codant pour l'antigène de 28 kDa a été cloné et séquencé (Prince et coll., 1989).

En 1989, Omata et coll. ont identifié un antigène apparemment cytoplasmique de 20 kDa, spécifique des bradyzoïtes et commun à plusieurs souches de *T. gondii*.

2.1.2. Les antigènes membranaires

Parmi les antigènes membranaires, ce sont les protéines accessibles à l'iodation qui ont été les plus étudiés. Le travail de référence dans ce domaine est celui de Handman et Remington (1980) qui ont identifié 4 antigènes majeurs de surface du tachyzoïte (43, 35, 27 et 14 kDa), par immunoprécipitation des antigènes radioiodés à l'aide d'anticorps monoclonaux et de sérums immuns. Ces antigènes semblent être communs aux différentes souches de *T. gondii* (Handman et coll., 1980). De plus, il a été démontré que le transfert passif d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de 35 et 14 kDa (Johnson et coll., 1983c) ainsi que l'immunisation par les fractions antigéniques de 35 et 14 kDa éluées à partir de gels de polyacrylamide (Araujo et Remington, 1984) induisent des protections significatives, chez la souris.

L'analyse par immunoélectrotransfert des antigènes membranaires des tachyzoïtes extraits par les détergents SDS (sodium dodecyl sulfate) et déoxycholate, vis-à-vis de sérums immuns, a permis l'identification de deux protéines de 22 et 32 kDa ainsi que d'un composant de 6 kDa de nature glycosidique (Sharma et coll., 1983). Des mutants viables

dépourvus de l'antigène de 22 kDa ont pu être sélectionnés, grâce à leur résistance à l'activité parasiticide d'un anticorps monoclonal anti-P22 (Kasper et coll., 1982).

Parmi les antigènes de surface du tachyzoïte accessibles à l'iodation, les auteurs ont décrit une molécule de 27 à 30 kDa qui représente 3 à 5% des protéines parasitaires (Kasper et coll., 1983) et qui est reconnue par des anticorps monoclonaux et par les sérums polyclonaux d'infections humaine et expérimentales, aiguës ou chroniques (Handman et Remington, 1980; Handman et coll., 1980; Sethi et coll., 1980; Sharma et coll., 1983; Kasper et coll., 1983; Rodriguez et coll., 1985). Cet antigène majeur, dénommé P30, a été purifié (Kasper et coll., 1983) et a servi, chez la souris, à des essais de protection non concluants (Kasper et coll., 1985). Un clone mutant de tachyzoïtes, exprimant une quantité fortement réduite d'antigène P30 a été sélectionné. Ce mutant est résistant à l'action lytique de trois des quatre anticorps monoclonaux anti-P30 et l'auteur a démontré l'existence de plusieurs polypeptides P30 de différents points isoélectriques, 5,6, 5,3 et 4,7 (Kasper, 1987). Par ailleurs, la séquence complète de P30 a été établie à partir du clonage et de l'analyse de son gène (Burg et coll., 1988).

Plus récemment, à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de surface des tachyzoïtes, Couvreur et coll. (1988) ont confirmé 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. Les quatre antigènes majeurs de surface se trouvent ancrés dans le complexe membranaire du parasite, par des structures glycosyl-phosphatidylinositol (Tomavo et coll., 1989).

Des études comparatives des différents stades infectieux de *T. gondii* ont démontré des différences antigéniques dans leur structure membranaire. Ainsi, deux antigènes de 67 et 25 kDa ont été identifiés comme étant caractéristiques de la membrane du sporozoïte et de la paroi de l'oocyste (Kasper et coll., 1984). Par contre, des anticorps monoclonaux réagissant avec les antigènes majeurs de surface du tachyzoïte, P22 et P30, ne reconnaissent pas les épitopes correspondants à la surface des sporozoïtes et des bradyzoïtes (Kasper, 1989).

2.1.3. Les antigènes d'excrétion-sécrétion

Au cours de certaines infections parasitaires naturelles ou expérimentales, des molécules très immunogènes possédant souvent des activités enzymatiques variées, sont excrétées ou sécrétées par les parasites. Ces antigènes qui sont parfois exprimés transitoirement à la surface du parasite peuvent constituer de bons candidats à l'immunoprophylaxie (Capron et Dessaint, 1988). Dans la toxoplasmose, deux observations confortent cette hypothèse: la première démontre que les antigènes de sécrétion constituent la majorité des antigènes circulants détectables tout au début de l'infection, suggérant une reconnaissance précoce par le système immunitaire (Hughes et Van Knapen, 1982); la deuxième démontre que les antigènes de sécrétion induisent une stimulation lymphocytaire plus spécifique que celle provoquée par les antigènes somatiques (Hughes et coll., 1985).

- **Les antigènes de rhoptries:** Comme les rhoptries sont les organites sécrétoires du toxoplasme impliqués dans l'invasion de la cellule-hôte, il nous paraît raisonnable de les classer parmi les antigènes d'excrétion-sécrétion. Un facteur sécrété par *T. gondii* ou provenant du surnageant de cultures cellulaires infectées par ce parasite peut augmenter considérablement la capacité de pénétration du parasite dans les cellules hôtes (Lycke et Norrby, 1966; Lycke et coll., 1968; Norrby, 1970). Ce facteur, appelé PEF ("Penetration Enhancing Factor"), semble être spécifiquement sécrété par les rhoptries, durant l'invasion de la cellule-hôte (Lycke et coll., 1975). Ajouté au milieu de culture, le PEF augmente le pourcentage de cellules infectées et le nombre de parasites par cellule (Norrby, 1971).

Au cours des dernières années, des anticorps monoclonaux spécifiques des rhoptries ont été produits (Schwartzman, 1986; Sadak et coll., 1988; Schwartzman et Krug, 1989). Parmi ces anticorps qui reconnaissent des antigènes de rhoptries de P.M. 43 à 60 kDa, certains sont capables de réduire l'infectivité des toxoplasmes vis-à-vis des cellules et semblent donc être dirigés contre le PEF (Schwartzman, 1986).

Sadak et coll. (1988) ont démontré que des antigènes de rhoptrie, de P.M. 55 et 60 kDa sont de plus communs aux différents stades infectieux du parasite, tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte.

- **Les exo-antigènes** décrits dans la littérature sont obtenus à partir des surnageants de cultures de cellules infectées par le parasite (Desgeorges et coll., 1980; Hughes et Van Knapen, 1982; Chumpitazi et coll., 1983; Roques et coll., 1986; Chumpitazi et coll., 1987). Ces antigènes dont les poids moléculaires varient de 6 à 800 kDa (Roques et coll., 1986), peuvent être utilisés dans des tests cutanés de détection de l'immunité anti-toxoplasmique (Ambroise-Thomas et coll., 1982).

- **Les antigènes excrétés-sécrétés**: Comme les préparations classiques d'exo-antigènes contiennent des quantités non négligeables de protéines cellulaires, ce qui ne permet pas les immunisations dans de bonnes conditions, le but de notre travail a été de mettre au point des procédés d'obtention d'antigènes excrétés-sécrétés (AES) en milieu acellulaire, afin de caractériser ces antigènes et d'en évaluer le rôle protecteur.

2.2. L'immunité protectrice

L'infection par *Toxoplasma gondii* induit une réponse immunitaire protectrice contre la réinfection (Remington et Krahenbuhl, 1982). Bien que l'action des différentes composantes, humorale et cellulaire, soit complémentaire, leur rôle respectif dans la limitation du parasitisme au cours du stade actif de la maladie ainsi que dans le maintien, chez les différents hôtes, de l'immunité protectrice acquise n'est que partiellement connu.

2.2.1. L'immunité humorale

Bien que l'infection par *T. gondii* suscite des titres élevés d'anticorps anti-toxoplasme chez l'homme ainsi que chez les animaux, la réponse humorale à elle seule, ne semble souvent pas suffisante pour enrayer la maladie. En 1966, Huldts a essayé de vacciner des lapins à l'aide de toxoplasmes tués par la chaleur. Malgré les titres importants d'anticorps obtenus chez ces lapins (équivalents à ceux trouvés chez les lapins contrôles immunisés par une primo-infection), ils n'ont pas résisté à l'infestation par une souche virulente du parasite alors que les lapins contrôles ont survécu. D'autre part la prémunition associée à une toxoplasmose

chronique et latente peut être supprimée chez des hamsters par un traitement avec des corticoïdes, alors que les titres en anticorps restent élevés (Frenkel, 1967).

La participation de la réponse humorale dans l'immunité protectrice envers *T. gondii* a été surtout étudiée par des expériences de transfert passif d'anticorps spécifiques, chez différents modèles expérimentaux et en particulier chez la souris. Le transfert passif de sérums anti-toxoplasme ou d'anticorps monoclonaux confère aux souris une protection significative contre des parasites de virulence modérée (Krahenbuhl et coll., 1972a; Masihi et Werner, 1978; Johnson et coll., 1983c; Sharma et coll., 1984). Néanmoins, la résistance aux souches de haute virulence de *T. gondii* est plus faible (Nakayama, 1965; Foster et McCulloch, 1968; Gill et Prakash, 1970; Johnson et coll., 1983c); ainsi, le transfert passif d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de *T. gondii* peut induire une certaine résistance contre une infection léthale chez la souris (Johnson et coll., 1983c). De même chez le cobaye, le transfert passif de sérum anti-*T. gondii* induit une protection partielle contre l'infection par la souche virulente RH du parasite (Pavia, 1986).

Les anticorps peuvent détruire les toxoplasmes par différents mécanismes, selon que les parasites sont intracellulaires ou extracellulaires. *In vitro*, en milieu acellulaire, des anticorps spécifiques présents dans les sérums de sujets infectés lysent les toxoplasmes par action directe en présence de complément (Sabin et Feldman, 1948), alors que *in vivo*, en situation intracellulaire, ces parasites échappent aux effets des anticorps circulants.

Il a été montré chez la souris que les anticorps jouent un rôle important dans la destruction des toxoplasmes par les macrophages. En effet, les toxoplasmes vivants entrent activement dans les macrophages de souris non-immune (Nichols et O'Connor, 1981), où ils se multiplient dans les phagosomes modifiés dont la fusion avec les lysosomes est inhibée (Bloom, 1979). Cependant, si les parasites sont préalablement traités par du sérum décomplémenté de souris immunisée ou par des anticorps monoclonaux anti-toxoplasme (il s'agit surtout d'anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes de surface du parasite), ils sont opsonisés et la fusion des phagosomes avec les lysosomes n'est plus inhibée, ce qui entraîne leur destruction (Jones et coll., 1975; Anderson et coll., 1976a; Sethi et Brandis, 1981; Hauser et Remington, 1981). Des mécanismes oxygène-dépendants semblent intervenir

dans l'action parasiticide des macrophages vis-à-vis des toxoplasmes recouverts d'anticorps. L'activation de l'enzyme NADP(H)-oxydase dans la membrane plasmique des macrophages, l'internalisation de cette enzyme et sa détection dans la membrane de la vacuole parasitophore, durant le processus d'ingestion des toxoplasmes opsonisés par des anticorps spécifiques, sont en faveur de l'augmentation de l'activité oxydative de ces macrophages (De Carvalho et De Souza, 1990). D'autre part, les toxoplasmes opsonisés par des anticorps spécifiques entraînent l'acidification de la vacuole parasitophore, ce qui détruit les parasites. Cette acidification pourrait être également associée à l'activation de l'enzyme NADP(H)-oxydase avec libération de radicaux superoxyde et d'ions H^+ (Sibley et coll., 1985a).

Les anticorps sériques jouent ainsi un rôle non négligeable dans la défense de l'organisme, mais un équilibre délicat entre la réponse humorale et l'immunité à médiation cellulaire est nécessaire pour le contrôle efficace de l'infection par le toxoplasme.

2.2.2. L'immunité à médiation cellulaire

Les réponses immunes à médiation cellulaire ont été démontrées, au cours de la toxoplasmose, par la mise en évidence d'un état d'hypersensibilité retardée vis-à-vis des antigènes du toxoplasme (Krahenbuhl et coll., 1971). La mise au point des tests de transformation lymphoblastique antigène-spécifique, chez les sujets porteurs de toxoplasmose chronique (Krahenbuhl et coll., 1972b), a permis d'analyser et de quantifier la réponse lymphocytaire induite par *Toxoplasma gondii*.

Le rôle protecteur des lymphocytes a été mis en évidence par Frenkel, en 1967. Cet auteur a en effet démontré que le transfert de cellules spléniques et ganglionnaires provenant de hamsters immuns confère à d'autres hamsters une immunité adoptive contre l'infection primaire par la souche virulente RH de *T. gondii*. Pavia (1986) a observé des protections partielles, chez des cobayes infestés par *T. gondii*, grâce au transfert passif de préparations spléniques et ganglionnaires enrichies en lymphocytes T immuns. Suzuki et Remington (1988) ont obtenu une protection complète vis-à-vis de la souche modérément virulente C56, chez des souris ayant reçu des cellules spléniques de souris immunisées avec des toxoplasmes provenant d'un clone mutant thermosensible (mutant ts-4, dérivé de la souche non kystogène

RH; Pfefferkorn et Pfefferkorn, 1976); ils ont démontré la responsabilité des deux types de lymphocytes, T auxiliaires ("helper") et T cytotoxiques, dans la résistance contre *T. gondii*.

Alors que le rat est naturellement résistant à l'infection par *T. gondii*, le rat génétiquement athymique ("Nude") ne survit pas à l'infection par ce parasite. Cependant, le transfert de lymphocytes T de rats euthymiques aux rats "Nude" restaure de façon dose-dépendante, leur résistance à cette infection. En effet, le transfert de 5×10^6 cellules lymphocytaires non spécifiques restaure leur résistance à l'infection par la souche virulente RH (Santoro et coll., 1987).

Les lymphocytes T interviennent par différents mécanismes dans la résistance contre *Toxoplasma gondii*. Ainsi, *in vitro*, l'antigène membranaire P30 peut induire une réponse lymphocytaire T cytotoxique qui entraîne directement la lyse des parasites extracellulaires (Khan et coll., 1988). Outre le rôle majeur des lymphokines dans l'activation des macrophages (voir ci-dessous), il a été démontré qu'un traitement par l'interleukine 2 (IL2) protège les souris de façon significative contre l'infection par une souche moyennement virulente de toxoplasme (C56) (Sharma et coll., 1985). Un transfert adoptif de lymphocytes T auxiliaires spécifiques d'antigènes de toxoplasmes peut induire une production d'anticorps de type IgG ou IgE, chez les rats athymiques (Duquesne et coll., 1990).

Cependant, les cellules effectrices principalement responsables de la destruction des toxoplasmes sont les macrophages. Hormis l'activation par les anticorps spécifiques, les macrophages peuvent être activés par des lymphokines (Anderson et coll., 1976b; Nagasawa et coll., 1980), et tout particulièrement par l'interféron gamma (Nathan et coll., 1983; Black et coll., 1987; Suzuki et coll., 1988).

Chez la souris, l'activité parasiticide des macrophages stimulés par les lymphokines est essentiellement due à une augmentation de leur activité oxydative qui se traduit par la libération de dérivés oxygénés tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Murray et coll., 1985a) et par la fusion des lysosomes avec la vacuole parasitophore (Sibley et coll., 1985b). En effet, ces auteurs ont démontré qu'un apport exogène de superoxyde dismutase ou de catalase qui provoquent la décomposition des peroxydes peut inhiber la fusion entre les lysosomes et les vacuoles parasitophores des macrophages péritonéaux murins activés par des

lymphokines (mécanisme oxygène-dépendant). Cependant, la réplication des tachyzoïtes intracellulaires qui auraient résisté à l'initiale activité microbicide des macrophages activés est inhibée par un mécanisme oxygène-indépendant puisqu'un apport exogène de catalase ou de superoxyde dismutase n'affecte pas le nombre de parasites qui survivent, 18 h après l'infestation des cellules.

Contrairement à la souris, chez le rat, la résistance naturelle contre l'infection par *T. gondii* semble être due en partie aux macrophages qui, en l'absence de toute activation, mettent en jeu un mécanisme essentiellement non-oxydatif pour détruire les parasites (Catterall et coll., 1986; McCabe et Remington, 1986).

Enfin, chez l'homme, les macrophages alvéolaires et péritonéaux non stimulés peuvent éliminer les toxoplasmes par un mécanisme essentiellement non-oxydatif (Catterall et coll., 1987). De plus, cette capacité parasiticide naturelle augmente quand les cellules phagocytaires sont stimulées par l'interféron gamma et s'opère selon deux mécanismes, oxydatif et non-oxydatif (Murray et coll., 1985b). Cependant, la production de l'interféron gamma par les lymphocytes immuns T "helper" stimulés par *T. gondii* semble être, elle-même, modulée par d'autres lymphokines comme l'IL2 (Kelly et coll., 1987) et l'IL1 (Kelly et coll., 1989).

D'autres cellules effectrices interviennent vraisemblablement dans l'immunité protectrice contre *Toxoplasma gondii*. Ainsi, des plaquettes de rats immuns protègent le rat "Nude" de façon significative, contre l'infection par *T. gondii* (Ridel et coll., 1988).

Une activation des cellules NK au cours de la toxoplasmose aiguë ou chronique a été démontrée chez la souris par des tests de cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis du lymphome YAC-1 (Hauser et coll., 1982; Sharma et coll., 1985). De plus, les cellules NK provenant de souris infectées depuis 3 jours par la souche RH de *T. gondii* sont, *in vitro*, fortement cytotoxiques pour les tachyzoïtes extracellulaires (Hauser et Tsai, 1986). Ces résultats suggèrent un certain rôle pour les cellules NK dans la limitation de la parasitémie au premier stade de l'infection. Cependant, les cellules NK humaines activées par l'IL2 recombinante ne semblent pas cytotoxiques pour les tachyzoïtes de la souche RH, même opsonisés par des anticorps spécifiques. Par contre, des cellules LAK ("Lymphokine Activated Killer") qui sont des lymphocytes devenus cytotoxiques suite à une culture *in vitro* à court terme en présence

d'IL2 et qui sont de fonction et de phénotype similaire aux cellules NK, ont une cytotoxicité significative vis-à-vis des tachyzoïtes (Dannemann et coll., 1989). Enfin, Zychlinsky et coll. (1990) ont récemment démontré qu'une population homogène de cellules LAK est incapable de détruire les macrophages infectés par *T. gondii* bien qu'elle soit cytotoxique pour les cellules tumorales YAC-1.

3. LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE

3.1. Le diagnostic

Les signes cliniques étant souvent absents, le diagnostic de la toxoplasmose est couramment établi selon deux critères différents: (1) la recherche du parasite dans les tissus infectés ou les liquides biologiques, ou (2) par des méthodes sérologiques, mettant en évidence des anticorps spécifiques ou des antigènes circulants dans le sérum et les liquides biologiques.

3.1.1. Diagnostic par la recherche du parasite

La présence des parasites est recherchée, dans les cas de toxoplasmose congénitale ou de toxoplasmose évolutive chez les patients immunodéprimés, sur des prélèvements biologiques tel que le sang de cordon, le liquide amniotique, le placenta, les liquides céphalo-rachidien et broncho-alvéolaire. Cette recherche qui fait généralement appel à l'inoculation de tissus infectés à des souris (Desmonts et coll., 1985) ou à des cultures cellulaires (Derouin et coll., 1987) nécessite des techniques longues et laborieuses.

Une nouvelle technique de diagnostic basée sur la recherche du parasite dans les prélèvements biologiques par amplification enzymatique *in vitro* de l'ADN permet de détecter des quantités infimes d'ADN parasitaire. Il s'agit de la technique de réaction en chaîne de la polymérase appelée P.C.R. ("Polymerase Chain Reaction"), fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase thermorésistante permettant d'amplifier les séquences d'ADN jusqu'à un facteur de 2×10^5 (Saiki et coll., 1985). L'application de la P.C.R. a permis de détecter un gène spécifique de *T. gondii* dans un mélange d'ADN provenant de 10 parasites

en présence de 100 000 leucocytes humains (Burg et coll., 1989); l'amplification d'une partie du gène de P30 a permis de détecter moins de 0,5 pg d'ADN toxoplasmique (Savva et coll., 1990). Dans un avenir proche, cette nouvelle technique, actuellement en cours d'évaluation, sera probablement une méthode de choix pour le diagnostic précoce des réactivations toxoplasmiques chez les immunodéprimés et des cas de toxoplasmose congénitale. Il faut cependant être conscient des limites de cette technique dont la sensibilité extrême pourrait mettre en défaut la spécificité.

3.1.2. Diagnostic sérologique

Les techniques de diagnostic utilisées le plus fréquemment de nos jours sont des tests sérologiques basés sur la recherche d'anticorps spécifiques. Certaines techniques permettent de détecter les anticorps anti-*T. gondii* d'isotype IgM ou IgA, généralement observés dans les cas de toxoplasmose aiguë, acquise ou congénitale; d'autres déterminent l'existence d'anticorps spécifiques d'isotype IgG (sans réponse IgM et IgA), marqueurs de toxoplasmose chronique et d'immunité à la réinfection.

Le test de lyse ("dye test") décrit en 1948 par Sabin et Feldman est la technique de référence servant à étalonner des sérums de l'OMS titrés en unités internationales. Il a pour principe la mise en évidence de la lyse des toxoplasmes exposés aux anticorps spécifiques en présence de complément.

Les tests d'immunofluorescence indirecte utilisant un conjugué fluorescent anti-IgG (Walton et coll., 1966) ou un conjugué anti-IgM (Remington et coll., 1968), sont des réactions encore couramment utilisées.

D'autres techniques, basées sur l'agglutination directe des toxoplasmes ou l'hémagglutination indirecte de globules rouges recouverts d'antigènes de *T. gondii* (Jacobs et Lunde, 1957) en présence des sérums, avant et après traitement au 2-mercaptoéthanol (qui dissocie les IgM), permettent de quantifier les anticorps IgM spécifiques.

Ces différentes techniques, à l'exception du "dye test", se heurtent à la détection de faux négatifs (par un phénomène de compétition au niveau des sites antigéniques non

accessibles aux IgM quand le taux d'IgG est élevé) et de faux positifs (interférence possible avec les facteurs rhumatoïdes et les IgM naturelles).

Une technique d'agglutination réverse (ISAGA), décrite par Desmonts et coll. (1981), semble être très spécifique et sensible pour la détection des IgM anti-*T. gondii*. Ce test consiste à adsorber sur une plaque, des anticorps anti-IgM qui piègeront les IgM du sérum à tester; une suspension de tachyzoïtes est ensuite ajoutée: les parasites s'agglutinent s'il existe des IgM spécifiques dans le sérum.

Les réactions immunoenzymatiques (ELISA) ont été appliquées au diagnostic de la toxoplasmose, dès 1976 (Voller et coll.). Des techniques d'immunocapture enzymatique permettent de piéger toutes les IgM sériques (comme en ISAGA), puis une révélation spécifique permet de ne détecter parmi elles, que les IgM anti-*Toxoplasma*. Ces techniques se différencient de l'ISAGA, par l'utilisation d'extrait antigénique de toxoplasme (à la place des parasites entiers) et par la révélation de la réaction qui s'effectue avec des immunoglobulines anti-toxoplasme couplées à une enzyme (Naot et Remington, 1980; Cesbron et coll., 1985).

Une technique d'immunoélectrodifusion suivie d'une immunofiltration avec des anticorps monospécifiques couplés à une enzyme (anti-IgG, IgM, IgA ou IgE), "Enzyme-Linked Immuno-Filtration Assay" (ELIFA) (Pinon et Gruson, 1982), permet de différencier les anticorps IgG, IgM, IgA et IgE et présente un intérêt certain pour le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, par la comparaison des profils immunologiques du sang de la mère et du foetus ou du nouveau-né (Pinon et coll., 1985).

Les IgM peuvent persister pendant plusieurs années après l'infection par *T. gondii* (Thulliez, 1989). Actuellement, la recherche des anticorps IgA et IgE spécifiques qui apparaissent aussi précocément que les IgM, mais qui disparaissent souvent avant les IgM, semble pouvoir apporter des indications diagnostiques supplémentaires (Turunen et coll., 1983; Le Fichoux et coll., 1987; Pinon et coll., 1986 et 1990; Pujol et coll., 1989). Un test d'immunocapture permettant de détecter les IgA dirigées contre l'antigène majeur de *T. gondii*, P30, permet de déceler ces anticorps spécifiques au cours de la phase aiguë de la toxoplasmose acquise (de 1 à 6 mois après l'infection) et dans le cas de la toxoplasmose

congénitale, uniquement chez les enfants contaminés par le parasite pendant la grossesse de leur mère (Decoster et coll., 1988a).

La recherche parallèle des anticorps IgM, IgA et IgE peut ainsi augmenter la validité du diagnostic des toxoplasmoses aiguës et congénitales.

La recherche des antigènes parasitaires circulants peut aussi être d'un intérêt diagnostique considérable, chez les patients immunodéprimés. En effet, ces antigènes sont détectables avant l'apparition des anticorps spécifiques (Van Knapen, 1982) et leur présence est indépendante des capacités immunitaires de l'individu (Candolfi et coll., 1987).

3.2. Le traitement

Le traitement est généralement constitué par l'utilisation d'antibiotiques tels que la spiramycine ou l'association d'un sulfamide (inhibiteur de la synthèse d'acide folique), la sulfadiazine par exemple et d'un inhibiteur de l'enzyme dihydrofolate réductase (qui intervient dans la synthèse des acides nucléiques) comme la pyriméthamine (McCabe et Oster, 1989).

La spiramycine diminue les risques de transmission materno-foetale du toxoplasme, au niveau du placenta. Son utilisation, chez les femmes enceintes, est d'autant plus recommandée qu'elle n'induit pas d'effets secondaires indésirables (Couvreur et coll., 1988).

L'association sulfadiazine-pyriméthamine qui semble plus efficace (Derouin et Chastang, 1989) est utilisée dans les cas de toxoplasmoses congénitales et acquises. Par ce traitement, les formes tachyzoïtes sont tuées mais les formes enkystées ne sont pas éliminées. D'autre part, les sulfamides présentent une grande toxicité chez les patients atteints du SIDA. Chez ces derniers, le traitement de l'encéphalite toxoplasmique peut s'effectuer par une combinaison de pyriméthamine-clindamycine, qui semble être moins toxique mais peu efficace en thérapie à long terme (Westblom et Belshe, 1988; Lepout et coll., 1989).

4. INTERET DES SONDAS ANTICORPS MONOCLONALES

4.1. Historique

La découverte du phénomène d'hybridation cellulaire est attribuée à Barski et coll. (1960) qui ont observé la production spontanée de cellules de caractère "hybride", dans une culture *in vitro* mixte de deux souches de cellules somatiques de souris ayant des marqueurs chromosomiques différents. Cette observation fut confirmée par les travaux de Sorieul et Ephrussi (1961) et par ceux de Gershon et Sachs (1963).

Un système de sélection décrit par Littlefield (1964), a permis la seule multiplication des cellules hybrides issues d'une culture mixte de cellules déficientes en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase, HGPRT⁻ (résistantes à 3 mg/l d'azaguanine) et de cellules déficientes en thymidine kinase, TK⁻ (résistantes à 30 mg/l de 5-bromodeoxyuridine). Ce système de sélection repose sur le fait que les cellules de mammifères possèdent deux voies de synthèse des nucléotides: une synthèse *de novo*, à partir de sucres et d'acides aminés (pouvant être inhibée par l'aminoptérine) et une voie de synthèse utilisant des nucléotides préformés (l'hypoxanthine et la thymidine) nécessitant la présence des enzymes HGPRT et TK (voir Fig 3). Un milieu permettant la sélection des hybrides (TK⁺/HGPRT⁺) parmi les cellules HGPRT⁻/TK⁺ et TK⁻/HGPRT⁺ peut être tout simplement réalisé par incorporation d'hypoxanthine, d'aminoptérine et de thymidine (milieu HAT).

D'autre part, les faibles pourcentages des fusions cellulaires spontanées furent augmentés considérablement par l'utilisation d'agents fusogènes tels que le virus de Sendai inactivé (Yerganian et Nell, 1966) et le polyéthylène glycol (Davidson et Gerald, 1976).

4.2. Les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux

Des lignées de lymphomes B (myélomes), chacune caractérisée par la sécrétion d'une immunoglobuline particulière, ont été établies en culture à partir de cellules tumorales (Seligman et Brouet, 1973; Weigert et coll., 1974). Puis, des variants déficients dans

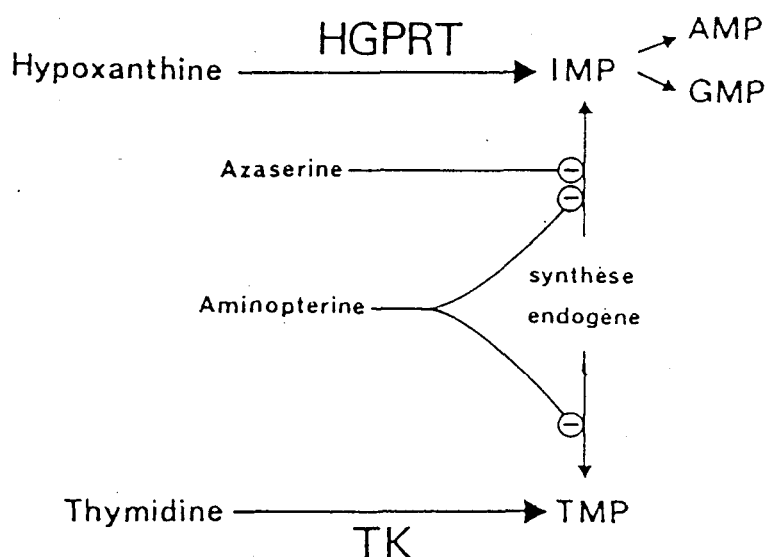


FIGURE 3 — *Principe des sélections d'hybrides reposant sur la réacquisition d'une HGPRT fonctionnelle.*

L'activité HGPRT est indispensable pour la production de nucléotides puriques à partir d'hypoxanthine lorsque la voie endogène de biosynthèse des purines est inhibée. Deux inhibiteurs sont couramment employés : l'aminoptérine et l'azaserine. L'aminoptérine inhibant simultanément la biosynthèse du désoxythymidylate (TMP), son utilisation impose l'addition de thymidine au milieu ; elle contre-sélectionne simultanément les cellules HGPRT⁻ et TK⁻. L'azaserine inhibe spécifiquement la biosynthèse purique ; elle est utilisée pour la sélection d'hybrides entre lymphocytes normaux, qui dégèrent spontanément, et lignées HGPRT⁻.

IMP = inosine-monophosphate ; AMP = adénosine-monophosphate ; GMP = guanosine-monophosphate.

(Buttin G. et Cazenave P.A., 1980)

l'expression de gènes d'immunoglobuline ont été isolés à partir de myélomes cultivés *in vitro* (Köhler et coll., 1976; Shulman et coll., 1978).

Les premières expériences conduisant à la production d'anticorps monoclonaux ont été celles de Köhler et Milstein en 1975. En fusionnant des cellules myélomateuses sensibles au système de sélection de Littlefield (milieu HAT) avec des lymphocytes B de souris immunisée, ils ont obtenu des hybrides cellulaires dont certains synthétisent des anticorps spécifiques de l'antigène utilisé pour l'immunisation.

Ainsi, la fusion d'une cellule de myélome et d'un plasmocyte sécréteur d'anticorps peut être à l'origine d'une cellule hybride conservant la capacité de multiplication indéfinie du myélome; si l'hybride manifeste également la propriété de sécréter l'anticorps monoclonal (AcMc) particulier, un clone sécréteur de l'anticorps peut être engendré.

4.3. Applications et utilisations des anticorps monoclonaux en parasitologie

L'analyse des composants antigéniques est parfois difficile en parasitologie, en raison de la complexité des structures parasitaires et des variations d'expression antigénique qui existent au cours du cycle de vie des parasites. C'est pourquoi les AcMc représentent un outil d'une puissance remarquable. Durant la dernière décennie, les AcMc, associés à d'autres techniques chimiques et immunochimiques ont permis la caractérisation et l'isolement de nombreux antigènes parasitaires. Ils ont servi à étudier les mécanismes de l'immunité anti-parasitaire et ont participé au développement de techniques diagnostiques. Nous pouvons citer quelques exemples.

- Identification, isolement et caractérisation fonctionnelle des antigènes parasitaires:

L'une des applications les plus évidentes des AcMc anti-parasitaires est leur utilisation pour l'identification des déterminants antigéniques spécifiques (de surface, de stade de vie, d'espèce etc). Dans le domaine du paludisme, les AcMc ont apporté une large contribution à la connaissance des antigènes de surface des différentes espèces de *Plasmodium*. Cette approche se trouve remarquablement illustrée dans les études réalisées sur la protéine circumsporozoïte (CSP) spécifique du stade sporozoïte du *Plasmodium*. La structure de

l'épitope immunodominant de *Plasmodium falciparum* a pu être établie par utilisation de techniques d'inhibition de la fixation d'AcMc sur la protéine CS, par différents peptides synthétiques; ces AcMc ainsi que les sérums polyclonaux humains réagissent avec des séquences répétées de structure (Asn-Ala-Asn-Pro)₃ (Zavala et coll., 1985).

Chez *Trypanosoma cruzi*, nous pouvons citer la reconnaissance par un AcMc, d'un antigène spécifique de cette espèce (antigène 5), ce qui permet de différencier *T. cruzi* des autres trypanosomes d'Amérique Latine comme *Trypanosoma rangeli* (Orozco et coll., 1984).

Chez *Toxoplasma gondii*, la caractérisation des antigènes de surface s'est effectuée principalement grâce à l'utilisation d'AcMc (Handman et Remington, 1980; Couvreur et coll., 1988). Les AcMc dirigés contre un antigène majeur de surface des tachyzoïtes (P30), et contre un antigène cytoplasmique de 58 kDa ont permis la purification de ces antigènes par immunoadsorption, respectivement par Kasper et coll. (1983) et Sharma et coll. (1984). Le rôle de ces antigènes dans l'immunité protectrice a pu être étudié par des essais d'immunisation (Kasper et coll., 1985; Sharma et coll., 1984).

Des AcMc dirigés contre les antigènes majeurs de surface de *T. gondii* exercent des pouvoirs lytiques variables sur les tachyzoïtes de souches différentes, ce qui confirme les différences d'expression antigénique à la surface des parasites de souches différentes (Ware et Kasper, 1987).

- Propriétés effectrices des anticorps monoclonaux:

L'une des applications des AcMc est leur utilisation dans l'analyse des mécanismes effecteurs et des mécanismes de régulation de la réponse immune anti-parasitaire.

Les AcMc dirigés contre les antigènes de surface des sporozoïtes de *Plasmodium* ont des propriétés neutralisantes vis-à-vis des sporozoïtes (Zavala et coll., 1985).

Des AcMc spécifiques d'antigènes de surface de tachyzoïte de *Toxoplasma gondii* entraînent la lyse des parasites en présence de complément (Handman et Remington, 1980).

Sur des cultures infectées par des toxoplasmes, des AcMc dirigés contre des antigènes de rhoptries diminuent le nombre de cellules infectées par les parasites. L'auteur suggère la neutralisation du PEF ("Penetration Enhancing Factor") par ces AcMc (Schwartzman, 1986).

Dans le domaine de la schistosomiase, les AcMc ont clairement participé à une meilleure compréhension des mécanismes effecteurs et de leur régulation. En effet, au cours de l'infection expérimentale du rat par *S. mansoni*, deux mécanismes de cytotoxicité dépendante de cellules effectrices et d'anticorps (ADCC) ont été démontrés: l'un dépendant de l'éosinophile et d'anticorps de classe IgG et l'autre faisant intervenir différentes cellules effectrices (éosinophile, macrophage, plaquette) et des anticorps IgE. La stratégie d'AcMc mise en place a d'une part permis l'identification de certains des antigènes cibles de ces mécanismes effecteurs (38 et 26 kDa, respectivement) mais également, la détermination de la nature IgG2a des anticorps dirigés contre l'antigène de 38 kDa qui sont impliqués dans le mécanisme effecteur dépendant de l'éosinophile (Grzych et coll., 1982; Verwaerde et coll., 1987). Par contre, un AcMc d'isotype IgG2c, dirigé lui aussi contre l'antigène de 38 kDa et n'entraînant aucune activité cytotoxique *in vitro* ou *in vivo* présente une activité bloquante des effets de l'anticorps d'isotype IgG2a-anti 38 kDa (Grzych et coll., 1984). Un tel mécanisme de régulation, jusqu'alors non soupçonné, a pu être par la suite retrouvé au cours de la schistosomiase humaine où l'existence d'anticorps bloquants d'isotype IgM et IgG2 corrèle avec une susceptibilité à la réinfection (Khalife et coll., 1986; Butterworth et coll., 1988).

- Applications aux techniques diagnostiques:

Les AcMc peuvent être utilisés dans l'identification des anticorps ou des antigènes circulants marqueurs de l'infection parasitaire. Ainsi, une technique ELISA de dépistage des toxoplasmoses acquises aiguës ou congénitales est basée sur la capture des anticorps IgM du sérum par un sérum polyclonal anti-IgM et sur la sélection des IgM spécifiques par l'addition d'un extrait antigénique enrichi en P30 et d'un AcMc anti-P30 marqué par une enzyme (Cesbron et coll., 1985). La même technique adaptée à la détection des anticorps IgA anti-P30 est en cours de développement (Decoster et coll., 1988a).

MATERIELS ET METHODES

1. LES PARASITES

1.1. Souches de *T. gondii* utilisées

- **Souche RH:** elle a été isolée en 1939, aux USA, d'un enfant mort d'encéphalite toxoplasmique (Sabin, 1941). Depuis 1939, cette souche non kystogène et fortement pathogène pour la souris est entretenue par passages des tachyzoïtes chez cet animal, tous les trois à quatre jours.

- **Souche 76K:** elle a été isolée du cerveau d'un cobaye mort après son arrivée au laboratoire de parasitologie de Marseille en 1963 (Laugier et Quilici, 1970). Les souris inoculées avec le broyat de cerveau du cobaye ont survécu. Leur cerveau était riche en kystes toxoplasmiques. Le passage de cette souche kystogène est assuré par inoculation intrapéritonéale de kystes tous les deux mois à des souris.

1.2. Obtention et entretien des tachyzoïtes

- **Isolement des tachyzoïtes à partir des ascites de souris infectées:** la souche virulente RH de *Toxoplasma gondii* est entretenue dans l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille, chez des souris Swiss/OF1. Les tachyzoïtes sont récoltés en milieu RPMI 1640 (Gibco, Pleasanton, C.A., USA), par lavage intrapéritonéal des souris infectées trois jours auparavant par voie intrapéritonéale. Ils sont ensuite filtrés sur membrane de polycarbonate de porosité 3 μm (Nuclepore, Pleasanton, CA., USA) afin d'éliminer les contaminants cellulaires des ascites de souris.

- **Isolement à partir de cellules en culture:** Les tachyzoïtes provenant de cultures de cellules humaines HEP-2 infectées quatre jours auparavant par la souche RH de *T. gondii* (récoltés par lavage intrapéritonéal de souris infectées) sont filtrés sur membrane de polycarbonate 3 μm .

1.3. Obtention et entretien des kystes

Les bradyzoïtes sont obtenus à partir des kystes de cerveau de souris Swiss/OF1 infectées 2 mois auparavant par voie intrapéritonéale par des kystes de la souche 76 K de *T. gondii*. Les cerveaux de souris infectées sont homogénéisés en tube Potter de 20 ml (Thoma, PENN, USA) et les kystes sont purifiés par centrifugation en gradient discontinu dans une solution de gomme arabique (Nakabayashi et Motomura, 1983). Les kystes purifiés sont alors lavés avec du tampon PBS 10 mM (Na_2HPO_4 7,2 mM, NaH_2PO_4 2,8 mM, NaCl 150 mM, pH 7,2) et remis en suspension dans de l'eau distillée à une concentration de 2×10^5 kystes/ml.

2. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES

2.1. Préparation des extraits antigéniques de tachyzoïtes

2.1.1. Extraction des antigènes solubles

Les tachyzoïtes provenant des ascites de souris infectées sont lavés 3 fois en PBS et le culot parasitaire est remis en suspension dans de l'eau distillée à une concentration de 6×10^8 tachyzoïtes/ml. Cette suspension est soumise à 4 traitements successifs aux ultra-sons, de 1 mn chacun, suivis d'une congélation à -20°C et de 5 passages à la X Press (LKB, Uppsala, Suède). La solution finale est centrifugée à 32 000 g pendant 2 h. Le surnageant est utilisé par la suite comme source d'antigènes solubles après l'addition de 100 U/ml d'aprotinine (Sigma).

2.1.2. Extraction des antigènes membranaires

Le culot final qui contient les antigènes membranaires est solubilisé par du détergent CHAPS (3-((3-cholamidopropyl)-diméthylammonio)-propansulfonate) (Fluka, Buchs, Suisse): le culot correspondant à 2×10^9 tachyzoïtes est traité par 30 mg de CHAPS dans 5 ml d'une solution d'inhibiteurs des protéases (fluorure de phényl méthyl sulfonyle (PMSF, Sigma) 0,04 mM, acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA, Prolabo, Paris, France) 0,25 mM, N^α -p-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone (TLCK, Sigma) 0,2 mM et N-tosyl-L-phenylalanine

chlorométhyl cétone (TPCK, Sigma) 0,2 mM, en PBS). Cette suspension est incubée pendant une nuit à 4°C, sous agitation, puis centrifugée à 1000 g pendant 10 mn. Le surnageant est filtré sur une membrane Millipore de 0,22 µm (Millipore Corp, Bedford, MA, USA). Il est utilisé par la suite comme source d'antigènes membranaires.

Un mélange de même concentration d'antigènes solubles et membranaires est utilisé par la suite, en tant qu'extrait total de tachyzoïte.

2.1.3. Les antigènes se fixant à la concanavoline A

Une solution contenant 2 mg d'extrait total de tachyzoïtes est passée pendant 1 h sur une colonne constituée par 2 ml de Con A-Sépharose (Pharmacia) préalablement équilibrée par du tampon TNN²⁺ (Tris 10 mM/HCl pH 7,4, NaCl 150 mM, nonidet P40 0,5% (v/v), CaCl₂ 1 mM et MgCl₂ 1 mM). La colonne est ensuite lavée avec 40 ml de tampon TNN²⁺, puis avec 10 ml de galactose 0,2 M en TNN²⁺ afin d'éliminer les fixations non spécifiques à la lectine.

Les molécules fixées à la Con A sont éluées avec 15 ml d'une solution de α-D-méthyl mannopyranoside (Sigma) 0,2 M en TNN²⁺. L'éluat est dialysé pendant 72 h contre du PBS avec de fréquents changements de bain avant d'être concentré à 1 ml auquel 100 UI d'aprotinine sont ajoutées.

2.1.4. Les antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes

Les antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) non marqués, utilisés pour les immunisations animales ainsi qu'en immunoélectrotransfert, sont préparés selon la méthode suivante:

Les tachyzoïtes de la souche RH ($1,5 \times 10^8$) sont incubés pendant 3 h à 37°C sous agitation douce, dans des tubes à essai contenant 1,5 ml de milieu RPMI-1640 avec 10 % de sérum de souris, de rat, d'homme ou de veau (Flow, Paris) décomplémenté par 30 mn d'incubation à 56°C.

La viabilité des tachyzoïtes avant et après l'incubation à 37°C est vérifiée grâce à un test de perméabilité des parasites morts à l'érythrosine B, selon la méthode décrite par Jaffe

et coll. (1984). Un mélange de 0,05 ml de la suspension de tachyzoïtes et de 0,05 ml d'une solution d'érythrosine B à 0,4 % (p/v) dans du PBS est incubé dans un bain de glace, pendant 5 mn. Une goutte est alors déposée sur une lame et examinée à l'aide d'un microscope optique (x400). Les préparations renfermant moins de 20 % de parasites morts sont retenues.

Au bout de 3 h, les tubes contenant les tachyzoïtes sont centrifugés à 1000 g, pendant 10 mn. Les surnageants contenant les AES sont filtrés sur une membrane Millipore 0,22 μm et concentrés 5 fois. Ces préparations, auxquelles sont ajoutées 100 U/ml d'aprotinine, sont conservées à -70°C jusqu'à l'utilisation.

2.2. Préparation de l'extrait de bradyzoïtes

Les kystes sont soumis à 4 traitements successifs aux ultra-sons, de 1 mn chacun, suivis d'une congélation et de 17 passages par la X Press. Après 2 h de centrifugation à 32000 g, le surnageant renfermant les antigènes solubles est récolté puis additionné de 5% (v/v) de PMSF à 40 mM.

Le culot contenant les antigènes membranaires est solubilisé par une solution de détergent CHAPS (75 mg dans 5 ml de solution d'inhibiteurs des protéases) comme précédemment décrit (voir 2.1.2)

L'extrait de bradyzoïtes est reconstitué par un mélange adéquat des fractions soluble et membranaire.

Des cerveaux de souris non-infectées sont traités de la même manière et utilisés pour l'immunisation des souris contrôles.

3. IDENTIFICATION DES ANTIGENES CIBLES DES SERUMS IMMUNS ET DES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'identification des AES immunogènes au cours des toxoplasmoses humaine et expérimentale, ainsi que des molécules portant les déterminants antigéniques reconnus par nos anticorps monoclonaux a été réalisée par les techniques d'immunoprécipitation et

d'immunoélectrotransfert. L'analyse des molécules antigéniques sélectionnées selon ces deux techniques a été réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.

3.1. Préparations des antigènes radiomarqués

3.1.1. Marquage des antigènes de surface des tachyzoïtes par ^{125}I

Les antigènes de surface des tachyzoïtes sont marqués selon la méthode décrite par Howard et coll. (1982), par utilisation d'Iodogène.

Un milligramme d'Iodogène (PIERCE chemical Co) est dissous dans 1 ml de chloroforme. Trois cents μl de cette solution sont transférés dans un tube en verre où le solvant est évaporé sous courant d'azote. Le tube, dans lequel sont ajoutés 2×10^8 tachyzoïtes dans 1 ml de PBS, est placé dans un bain de glace. Le marquage est effectué pendant 10 mn, par l'addition de 26 MBq (0,7 mCi) d' ^{125}I (Amersham, France). Puis le mélange est transféré dans un tube contenant 15 ml d'une solution de PBS renfermant du NaI 5 mM, afin d'arrêter la réaction. Après 3 lavages en PBS-NaI 5 mM, le culot parasitaire est repris dans 1 ml de solution TNE (Tris 10 mM/HCl pH 7,4, EDTA 2 mM, NaCl 0,15 M, nonidet P40 (NP40) 0,5 % et aprotinine 100 U/ml). Après une nuit d'incubation sous agitation, à 4°C, cette suspension est centrifugée pendant 20 mn à 3500 g et le surnageant est conservé à -70°C.

3.1.2. Marquage par ^{125}I des antigènes d'extrait soluble des tachyzoïtes et d'extrait des bradyzoïtes

Ces marquages sont effectués selon la méthode à la chloramine T (Hunter et Greenwood, 1962).

A 0,2 mg d'antigène dans 0,1 ml de tampon phosphate 0,5 M, pH 7,4 est ajouté 7,4 MBq (0,2 mCi) d' ^{125}I . Le marquage est alors induit par 0,04 ml de chloramine T (2 mg/ml en tampon phosphate 0,5 M, pH 7,4) ajouté goutte à goutte. Après une minute d'agitation, la réaction est arrêtée par 0,08 ml de métabisulfite de sodium (2 mg/ml en tampon phosphate 0,5 M). Les protéines marquées par ^{125}I sont séparées de l'iode radioactif libre par élution sur une colonne de gel de filtration Sephadex G25 (PD10, Pharmacia, Uppsala, Suède) auparavant équilibrée en tampon phosphate 0,5 M, pH 7,4.

3.1.3. Marquage métabolique des antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes par la ^{35}S -méthionine

Le marquage métabolique des protéines des tachyzoïtes de la souche RH par la ^{35}S -méthionine s'est effectué selon la méthode suivante.

Après filtration sur membrane Nuclepore (3 μm) et un lavage en milieu RPMI 1640, les tachyzoïtes sont mis en suspension dans du milieu RPMI dépourvu de méthionine et de cystine (Kit RPMI-1640 Select Amine, GIBCO, Paisley, Ecosse) contenant 10 % de sérum de veau décomplémenté et préalablement dialysé contre du PBS, à raison de $1,5 \times 10^8$ tachyzoïtes par tube dans 1,5 ml de milieu. Les tubes sont incubés pendant 30 mn à 37°C et soumis à une douce agitation. Le marquage radioactif des parasites est réalisé par addition de 9,25 MBq (0,25 mCi) de ^{35}S -méthionine (Amersham) dans les tubes qui sont alors replacés à 37°C sous agitation. Au bout de 1 h, une chasse est réalisée par addition de méthionine et de cystine non marquées du Kit RPMI, à la même concentration que dans le milieu RPMI 1640 complet. Les tubes sont alors remis à 37°C, sous agitation, pendant 1 h 30 mn, ce qui permet la sécrétion des antigènes parasitaires marqués par ^{35}S -Met. Après une centrifugation à 1000 g pendant 10 mn, les surnageants sont filtrés sur une membrane Millipore 0,22 μm . Ils sont alors concentrés 5 fois et dialysés contre du PBS, afin d'éliminer la méthionine radioactive libre.

Après addition de 100 U/ml d'aprotinine, les préparations AES- ^{35}S -méthionine sont stockées à -70°C.

3.1.4. Extraction des antigènes solubles marqués par la ^{35}S -méthionine des tachyzoïtes

Les culots parasitaires marqués par la ^{35}S -méthionine obtenus après centrifugation (voir 3.1.3) sont rassemblés, lavés 4 fois en PBS puis remis en suspension dans de l'eau distillée à raison de 2×10^8 tachyzoïtes par ml. Cette suspension est soumise à 6 cycles de congélation (dans l'azote liquide) et de décongélation (dans un bain à 37°C). Une centrifugation d'une heure à 40 000 g permet alors de séparer le surnageant contenant les antigènes solubles du culot qui renferme les antigènes membranaires.

3.1.5. Extraction par le nonidet P40 des antigènes marqués par la ^{35}S -méthionine des tachyzoïtes

Les culots de parasites marqués par la ^{35}S -méthionine obtenus après centrifugation (voir 3.1.3) ou le culot renfermant les antigènes membranaires (voir 3.1.4) sont lavés 4 fois en PBS et soumis à une extraction antigénique par le détergent NP40 en tampon TNE, comme décrit précédemment (voir 3.1.1).

3.1.6. Extraction des antigènes radiomarqués des tachyzoïtes se fixant à la concanavaline A

Les AES- ^{35}S -méthionine ou les antigènes membranaires marqués par ^{125}I correspondant à 10^8 tachyzoïtes sont dialysés contre le tampon TNN^{2+} (voir 2.1.3) puis passés sur une colonne de Sépharose-Con A, comme décrit auparavant (voir 2.1.3).

3.2. Les sérums immuns

3.2.1. Sérums d'infection

Les souris BALB/c ont été infestées par voie intrapéritonéale par 30 kystes de la souche 76 K dans 0,25 ml de PBS.

Des rats Fischer ont été infestés par 10^5 tachyzoïtes de la souche RH dans 0,5 ml de PBS, par voie intrapéritonéale.

3.2.2. Sérums d'immunisation

Des souris BALB/c ont reçu à 10 jours d'intervalle, 4 injections sous-cutanées d'AES (correspondant à l'excrétion de 5×10^7 tachyzoïtes, pendant 3 h en présence de 10% de sérum de souris décomplémenté) ou d'un extrait de bradyzoïtes (correspondant à 5×10^3 kystes) dans 0,1 ml de PBS mélangé à 0,1 ml d'adjuvant incomplet de Freund. Comme contrôle, des souris témoins sont immunisées avec de l'extrait de cerveau de souris non-infectées.

Des rats Fischer ont reçu, à 10 jours d'intervalle, 4 injections sous-cutanées d'AES (correspondant à l'excrétion de 10^8 tachyzoïtes, pendant 3 h en présence de 10% de sérum de rat) ou d'extrait antigénique de bradyzoïtes (correspondant à 10^4 kystes), dans 0,3 ml de PBS mélangé à 0,3 ml d'adjuvant incomplet de Freund. Des rats témoins ont reçu de l'adjuvant seul.

Des lapins sont immunisés par injection intradermique de 0,75 ml d'AES (excrétion de $7,5 \times 10^8$ tachyzoïtes, en présence de sérum de lapin) associé à 0,75 ml d'adjuvant incomplet de Freund. Une injection de rappel d'AES (excrétion de $7,5 \times 10^7$ tachyzoïtes) mélangé à l'adjuvant incomplet de Freund est effectuée un mois plus tard.

3.2.3. Sérums humains

Les sérums humains proviennent du laboratoire Saint-Antoine, à Lille. Il s'agit de sérums d'infection prélevés en phase aiguë ou en phase chronique et de sérums négatifs, testés par hémagglutination indirecte (avec ou sans β mercaptoéthanol) et par immunofluorescence indirecte, pour la détection des IgG ou des IgM spécifiques.

3.3. Immunoprécipitation

Des aliquots renfermant (1) 400 000 cpm d'antigènes membranaires- ^{125}I , (2) 400 000 cpm d'extrait soluble- ^{125}I , (3) 40 000 cpm de AES- ^{35}S -Met, (4) 250 000 cpm d'antigènes- ^{35}S -Met solubles ou extraits au NP40 et (5) 15 000 cpm de AES- ^{35}S -Met fixant la Con A sont ajoutés dans 0,5 ml du tampon d'adsorption (Tris 10 mM/HCl pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, NP40 0,5 %, aprotinine 100 U/ml).

Aux antigènes radiomarqués sont ajoutés soit cinq μl de sérums immuns ou contrôles soit les anticorps monoclonaux à raison de 5 μl de liquide d'ascite ou de 0,25 ml de surnageant de culture.

Après 2 h d'incubation sous agitation à 37°C , les échantillons renfermant les immuncomplexes sont transférés dans des tubes contenant 10 mg (poids sec) de protéine A-Sépharose (Pharmacia) préalablement mouillée dans du tampon d'adsorption. Les tubes sont

alors placés à 4°C, sous agitation, pendant une nuit, afin de réaliser la fixation des immuncomplexes à la protéine A, par la partie constante des immunoglobulines.

Les culots de protéine A-Sépharose sont alors soumis à plusieurs lavages en tampon d'adsorption par des centrifugations de 5 mn à 200 g, jusqu'à ce que les surnageants soient dépourvus de radioactivité.

L'éluion des immuncomplexes est effectuée par traitement du gel de protéine A avec 0,04 ml de tampon d'échantillon (Tris 62,5 mM/HCl pH 6,8, SDS 3 % (p/v), glycerol 10% (p/v), β -mercaptoéthanol 5 %) et par 3 mn de chauffage à 100°C. Après centrifugation, les surnageants sont récupérés puis analysés en électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

3.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

La séparation des protéines est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970), dans un gel homogène contenant 10 % ou 13 % de polyacrylamide.

Les échantillons, ainsi que des marqueurs de poids moléculaire précolorés (BRL, Gaithersburg, MD, USA) ou non colorés (Pharmacia LKB, Uppsala, Suisse) sont chauffés pendant 2 fois 1,5 mn, à 100°C, avant d'être déposés sur le gel.

Autoradiographie: les gels destinés à l'autoradiographie sont immergés dans une solution contenant 8 % d'acide acétique et 20 % de méthanol, pendant 30 mn; puis dans un bain d'Amplificateur (Amersham) pour augmenter la sensibilité de détection quand il s'agit d'antigènes marqués par la ^{35}S -méthionine. Les gels sont ensuite séchés et exposés contre des films X-Omat AR Kodak (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, USA), pendant 2 à 10 jours, à -70°C.

3.5. Immunoélectrotransfert

Les antigènes sont séparés par SDS-PAGE, comme précédemment décrit (voir 3.4), avec ou sans β mercaptoéthanol dans le tampon échantillon.

Les protéines sont transférées électrophorétiquement sur une feuille de nitrocellulose, selon la méthode décrite par Towbin et coll. (1979). Le transfert est réalisé en tampon Tris 0,02 M, glycine 0,15 M, méthanol 20 %, pendant 3 h à 60 volts et 0,2 ampères.

La membrane de nitrocellulose est ensuite saturée pendant 1 h, dans du tampon PBS contenant 5% de lait écrémé (Gloria), puis elle est découpée en fines bandes. Les bandes sont incubées avec les anticorps monoclonaux (surnageants de culture purs ou liquides d'ascites dilués au 1/200 en PBS-lait) ou avec des sérums immuns (dilués au 1/100), durant une nuit à 4°C.

Après 3 lavages en PBS, Tween 0,5 %, les bandes sont incubées avec de l'antisérum spécifique marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette) dilué en PBS-lait, pendant 2 h à 20°C. Les bandes sont alors lavées 3 fois en PBS-Tween et révélées par une solution contenant le substrat enzymatique (30 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 10 ml de méthanol froid, 40 ml de PBS et 50 µl de H₂O₂ à 30 %).

Au bout de 1/2 h après l'apparition des bandes de couleur violette correspondant aux antigènes reconnus, les membranes sont rincées à l'eau, afin d'arrêter la réaction.

4. CARACTERISATION DE LA NATURE BIOCHIMIQUE DE CERTAINS ANTIGENES

4.1. Mise en évidence d'une protéine fixant le calcium

Afin d'analyser les antigènes qui fixent le calcium ("Calcium-binding proteins"), les protéines solubles sécrétées par les toxoplasmes sont isolées en milieu dépourvu de calcium selon la méthode décrite par Sibley et coll. (1986). Elles sont alors séparées par SDS-PAGE et transférées sur une feuille de nitrocellulose. La membrane de nitrocellulose est alors incubée avec 37×10^3 Bq/ml (1 µCi) de ⁴⁵CaCl₂, afin de détecter ensuite les bandes radioactives par autoradiographie (Maruyama et coll., 1984). La même membrane est ensuite réutilisée pour l'immunodétection de l'antigène (voir 3.5) par l'anticorps monoclonal TG17-43.

4.2. Déglycosylation des antigènes

Afin de vérifier la nature protéique des épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux, nous avons procédé à la déglycosylation des antigènes de l'extrait total de tachyzoïtes par l'acide trifluorométhane sulfonique (TFMS) et par le métapériodate de sodium.

Les extraits déglycosylés ont été par la suite analysés en immunoélectrotransfert vis-à-vis des différents anticorps monoclonaux.

4.2.1. Déglycosylation par le TFMS

Cette déglycosylation qui s'effectue au niveau des liaisons O-glycosyl des glycoprotéines, est réalisée selon la méthode décrite par Edge et coll. (1981).

A 6 mg d'extrait total de tachyzoïtes lyophilisé, est ajouté un mélange de 1 ml d'anisole et de TFMS (Aldrich, Strasbourg) (1v/2v) préparé extemporément à 0°C et en milieu inerte (par barbotage d'azote). Cette solution, dans laquelle des barbotages d'azote sont effectués régulièrement, est placée à 0°C et agitée de temps en temps.

Au bout de 2 h 30 mn, 2 ml de diéthyl éther préalablement refroidi à -40°C sont ajoutés dans le tube qui est ensuite agité au vortex jusqu'à transparence de la solution. A la solution claire, un volume égal (3 ml) de pyridine aqueuse 50 % (v/v) froid (à 0°C) est additionné goutte à goutte. La suspension est mélangée au vortex puis centrifugée afin d'écarter la phase éther qui renferme les molécules de faible poids moléculaire et les glycanes issus de la réaction de déglycosylation. Après une deuxième extraction à l'éther, la phase aqueuse est dialysée contre 4 litres d'acétate de pyridine 2 mM, pH 5,5 avec plusieurs changements de bain. Le dialysat est lyophilisé puis repris avec 0,1 ml d'eau distillée afin d'être étudié par immunoélectrotransfert.

4.2.2. Déglycosylation par le métapériodate de sodium

Elle est effectuée suivant la méthode de Stewart et coll. (1977).

Un volume de 0,2 ml d'une solution de métapériodate de sodium 0,02 M préparée en tampon acétate de sodium 0,1 M/acide acétique pH 4,5 est additionné à un volume identique d'extrait total de tachyzoïtes contenant 3 mg d'antigène.

Après 3 h d'incubation à 4°C, la réaction est arrêtée par 10 volumes d'une solution aqueuse d'éthylène glycol à 50 % (v/v). Cette préparation est alors dialysée pendant une nuit contre de l'eau physiologique, puis pendant 24 h contre de l'eau distillée, avant d'être lyophilisée.

5. HYBRIDATION CELLULAIRE ET SELECTION DES HYBRIDES

Des souris BALB/c ont été immunisées par les AES, en vue de l'hybridation cellulaire (voir 3.2.2). Une injection de rappel par voie intraveineuse est réalisée 3 jours avant l'hybridation avec 0,2 ml de la préparation d'AES, chez la souris présentant le titre d'anticorps le plus élevé en immunofluorescence indirecte et en ELISA (voir 6).

La fusion cellulaire entre les lymphocytes spléniques de la souris immunisée et les cellules myélomateuses SP2/O dérivées d'un myélome de souris BALB/c (Shulman et coll., 1978) est effectuée selon la méthode de Köhler et Milstein (1975). Les cellules non sécrétantes SP2/O, déficientes en HGPRT et de ce fait sensibles au système de sélection de Littlefield, sont prélevées en phase exponentielle de croissance, lavées 2 fois en milieu Dulbecco (DULBECCO'S MEM, Gibco, Paisley, Ecosse, complété avec 2,5 g/l de NaHCO_3 , 50 mg/l de streptomycine et 10^5 UI/l de pénicilline) puis comptées. Elles sont ensuite mélangées dans un rapport de 1 à 5 avec les cellules provenant du broyat de la rate de la souris préalablement lavées 3 fois en Dulbecco. Le mélange myélome/lymphocyte est centrifugé pendant 5 mn à 400 g.

La fusion cellulaire est induite par 1 ml d'une solution de polyéthylène glycol (PEG 1500, Boeringher Mannheim, RFA) ajoutée goutte à goutte en 1 mn. Ensuite, le milieu Dulbecco est ajouté sous agitation lente, à raison de 1 ml en 1mn puis 20 ml en 2 mn. Les cellules sont ensuite lavées pour éliminer le PEG et mises en suspension dans le milieu de culture sélectif HAT (voir table 1) à raison de $2,5 \times 10^4$ cellules/ml.

Des fractions de 2 ml de cette suspension sont réparties par alvéole dans des plaques de culture à 24 puits (Nunc, Roskilde, Danemark). Ces plaques ont été auparavant tapissées par une couche de cellules nourricières issues de lavage intrapéritonéal de souris BALB/c saines, cellules composées essentiellement de fibroblastes et de macrophages. Ces cellules nourricières présentent deux avantages: d'une part, elles libèrent dans le milieu de nombreux métabolites, favorisant la croissance des hybrides; d'autre part, la présence de macrophages dans le tapis cellulaire permet l'élimination rapide des débris cellulaires. Les plaques sont

TABLE 1. Composition des milieux utilisés en culture cellulaire

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

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

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

^c SVF : sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage (30 mn, 56°C)

placées en incubateur humide, à 5 % de CO₂ et à 37°C. L'utilisation du milieu de culture HAT permet de sélectionner les clones hybrides qui sont seuls capables de se développer dans ce milieu renfermant de l'aminoptérine, inhibiteur de la synthèse endogène des acides nucléiques.

Après une semaine de culture, les premiers clones sont observés; le milieu sélectif peut alors être remplacé par du milieu de transition HT et enfin par du milieu A (voir table1).

6. IDENTIFICATION DES HYBRIDES PRODUCTEURS D'ANTICORPS ANTI-*T. GONDII*

Les surnageants de culture sont testés 2 à 3 semaines après la fusion, simultanément par une technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) et par une technique d'"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA).

6.1. Immunofluorescence indirecte

Des tachyzoïtes lyophilisés et préalablement fixés dans une solution de formol à 2 %, sont repris en PBS (3×10^6 tachyzoïtes/ml), déposés sur des lames d'IFI (Institut Pasteur Production) qui sont séchées et conservées à température ambiante.

Avant l'utilisation, les lames sont fixées dans l'acétone à -20°C, pendant 10 mn. Elles sont ensuite incubées pendant 30 mn à température ambiante, avec les surnageants de culture à tester. Après 3 rinçages en PBS, les lames sont incubées pendant 30 mn avec une solution de sérum de chèvre anti-IgG(H+L) de souris marqué à la fluorescéine (Diagnostic Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) diluée au 80ème et du Bleu-Evans au 10 000 ème dans du PBS. Après deux lavages de 10 mn à l'obscurité avec du PBS, les lames sont observées au microscope à fluorescence, en immersion (400x).

6.2. ELISA

Une solution d'extrait total de tachyzoïtes, préparée à 0,02 mg/ml en PBS, est répartie à raison de 0,1 ml/puits, dans des plaques rigides en polystyrène (Nunc, Danemark). Après

une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées 3 fois avec une solution de PBS, Tween 20 à 0,05% (v/v); les sites d'adsorption libres sont saturés pendant 1 h à température ambiante avec une solution d'albumine sérique bovine (BSA) à 1% (p/v) en PBS. Après 3 lavages, les plaques sont séchées et peuvent être conservées pendant un mois à 4°C.

Des aliquots de 0,1 ml/puits des surnageants de culture à tester sont incubés pendant 3 h à 37°C, sur les antigènes adsorbés sur le support. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois en PBS-Tween et incubées, pendant 1 h 30 mn à 37°C, avec 0,1 ml de l'antisérum spécifique, anti-IgG (H+L) de souris marqué à la peroxydase (Diagnostic Pasteur) dilué au 10^{-4} en PBS-Tween. Après 3 lavages, des aliquots de 0,1 ml du substrat (O-phenyl diamine dihydrochloride (Sigma), dissous dans du tampon phosphate 0,1 M/citrate pH 5,5, H₂O₂ 0,1 %) sont incubés pendant 30 mn à 37°C. La réaction est arrêtée par addition de 0,2 ml par puits d'une solution d'HCl 2N.

La densité optique est mesurée à 492 nm à l'aide d'une spectrophotomètre type Titrotek Multiscan (Labsystems, Les Ulis, France).

7. CLONAGE CELLULAIRE DES HYBRIDES PRODUCTEURS D'ANTICORPS

Les clones d'hybrides sélectionnés pour la production d'anticorps anti-*T.gondii* sont soumis à 3 clonages successifs, afin d'obtenir des populations homogènes de cellules, sécrétant chacune un anticorps monoclonal (AcMc). Le clonage est effectué selon la technique de dilution limite. Elle consiste à répartir 0,2 ml d'une suspension cellulaire contenant 5 cellules/ml, dans chaque alvéole d'une plaque de clonage à 96 alvéoles (Falcon, Becton Dickinson, CA, USA) contenant des cellules nourricières; soit en théorie une cellule par alvéole. Le milieu est renouvelé au bout de 5 à 6 jours quand les premiers clones sont observés au microscope inversé, de manière à vérifier la monoclonalité des cultures.

La sélection des clones s'opère en ELISA ou en IFI sur les surnageants des puits présentant un clone unique. Les clones positifs sont ensuite multipliés puis congelés en azote liquide.

8. PRODUCTION MASSIVE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Des quantités importantes d'AcMc peuvent être obtenues *in vivo*, par induction de tumeur intrapéritonéale chez les souris BALB/c. 5×10^6 cellules hybrides préalablement lavées en Dulbecco sont injectées par voie intrapéritonéale, chez des souris ayant reçu une semaine auparavant 0,5 ml de pristane (2,6,10,14 tétraméthyl pentadécane, Sigma) qui favorise le développement d'ascite intrapéritonéale. Au bout de 8 à 15 jours, 2 à 4 ml d'ascite renfermant 1 à 10 mg/ml d'anticorps sont obtenus par souris.

Une autre méthode permettant l'obtention d'ascites, consiste à induire des tumeurs sous-cutanées par injections de $2 \text{ à } 3 \times 10^6$ cellules par souris. Dix à 15 jours plus tard, la tumeur est prélevée et broyée. Le culot cellulaire est lavé en Dulbecco puis injecté par voie intrapéritonéale à des souris BALB/c (sans pristane).

Contrôle de la production: le contrôle quantitatif des anticorps sécrétés est effectué par électrophorèse sur acétate de cellulose (Cellogel, Sebia, Issy-les-moulineaux, France). L'intensité des bandes obtenues est lue par un lecteur permettant de transformer chaque bande en pic d'adsorption. La surface de chaque pic, et notamment celui de l'AcMc, permet un calcul approximatif de la concentration. Cette technique permet avant tout un contrôle "visuel" de la sécrétion. Un contrôle plus précis est ensuite effectué par les techniques ELISA ou IFI, des dilutions logarithmiques de l'ascite étant effectuées jusqu'à perte de toute activité.

9. CARACTERISATION ISOTYPIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La détermination des isotypes est réalisée, à partir des surnageants de culture des cellules clonées, selon la technique de double diffusion décrite par Ouchterlony (1958).

La réaction de double diffusion est effectuée sur lame, en gel d'agarose (Indubiose A37, Industrie Biologique Française) à 1 % (p/v) en tampon véronal sodique 1,6 % /HCl pH 8,2. Les réservoirs sont découpés dans la gélose à l'emporte pièce, puis les puits sont remplis: un puits central dans lequel est déposé 0,2 ml de surnageant à tester et des puits périphériques recevant 0,02 ml des anti-sérums de souris (anti-IgM, anti-IgG1, IgG2a,

IgG2b, IgG3) (Biosys, Compiègne, France). Après 48 h de diffusion en chambre humide et à température ambiante, les lames sont lavées pendant 1 h en tampon citrate 5 % (p/v) puis 48 h en NaCl 0,9 % . Les lames sont alors lavées à l'eau déminéralisée et séchées en recouvrant le gel d'un papier Whatman N°1, puis colorées à l'amidoschwartz (Merck).

10. PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Les AcMc que nous avons sélectionnés étaient tous de classe IgG (IgG1 ou IgG3): nous les avons purifiés à partir d'ascites de souris, par une précipitation au sulfate d'ammonium suivie d'une chromatographie sur colonne échangeuse d'anions.

L'ascite de souris renfermant l'anticorps monoclonal à purifier est soumise à 2 précipitations successives au sulfate d'ammonium à 50 % de la saturation, de façon à éliminer en partie l'albumine. Le précipité final est repris dans un volume minimum d'eau physiologique (NaCl 0,9 %). Cette solution est dialysée pendant 24 h contre une solution de NaCl 0,9 % et 24 h contre du tampon Tris 0,05 M/HCl pH 8, NaCl 0,05 M.

La solution dialysée est passée sur une colonne échangeuse d'anions, DEAE trisacryl (IBF, Villeneuve-La-Garenne, France) équilibrée en tampon Tris 0,05 M/HCl pH 8, NaCl 0,05 M. Les IgG non retenues à cette force ionique sont éluées alors que l'albumine reste adsorbée. La fraction d'IgG est concentrée dans une cellule Amicon munie d'une membrane PM10. La colonne est ensuite régénérée par du tampon Tris/HCl, NaCl 0,5 M.

11. PURIFICATION DE L'ANTIGÈNE P27

L'antigène natif cible de l'AcMc TG17-43 a pu être isolé par chromatographie d'affinité de façon à établir ensuite son séquençage partiel (Cesbron-Delauw et coll., 1989).

Brièvement, les produits d'excrétion-sécrétion de tachyzoïtes sont passés sur une colonne de Sépharose CL-4B activée par le CNBr (Pharmacia) couplée préalablement à l'AcMc purifié, selon les techniques indiquées par Pharmacia.

L'antigène élué a été soumis à une SDS-PAGE, puis transféré sur une membrane de polyvinyl difluoride (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA, USA). La membrane a ensuite été colorée par le Bleu de Coomassie et la bande correspondant à l'antigène natif a été découpée, puis soumise au séquençage par la société Transgène à Strasbourg.

12. DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'AFFINITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Nous avons déterminé la constante d'affinité de l'AcMc TG17-43 pour un peptide synthétique, suivant la méthode décrite par Müller (1980).

Il s'agit d'un test radioimmunologique de compétition entre le peptide marqué par ^{125}I (traceur radioactif) et une gamme de concentrations différentes du même peptide non marqué (inhibiteur), vis-à-vis de l'AcMc. Les immunocomplexes formés sont précipités par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation finale et la proportion du peptide radioactif complexé est déterminée pour chaque concentration d'inhibiteur. Pour déterminer l'affinité de l'anticorps pour le peptide, il suffit alors de déterminer la molarité de l'inhibiteur qui permet d'obtenir une inhibition de 50 % de l'attachement de l'anticorps au traceur, dans les conditions d'équilibre suivant:

-concentration de traceur permettant d'obtenir un signal radioactif significatif, en excès d'anticorps;

-dilution en AcMc telle que seul 50 % du traceur soit lié aux immunoglobulines (en absence d'inhibiteur).

12.1. Détermination de la concentration optimale du traceur

Un mg du peptide 170-193 (correspondant à P24) tyrosiné est marqué par ^{125}I (traceur), en présence de la chloramine T, comme précédemment décrit (voir 3.1.2).

Des dilutions du traceur sont préparées en tampon Tris-BSA (Tris 0,02 M/HCl pH 7,5, NaCl 0,14 M, NaN_3 0,03 M et BSA 1 % (p/v)) et des aliquots de 0,1 ml renfermant 25000 à 500000 cpm de radioactivité (de l'ordre de 15 à 300 ng de peptide) sont répartis dans

des tubes à hémolyse en plastique. Ces dilutions du traceur, testées en triple essai, sont alors incubées avec deux séries de liquide d'ascite: d'une part avec des fractions de 0,1 ml d'anticorps en excès (liquide d'ascite dilué au 50ème qui correspond approximativement à 0,2 mg/ml d'Ig) et d'autre part avec 0,1 ml d'ascite SP2/O diluée au 50ème (série contrôle). Après 2 h d'incubation à température ambiante, 0,2 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium à pH 7 sont ajoutés par tube. Trente minutes plus tard les tubes sont centrifugés pendant 10 mn à 1000 g. Les surnageants sont délicatement éliminés et les précipités lavés 2 fois en sulfate d'ammonium à 50 % . La radioactivité associée aux précipités est alors comptée au compteur Gamma.

La concentration du traceur permettant d'obtenir un signal radioactif significatif (T_t) dans le précipité est utilisée par la suite.

12.2. Détermination de la dilution optimale de l'anticorps monoclonal

Des séries de tubes, renfermant une concentration identique de traceur (T_t), mais des dilutions en liquide d'ascite variables (de l'ordre de 0,1 à 0,0001 mg/ml d'Ig par tube) dans des volumes totaux de 0,2 ml en tampon Tris-BSA, sont soumises à une précipitation par le sulfate d'ammonium à 50 % . Une courbe de dilution est établie; la dilution du liquide d'ascite correspondant à 50 % de l'activité maximale est utilisée par la suite dans le test de compétition entre le peptide non marqué (inhibiteur) et le peptide conjugué à ^{125}I (traceur).

12.3. Constante d'affinité

La précipitation par le sulfate d'ammonium est effectuée sur des échantillons renfermant des concentrations en traceur (T_t) et en anticorps identiques, en présence d'inhibiteur (I) dont la molarité varie de 10^{-10} à 10^{-5} M. Le pourcentage d'inhibition est calculé pour chaque concentration en inhibiteur selon la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = 100 \times (\text{cpm}_p \text{ sans I} - \text{cpm}_p \text{ avec I}) / (\text{cpm}_p \text{ sans I} - \text{cpm}_p \text{ sans Ac})$$

où cpm_p représente la radioactivité en coups par minute, dans le précipité.

Une courbe de pourcentage d'inhibition est établie en fonction des valeurs du logarithme de la molarité de l'inhibiteur: la molarité de l'inhibiteur à 50 % d'inhibition (I_t) est déterminée. La constante d'affinité K peut être alors obtenue selon l'équation suivante:

$$K = 8 / (3 \times ([I_t] - [T_t]))$$

13. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS

13.1. Activité biologique *in vivo*: transfert passif d'anticorps chez les rats "Nude"

Nous avons utilisé ce modèle expérimental de rats génétiquement athymiques, afin d'évaluer par transfert passif le pouvoir protecteur des anticorps présents dans les sérums de rats Fischer infestés ou immunisés par les AES, et également de nos différents AcMc.

Des séries de 3 à 4 rats "Nude" placés sous isocape ont reçu par voie intraveineuse, 1,5 ml de sérums de rats immuns ou de liquide d'ascite (AcMc) 24 h avant d'être infestés par voie intrapéritonéale par 5×10^4 ou 10^5 tachyzoïtes de la souche RH. L'expérience comporte également des séries de rats témoins, ayant reçu du sérum de rat Fischer injecté par de l'adjuvant seul ou du liquide d'ascite contenant un anticorps monoclonal non relevant, anti-*Leishmania donovani*.

13.2. Activité biologique *in vitro*: test de lyse complément-dépendante

Le "dye test" développé par Sabin et Feldman (1948) permet de mettre en évidence le pouvoir lytique, vis-à-vis du parasite, des sérums immuns décomplémentés en utilisant comme colorant vital le bleu de méthylène. Le test s'effectue en présence d'un facteur accessoire externe (vraisemblablement le complément) provenant d'un sérum humain n'ayant pas d'anticorps anti-toxoplasme et non toxique pour les parasites.

L'activité biologique de nos AcMc en "dye test" a été étudiée en collaboration avec le laboratoire de Dr J.E. Smith (Université de Leeds, Angleterre), sur des microplaques de culture (96 puits) selon Feldman et Lamb (1966).

Des dilutions de liquide d'ascite sont réalisées en tampon PBS et des aliquots de 0,05 ml sont déposés par puits. Une ascite positive confirmée est incluse comme contrôle de titre afin d'évaluer les conditions du test.

L'antigène est constitué de toxoplasmes vivants provenant d'un exudat péritonéal de souris après 3 jours d'infection par la souche RH de *T. gondii*. Cinquante μ l d'un mélange contenant 2 à 4 x 10⁶ tachyzoïtes/ml en PBS et du facteur accessoire humain (v/v) sont ajoutés à chaque alvéole. Après agitation, les plaques sont incubées pendant une heure à 37°C; ensuite 0,025 ml d'une solution alcaline fraîche de bleu de méthylène à pH 11 sont ajoutés et le mélange est incubé une heure à 20°C. Le comptage des parasites vivants (colorés) est effectué directement sur la microplaque à l'aide d'un microscope inversé à un grossissement de 400 x. Le titre final correspond à la dilution montrant un pourcentage égal à 50 % de parasites vivants.

14. LOCALISATION DES ANTIGENES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

14.1. Analyse en cytofluorométrie de flux

Les tachyzoïtes formolés et lyophilisés (2 x 10⁶ parasites) sont incubés avec des fractions de 0,2 ml de surnageant de culture d'hybridome, pendant 30 mn à la température ambiante. Après 3 lavages par du PBS, les parasites sont traités pendant 30 mn, par l'antisérum anti-IgG (H+L) de souris conjugué à la fluorescéine dilué au 80ème (Diagnostic Pasteur). Les parasites sont ensuite lavés 3 fois par du PBS puis mis en suspension dans 0,2 ml de PBS. L'intensité de la fluorescence est alors quantifiée dans un appareil Cytofluorographe Ortho 50 H (Westwood, Mass, USA) muni d'un faisceau laser argon (488 nm).

Cette technique, complémentaire des essais menés en immunofluorescence indirecte, permet de quantifier le pourcentage de tachyzoïtes fluorescents, après incubation avec les différents AcMc.

14.2. Analyse en microscopie électronique

Les parasites (tachyzoïtes ou bradyzoïtes) sont fixés avec une solution de glutaraldéhyde à 1 % dans du tampon cacodylate. Ils sont alors inclus en Lowicryl K4M selon la procédure de Roth et coll. (1981). Des sections ultrafines, déposées sur des grilles de nickel, sont incubées pendant 10 mn en tampon Tris/HCl (Tris 20 mM/HCl pH 7,4, NaCl 0,5 M) contenant 5 % d'ovalbumine et 1 % de sérum de chèvre décomplémenté.

Les coupes sont alors incubées, pendant 2 h à 20°C, avec les surnageants de culture des différents hybridomes. Elles sont ensuite rincées en tampon Tris/HCl-ovalbumine et incubées avec un sérum de chèvre anti-IgG de souris conjugué à l'or (10 nm) (Janssen Pharmaceutique, Beere, Belgique). Après 1 h d'incubation à température ambiante, les sections ultrafines sont lavées par du tampon Tris/HCl saline et rincées à l'eau distillée. Elles sont alors colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être examinées au microscope électronique Philips EM 420.

15. ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE POUR LA DETECTION D'ANTIGENES CIRCULANTS

Un test de compétition radioimmunologique, en phase solide, a été mis au point pour rechercher l'antigène circulant reconnu par l'AcMc TG17-43, dans les sérums de souris infectées par la souche RH.

Etant donné l'existence du peptide synthétique 173-194, correspondant au déterminant antigénique de l'antigène natif reconnu par cet AcMc, nous avons envisagé une compétition entre le peptide marqué par ^{125}I et l'antigène circulant dans les sérums, vis-à-vis de l'AcMc adsorbé sur le support.

L'AcMc TG17-43, dilué en PBS à 0,02 mg/ml, est adsorbé sur les plaques, à raison de 0,1 ml/puits. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées en PBS-Tween puis saturées en PBS, BSA 1 %. Cinquante μl de différentes dilutions de sérums en PBS (pur, 1/2, 1/4, 1/8) sont déposés dans les puits et 0,05 ml de peptide marqué par ^{125}I , dilué en PBS, sont immédiatement ajoutés dans chaque puits; la dilution du peptide marqué doit être

déterminée auparavant, de façon qu'en absence de tout inhibiteur, la radioactivité fixée corresponde à 75 % de la radioactivité maximale se fixant à l'anticorps monoclonal en cas d'excès de peptide marqué. Comme contrôle positif, une gamme de dilutions du peptide non marqué dilué dans du tampon PBS contenant 10% de sérum humain sain (5×10^{-5} à 10^{-8} M) est incubée avec le peptide marqué, dans les mêmes conditions que pour les sérums à tester.

Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont lavées, les puits découpés et leur radioactivité déterminée en cpm. Les résultats sont déterminés en pourcentage d'inhibition de la fixation du peptide marqué, sur l'AcMc, en présence des sérums dilués.

RESULTATS

1. MISE AU POINT DES SYSTEMES D'EXCRETION-SECRETION DES TACHYZOITES

Nous avons mis au point un procédé d'obtention d'antigènes excrétés-sécrétés (AES) de tachyzoïtes en milieu acellulaire, afin d'éviter les contaminations des préparations d'AES par les protéines cellulaires, ce qui permet les immunisations des animaux dans de meilleures conditions.

Une étude préliminaire nous a permis de déterminer les conditions optimales de la survie des tachyzoïtes en milieu acellulaire; ceci est en effet indispensable pour le contrôle de l'excrétion-sécrétion active des tachyzoïtes et pour l'obtention de préparations d'AES peu contaminées par les antigènes somatiques libérés lors de la lyse des parasites. Nous avons tout d'abord étudié par la coloration à l'érythrosine B, la viabilité des tachyzoïtes issus de l'ascite péritonéale de souris infestées par la souche RH de *T. gondii*, après incubation à 37°C dans différents milieux. Les meilleurs résultats (>80 % de survie après 4 h d'incubation) ont été obtenus par l'incubation de $1,5 \times 10^8$ tachyzoïtes, dans des tubes renfermant 1,5 ml de milieu RPMI-1640 contenant 10% de sérum décomplémenté de différentes origines (humaine, bovine, rat, souris, lapin).

Estimation de la quantité de protéines excrétées-sécrétées:

Afin de préparer les expériences d'immunisation, il nous a fallu faire une estimation approximative de la concentration en protéines parasitaires excrétées-sécrétées, ce qui n'était pas possible par dosage direct en raison de la grande quantité de protéines sériques que renferment les préparations d'AES. Pour cela, le marquage métabolique des tachyzoïtes par la ^{35}S -méthionine a été suivi par des temps variables de chasse par la méthionine non marquée (30 mn, 1 h ou 1,5 h). Après centrifugation des parasites, les produits d'excrétion-sécrétion ont été recueillis dans les surnageants et les culots parasitaires ont été traités afin de prélever les antigènes parasitaires solubles marqués par la ^{35}S -méthionine.

La cinétique d'excrétion-sécrétion a été évaluée de façon indirecte: l'activité spécifique (cpm/ μg) dans l'extrait parasitaire soluble a été déterminée à partir de la mesure

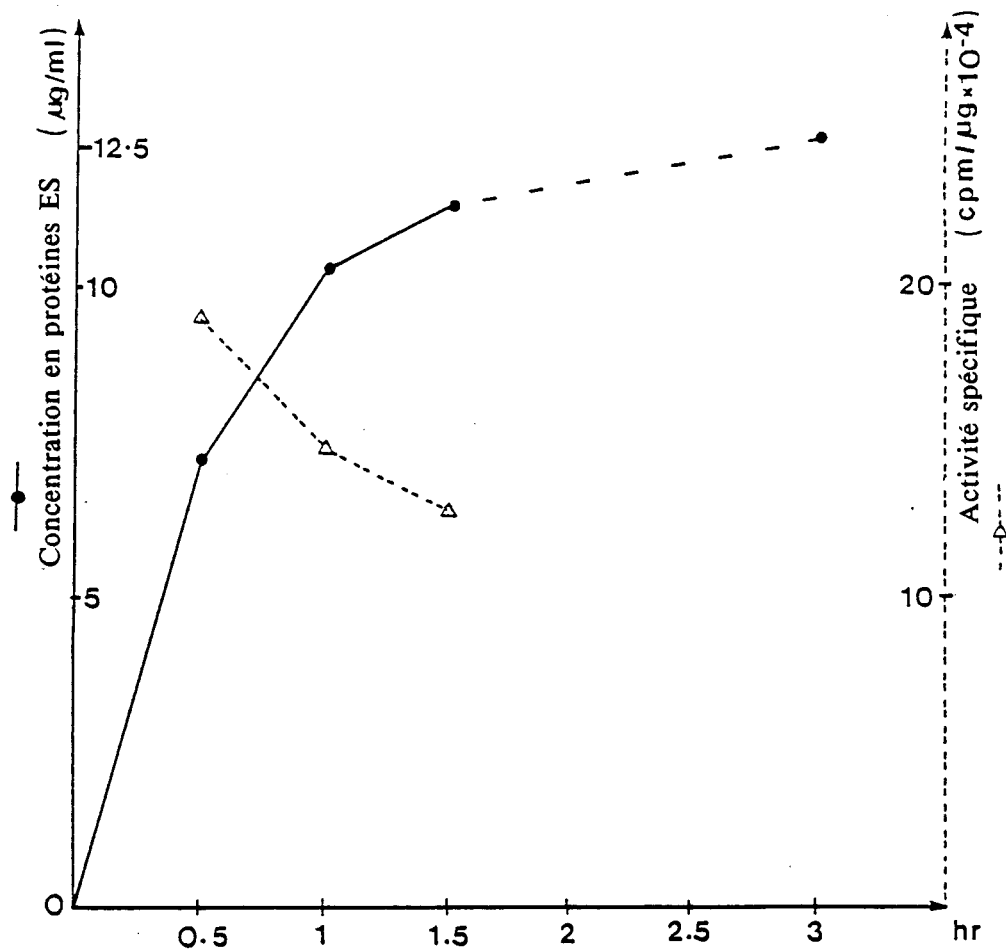
TABLE 2. Estimation indirecte de la quantité de protéines excrétées-sécrétées (ES) par 10^8 tachyzoïtes (TK), dans du milieu RPMI contenant 10% de sérum de rat

Période de chasse (mn)	Activité spécifique* (cpm/ μ g)	Radioactivité dans le milieu d'incubation d'AES (cpm pour 10^8 TK)	Concentration [§] en protéines ES (μ g/ 10^8 TK)
30	19 000	136 000	7,2
60	14 300	146 000	10,2
90	12 350	138 200	11,2

* Activité spécifique = Radioactivité dans l'extrait soluble (cpm/ml) / Concentration en protéine de l'extrait soluble (μ g/ml).

§ Concentration en protéines ES = Radioactivité dans le milieu ES / Activité spécifique.

FIGURE 4. Cinétique de relargage des protéines ES par 10^8 tachyzoïtes.



de la radioactivité incorporée et de la concentration protéique dosée selon la technique de Peterson (1977), après différentes périodes de "chasse" en présence de méthionine froide; la quantité de protéines parasitaires présentes dans les préparations d'AES aux différents temps a ensuite été déduite à partir de leur radioactivité (table 2).

Cette méthode, très approchée en raison de la variabilité de la quantité de méthionine présente dans les différentes protéines ou de la présence des groupements glycosylés, nous fournit néanmoins un ordre de grandeur d'environ 12 μg de molécules excrétées pendant 3 h par 10^8 tachyzoïtes (Fig 4). Il convient de noter que lorsque les tachyzoïtes sont incubés dans du milieu sans sérum, la concentration en AES est 10 fois moindre, ce qui met en évidence l'importance de la présence du sérum dans le milieu, pour une survie correcte et une sécrétion active des tachyzoïtes.

2. IDENTIFICATION DES ANTIGENES EXCRETES-SECRETES IMMUNOGENES AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

L'analyse des antigènes d'excrétion-sécrétion reconnus par des sérums immuns n'a pu être réalisée par immunoélectrotransfert car la présence de protéines sériques dans le milieu d'excrétion gêne leur migration dans les gels de polyacrylamide. Nous avons réalisé cette étude en immunoprécipitant les AES- ^{35}S -Met par différents sérums immuns d'origine humaine ou animale.

2.1. Caractérisation des antigènes d'excrétion-sécrétion immunoprécipités par les sérums humains

Nous avons réalisé cette étude avec des sérums humains prélevés en phase chronique de toxoplasmose, quand l'immunité contre la réinfection est établie et que les sérums sont dépourvus d'IgM spécifiques.

La figure 5 illustre le profil électrophorétique des AES (pistes 2 à 4) et des antigènes extraits par le détergent NP40 (piste 5), immunoprécipités par un sérum humain représentatif de la phase chronique. Nous observons que l'incubation des tachyzoïtes dans des milieux

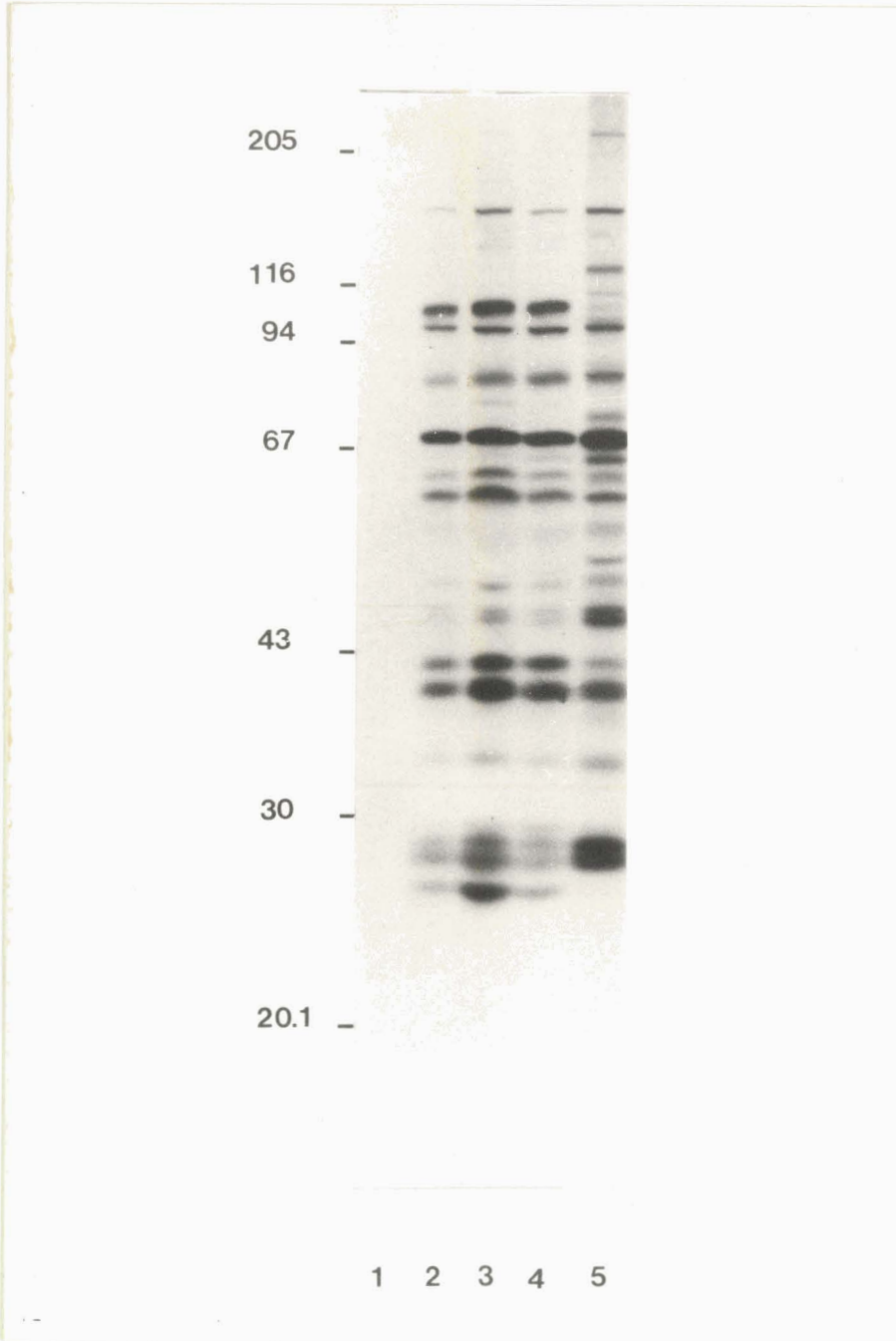


FIGURE 5. Comparaison des AES et des antigènes somatiques reconnus par des sérums humains collectés au cours de la phase chronique de la toxoplasmose.

Les AES (pistes 1 à 4) et les antigènes extraits au NP40 (piste 5) marqués par la ^{35}S -Met sont immunoprécipités par un sérum humain représentatif de la phase chronique de l'infection (pistes 2 à 5) et par un sérum humain contrôle (piste 1), puis séparés en SDS-PAGE (10% d'acrylamide). Les AES ont été préparés en présence de 10% de sérum décomplémenté de rat (pistes 1 et 2), de veau (piste 3) et humain (piste 4).

contenant du sérum de rat (piste 2), de veau (piste 3) ou humain (piste 4) conduit à un profil identique des AES immunoprécipités par le sérum humain; néanmoins le meilleur rendement est obtenu en présence de sérum de veau.

Les AES les plus immunogènes ont des P.M. apparents de 108, 97, 86, 69, 57, 42, 39, 28,5, 27 et 26 kDa. De plus, leur comparaison avec les antigènes somatiques reconnus par le sérum humain (piste 5) montre que certains de ces antigènes, comme celui de 108 kDa, sont préférentiellement excrétés ou sécrétés.

2.2. Caractérisation des antigènes d'excrétion-sécrétion immunoprécipités par les sérums d'animaux infectés ou immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés

La figure 6 illustre les AES reconnus d'une part par les sérums d'infection de rat (piste 1) ou de souris (piste 3) et d'autre part par les sérums d'animaux immunisés par les AES, le rat (piste 5), la souris (piste 6) et le lapin (piste 7).

Les sérums de rats infectés (piste 1) immunoprécipitent des antigènes de 97, 57, 42, 46, 39 et 28,5 kDa, mais pas l'antigène de 69 kDa qui est reconnu par les sérums d'infection humains. Les sérums de souris infectées réagissent avec des antigènes de 97, 69, 60, 57, 46, 42, 39 et 28,5 kDa (piste 3).

Chez les animaux immunisés par les AES, les principaux antigènes qui sont reconnus par les anticorps de souris ont des P.M. apparents de 185, 170, 155, 108, 97, 86, 69, 60, 57, 39, 28,5, 27 et 21 kDa (piste 6). Le nombre des AES immunoprécipités par les sérums de rats immunisés est moindre et en particulier il n'y a pas de réponse humorale vis-à-vis des antigènes de 27 et 69 kDa. Par contre, une réponse humorale intense est observée chez le rat, vis-à-vis des AES de 39 et 28,5 kDa (piste 5). Chez le lapin, l'immunisation par les AES induit surtout des anticorps qui reconnaissent les AES de bas P.M., en particulier les antigènes de 27 et 28,5 kDa (piste 7).

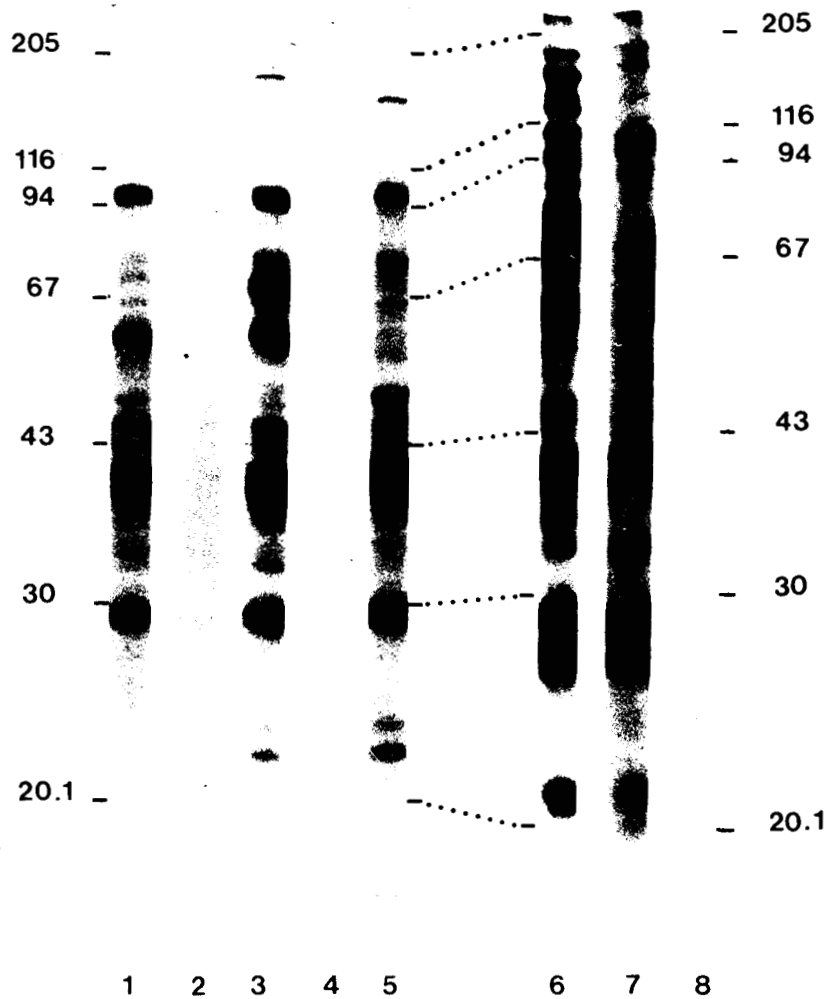


FIGURE 6. Profils électrophorétiques des AES reconnus par les sérums d'animaux infectés par *T.gondii* ou immunisés par les AES.

Analyse en SDS-PAGE (10% d'acrylamide) des AES marqués par la ^{35}S -Met (préparés en sérum de veau foetal) immunoprécipités par les sérums:

- de rats infectés (piste 1) ou contrôles (piste 2),
- de souris infectées (piste 3) ou contrôles (piste 4),
- de rats (piste 5), de souris (piste 6) et de lapins (piste 7) immunisés par les AES,
- d'un lapin contrôle (piste 8).

3. MISE EN EVIDENCE, DANS LE MODELE EXPERIMENTAL DU RAT "NUDE", DU ROLE PROTECTEUR DES ANTICORPS INDUITS PAR LES ANTIGENES EXCRETES-SECRETES

Alors que le rat Fischer résiste à l'infection intrapéritonéale par 10^8 tachyzoïtes de la souche RH de *T. gondii*, les rats "Nude" (Nu/Nu) sont tués par 1000 tachyzoïtes seulement (Santoro et coll., 1987); c'est pourquoi nous avons choisi ce modèle expérimental pour évaluer le rôle protecteur des anticorps anti-AES, par transfert passif de sérums immuns.

Tous les sérums sont testés en immunofluorescence indirecte, avant le transfert, et possèdent des titres identiques (1/2560) excepté les sérums de rats contrôles ayant reçu de l'adjuvant seul qui sont négatifs.

Comme l'indique la figure 7, tous les rats contrôles sont morts entre 10 et 20 jours après l'infection par 10^5 tachyzoïtes de la souche RH. Les transferts de sérums de rats infectés ou de rats immunisés par des tachyzoïtes irradiés ont induit une augmentation de la survie des rats "Nude" qui sont morts entre 15 à 30 jours après l'infection. Les meilleurs résultats ont été obtenus chez les rats ayant reçu un transfert de sérum de rats Fischer immunisés par les AES. En effet, 40% de survie est observé chez ces rats au 25^{ème} jour de l'infection et un animal a même été totalement protégé puisqu'il est mort en même temps que ses congénères non infectés.

Des séries d'expériences plus récentes où l'infection des rats "Nude" a été réalisée par une dose deux fois plus faible de tachyzoïtes (5×10^4) ont permis de mettre en évidence une survie encore plus significative des rats "Nude" après transfert de sérum anti-AES. En effet, 38% de ces rats ont survécu 90 jours après l'infection alors que tous les rats contrôles sont morts entre 14 et 17 jours après l'infection (non représenté ici).

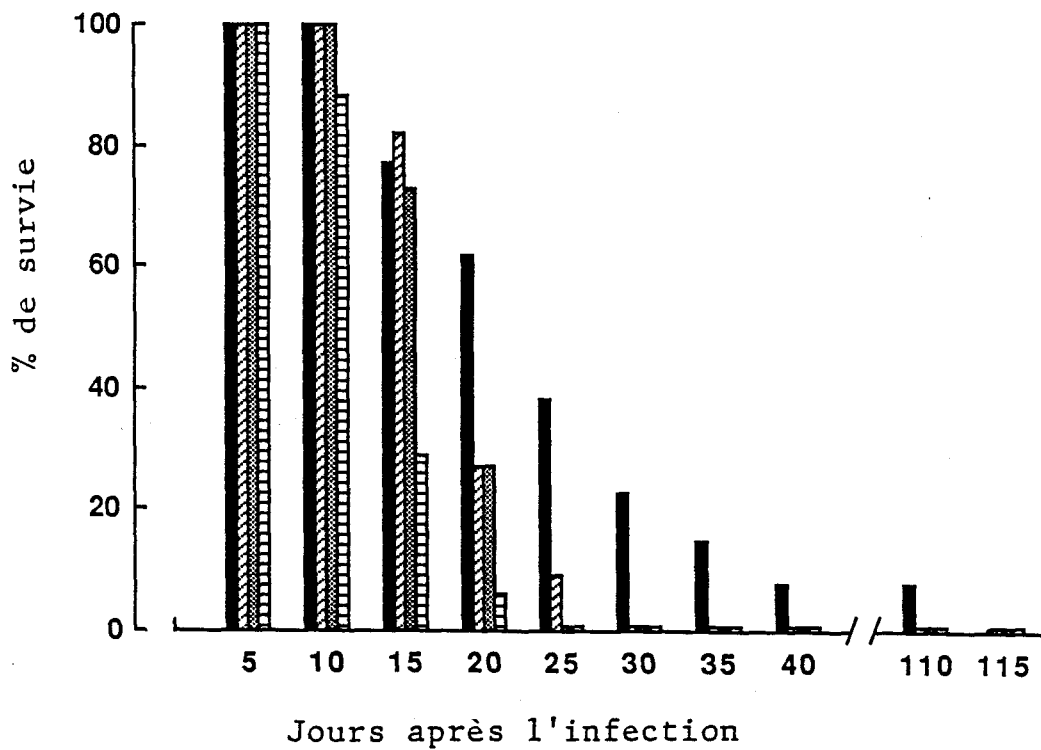


FIGURE 7. Survie des rats "Nude" infectés par 10^5 tachyzoïtes de la souche RH, 24 h après le transfert passif de:

- sérums de rats immunisés par les AES (■),
- sérums de rats infectés par 10^5 tachyzoïtes vivants (▨),
- sérums de rats immunisés par 10^5 tachyzoïtes irradiés (▩),
- sérums de rats ayant reçu de l'adjuvant seul (□).

4. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES DES STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE PRESENTANT DES EPITOPES COMMUNS

4.1. Les antigènes de tachyzoïtes marqués par la ^{35}S -Met. reconnus par les sérums d'immunisation par un extrait de bradyzoïtes

Afin de déterminer les antigènes du tachyzoïte présentant des épitopes communs avec le bradyzoïte, nous avons procédé à l'immunoprécipitation des antigènes de tachyzoïtes marqués par la ^{35}S -méthionine (Fig 8) (extrait soluble: pistes 1 à 3; extrait membranaire: pistes 4 à 8 et AES: pistes 9 à 13) par des sérums de rats (pistes 7 et 10) et de souris (pistes 3, 6 et 12) immunisés par un extrait de bradyzoïtes. A titre de référence, les mêmes antigènes sont immunoprécipités par des sérums de souris immunisées par les AES (pistes 2, 5 et 11) et des sérums de rats (pistes 8 et 9) ou de souris (pistes 1, 4 et 13) immunisés par un extrait de cerveau de souris non infectées.

L'immunoprécipitation de l'extrait soluble de tachyzoïtes par les sérums de souris immunisées par l'extrait de bradyzoïtes a mis en évidence une réponse humorale intense vis-à-vis d'un antigène de 63 kDa (Fig 8, piste 3) alors que les sérums de rats Fischer immunisés par l'extrait de bradyzoïtes n'ont immunoprécipité aucun antigène (non indiqué).

L'immunoprécipitation de l'extrait membranaire de tachyzoïtes par les sérums de souris immunisées par l'extrait de bradyzoïtes a révélé un antigène majeur de 39 kDa (Fig 8, piste 6) alors que ce même extrait antigénique immunoprécipité par les sérums de rats immunisés par l'extrait de bradyzoïtes met en évidence un antigène majeur de 28,5 kDa (piste 7). D'autre part, quand les sérums de rats et de souris immunisés par l'extrait de bradyzoïtes sont immunoprécipités par les AES, ils reconnaissent les mêmes antigènes que dans l'extrait membranaire: l'AES de 28,5 kDa est reconnu par les sérums de rats immunisés par l'extrait de bradyzoïtes (piste 10), alors que les sérums de souris immunisées par l'extrait de bradyzoïtes reconnaissent l'antigène de 39 kDa avec néanmoins, une réponse anticorps plus faible dirigée contre les antigènes de 28,5, 67 et 94 kDa (piste 12).

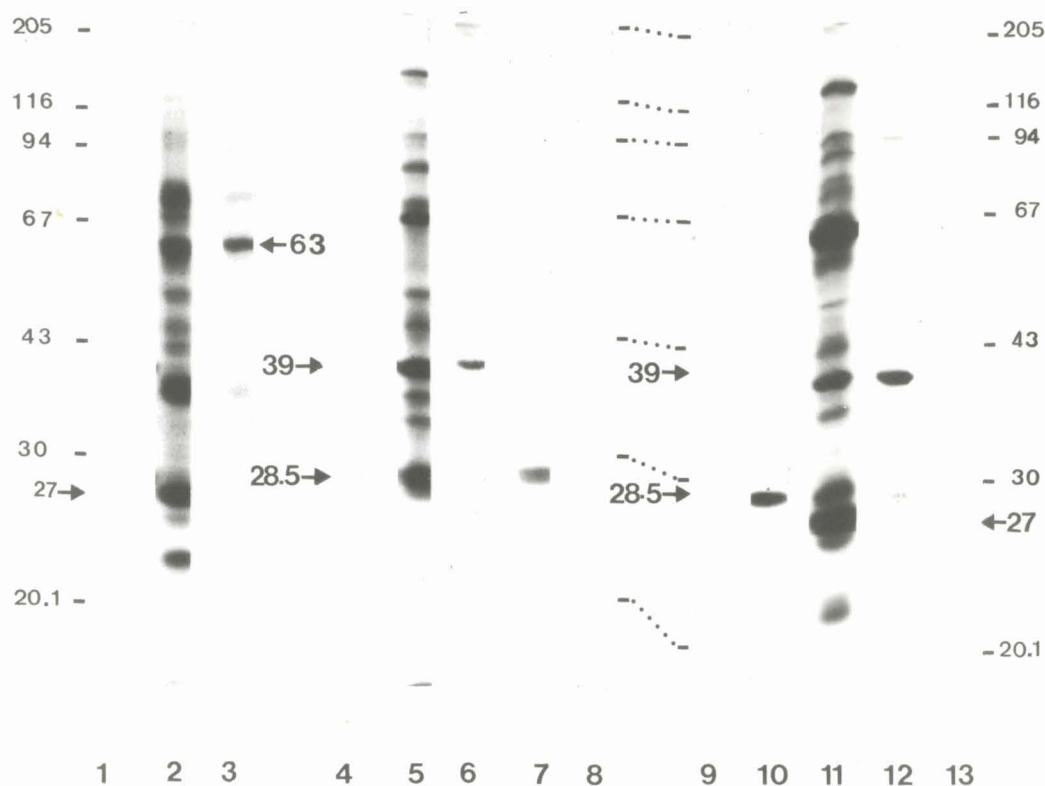


FIGURE 8. Antigènes des tachyzoïtes marqués par la ^{35}S -Met reconnus par des sérums d'animaux immunisés par un extrait de bradyzoïtes et, à titre de comparaison, par les AES.

Profils électrophorétiques (SDS-PAGE, 10% d'acrylamide):

- des antigènes cytoplasmiques solubles (pistes 1 à 3) immunoprécipités par différents sérums de souris: contrôle (piste 1), immunisée par des AES (piste 2) et immunisée par un extrait de bradyzoïtes (piste 3),
- des antigènes membranaires (pistes 4 à 8) immunoprécipités par différents sérums de souris: contrôle (piste 4), immunisée par les AES (piste 5) et immunisée par l'extrait de bradyzoïtes (piste 6), et par deux sérums de rats: immunisé par l'extrait de bradyzoïtes (piste 7) et contrôle (piste 8),
- des AES (pistes 9 à 13) immunoprécipités par deux sérums de rats: contrôle (piste 9) et immunisé par l'extrait de bradyzoïtes (piste 10), et par différents sérums de souris: contrôle (piste 13), immunisée par les AES (piste 11) et immunisée par l'extrait de bradyzoïtes (piste 12).

4.2. Identification des antigènes excrétés-sécrétés glycosylés

La figure 9 indique les AES capables de se fixer à la Con A et reconnus par les anticorps des sérums de rats et de souris immunisés par les AES de tachyzoïtes ou immunisés par un extrait de bradyzoïtes.

L'immunoprécipitation des AES-³⁵S-Met élués après passage sur une colonne de Sépharose-Con A, par des sérums de souris anti-AES a mis en évidence, principalement, trois antigènes glycosylés de 28,5, 37 et 67 kDa (piste 4); à titre de référence la piste 1 présente le profil électrophorétique des AES-³⁵S-Met qui sont révélés par le même sérum. Ainsi, l'antigène de 39 kDa qui, parmi les AES marqués par la ³⁵S-Met, est immunoprécipité par les sérums de souris immunisées par l'extrait de bradyzoïtes (piste 3) ne se fixe pas à la Con A car il n'est pas reconnu par ces sérums, après élution des AES sont élués sur la colonne de Con A (piste 6). Enfin, les sérums de rats immunisés par l'extrait de bradyzoïtes ont immunoprécipité l'antigène de 28,5 kDa, parmi les AES-³⁵S-Met (piste 2) et les AES-³⁵S-Met qui se fixent à la Con A (piste 5).

4.3. Les antigènes marqués par ¹²⁵I des tachyzoïtes et des bradyzoïtes présentant des épitopes communs

L'immunoprécipitation de l'extrait membranaire des tachyzoïtes marqués par ¹²⁵I par un sérum humain prélevé en phase subaiguë de toxoplasmose révèle les antigènes de surface de 43, 35, 30 et 22 kDa (Fig 10, piste 2) classiquement décrits (pour revue voir Couvreur et coll., 1988). Ces mêmes antigènes sont révélés par les sérums de souris immunisées par les AES, avec cependant une réponse préférentielle dirigée contre les antigènes de 43 et 30 kDa (Fig 10, piste 8). Par contre, les sérums humains prélevés durant la phase chronique de l'infection, avec des faibles taux d'IgG résiduels ne reconnaissent que l'antigène de 43 kDa (Fig 10, piste 4). Cet antigène est de plus révélé de façon majeure par l'immunoprécipitation de l'extrait membranaire de tachyzoïtes marqué par ¹²⁵I avec les sérums de souris immunisées contre l'extrait total de bradyzoïtes (Fig 10, piste 12).

Quand l'extrait de bradyzoïtes marqués par ¹²⁵I est immunoprécipité par les sérums humains de phase subaiguë (Fig 10, piste 5), les sérums de souris immunisées par les AES

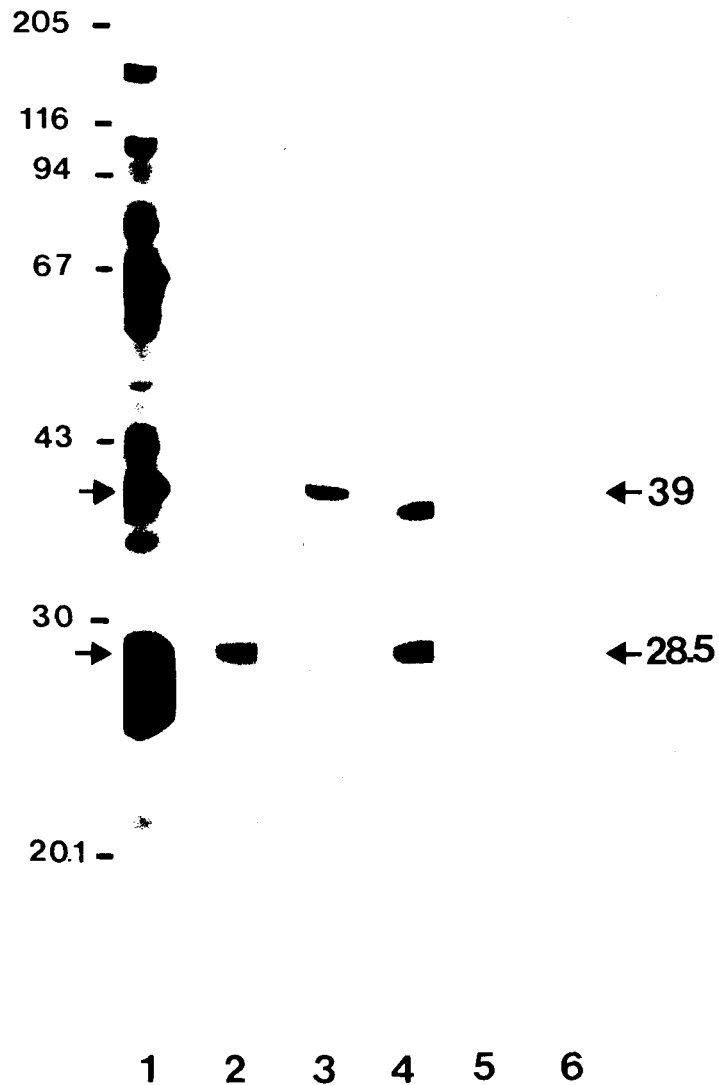


FIGURE 9. Identification des AES marqués par la ^{35}S -Met et se fixant à la Con A.

- Immunoprécipitation des AES- ^{35}S -Met (pistes 1 à 3) par deux sérums de souris: immunisée par les AES (piste 1) et immunisée par l'extrait de bradyzoïtes (piste 3), et par un sérum de rat immunisé par l'extrait de bradyzoïtes (piste 2).
- Immunoprécipitation des AES- ^{35}S -Met se fixant à la Con A (pistes 4 à 6) par deux sérums de souris: immunisée par les AES (piste 4) et immunisée par l'extrait de bradyzoïtes (piste 6), et par un sérum de rat immunisé par l'extrait de bradyzoïtes (piste 5). (SDS-PAGE, 10% d'acrylamide).

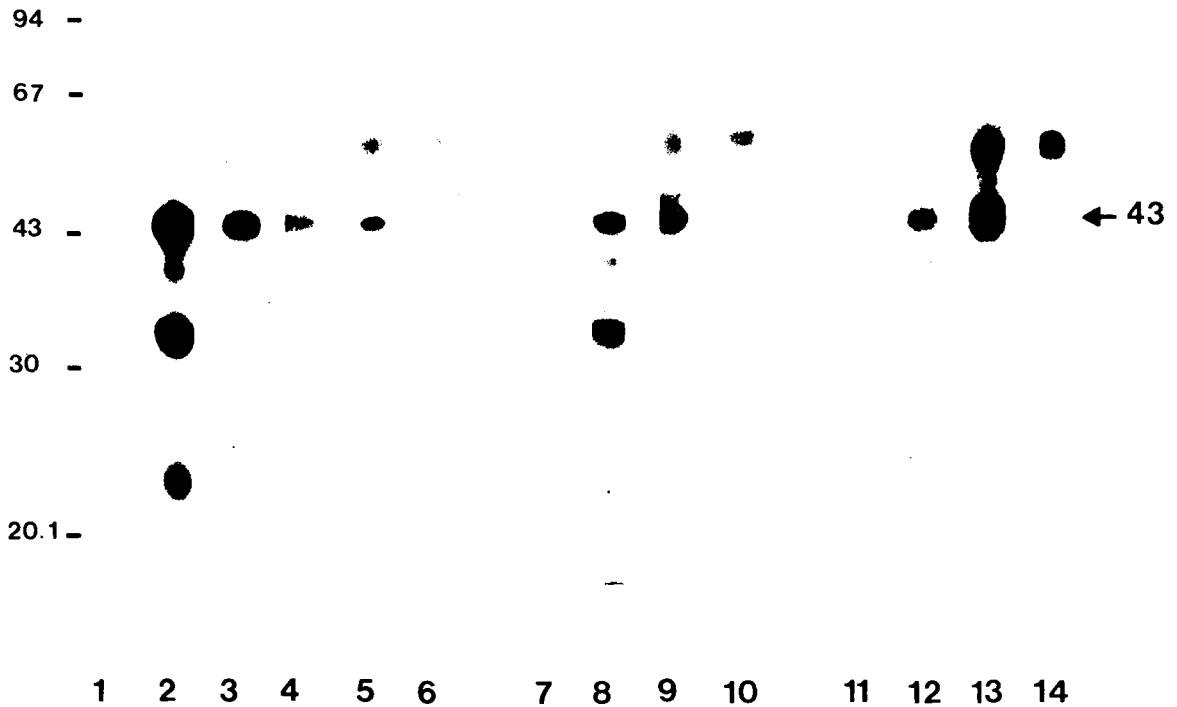


FIGURE 10. Antigènes des tachyzoïtes et des bradyzoïtes marqués par ^{125}I , présentant des épitopes communs.

- Immunoprécipitation des antigènes de surface radiomarqués des tachyzoïtes:

par différents sérums humains: contrôle (piste 1), prélevé au cours de la phase subaiguë (IgG = 1600 UI; IgM = faible taux) (piste 2) et au cours de la phase chronique de l'infection avec un faible taux d'IgG résiduels (IgG = 50 UI; IgM = négatif) (piste 4),

par différents sérums de souris: contrôle (piste 7), immunisée par les AES (piste 8), immunisée par un extrait de cerveau de souris non infectées (piste 11) et immunisée par un extrait de bradyzoïtes (piste 12).

- Immunoprécipitation des antigènes de surface radiomarqués des tachyzoïtes se fixant à la Con A (piste 3) par le même sérum humain que dans la piste 2.

- Immunoprécipitation des antigènes radiomarqués de l'extrait total de bradyzoïtes:

par deux sérums humains: de la phase subaiguë de l'infection (piste 5) et contrôle (piste 6),

par différents sérums de souris: immunisée par les AES (piste 9), contrôle (piste 10), immunisée par l'extrait de bradyzoïtes (piste 13) et contrôle (immunisées par l'extrait de cerveaux de souris non infectées) (piste 14). (SDS-PAGE, 10% d'acrylamide).

(Fig 10, piste 9) ou de souris immunisées par l'extrait de bradyzoïtes (Fig 10, piste 13), une réponse anticorps majeure est mise en évidence contre l'antigène de 43 kDa accompagnée d'une bande de plus faible intensité de 56 kDa. Cette bande de 56 kDa semble non spécifique puisqu'elle est également observée sur les profils d'immunoprécipitation par les sérums contrôles (Fig 10: humain, piste 6; souris, pistes 10 et 14).

Enfin, l'antigène de 43 kDa est glycosylé puisqu'il est révélé de façon intense par l'immunoprécipitation de l'extrait membranaire de tachyzoïtes marqué par l'iode radioactif et élué à partir d'une colonne de Con A, par le sérum humain de phase subaiguë (Fig 10, piste3).

5. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-*T.GONDII*

Après immunisation de souris BALB/c avec les AES, la souris qui présentait le titre en anticorps le plus élevé en IFI (1/2560), et en ELISA (10^{-5}) vis-à-vis de l'extrait total de tachyzoïtes a été utilisée pour l'hybridation cellulaire.

Après la fusion cellulaire, les cellules ont été réparties dans 260 alvéoles parmi lesquelles 210 (80%) ont présenté des clones hybrides viables.

5.1. Sélection des clones hybrides producteurs d'anticorps monoclonaux anti-*T.gondii*

Les surnageants des alvéoles qui contenaient des hybridomes ont été testés par les techniques d'ELISA et IFI, vis-à-vis d'un extrait total de tachyzoïtes et sur des tachyzoïtes formolés fixés à l'acétone respectivement, afin de sélectionner les populations cellulaires sécrétant des anticorps anti-*T.gondii*.

Quinze clones ont été sélectionnés pour leur réactivité en ELISA parmi lesquels sept sécrètent des anticorps plus ou moins réactifs vis-à-vis des tachyzoïtes en IFI. En effet, parmi les hybridomes positifs en IFI, certains surnageants d'hybrides (TG17-155, TG17-97, TG17-190, TG17-49) induisent une immunofluorescence uniforme à la surface de tous les tachyzoïtes fixés sur lame, alors que d'autres (TG17-113, TG17-179 et TG17-151) révèlent

50 à 60 % de tachyzoïtes fluorescents. D'autres hybridomes, tel que le clone TG17-43, se sont révélés négatifs en IFI, bien qu'étant très réactifs en ELISA.

5.2. Caractérisation isotypique des anticorps monoclonaux

Par la méthode d'Ouchterlony, nous avons déterminé l'isotypie des AcMc qui par la suite ont été les plus étudiés.

Les AcMc TG17-190 et TG17-49 sont d'isotype IgG3 et les AcMc TG17-113, TG17-179 et TG17-43 d'isotype IgG1. L'AcMc TG05-54 (Rodriguez et coll., 1985) que nous avons souvent utilisé comme contrôle possède l'isotype IgG2b.

6. IDENTIFICATION DES ANTIGENES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

Dans le but d'identifier les antigènes des tachyzoïtes cibles des AcMc obtenus et afin de sélectionner les AcMc dirigés contre les AES, nous avons utilisé deux techniques différentes: (1) l'immunoprécipitation des différents extraits antigéniques de tachyzoïtes marqués par ^{125}I ou la ^{35}S -méthionine, par les AcMc; (2) l'immunoélectrotransfert des antigènes de l'extrait total de tachyzoïtes et des AES, testés vis-à-vis des AcMc.

6.1. Immunoprécipitation des antigènes de tachyzoïtes par les anticorps monoclonaux

6.1.1. Les antigènes de surface marqués par ^{125}I

La figure 11 illustre les antigènes de surface des tachyzoïtes marqués par ^{125}I , immunoprécipités par les surnageants de culture de nos hybridomes (pistes 1, 2, 4, 5 et 6) et comme contrôles, par le surnageant du myélome SP2/O (piste 3) et par l'AcMc TG05-54 anti-P30 (piste 7).

Deux clones cellulaires, TG17-190 (pistes 1 et 4) et TG17-49 (piste 2), ont été ainsi identifiés comme produisant des anticorps vis-à-vis de l'antigène membranaire de 22 kDa.

Deux autres clones, TG17-155 (ligne 5) et TG17-97 (ligne 6) ont immunoprécipité l'antigène majeur de surface des tachyzoïtes, P30.

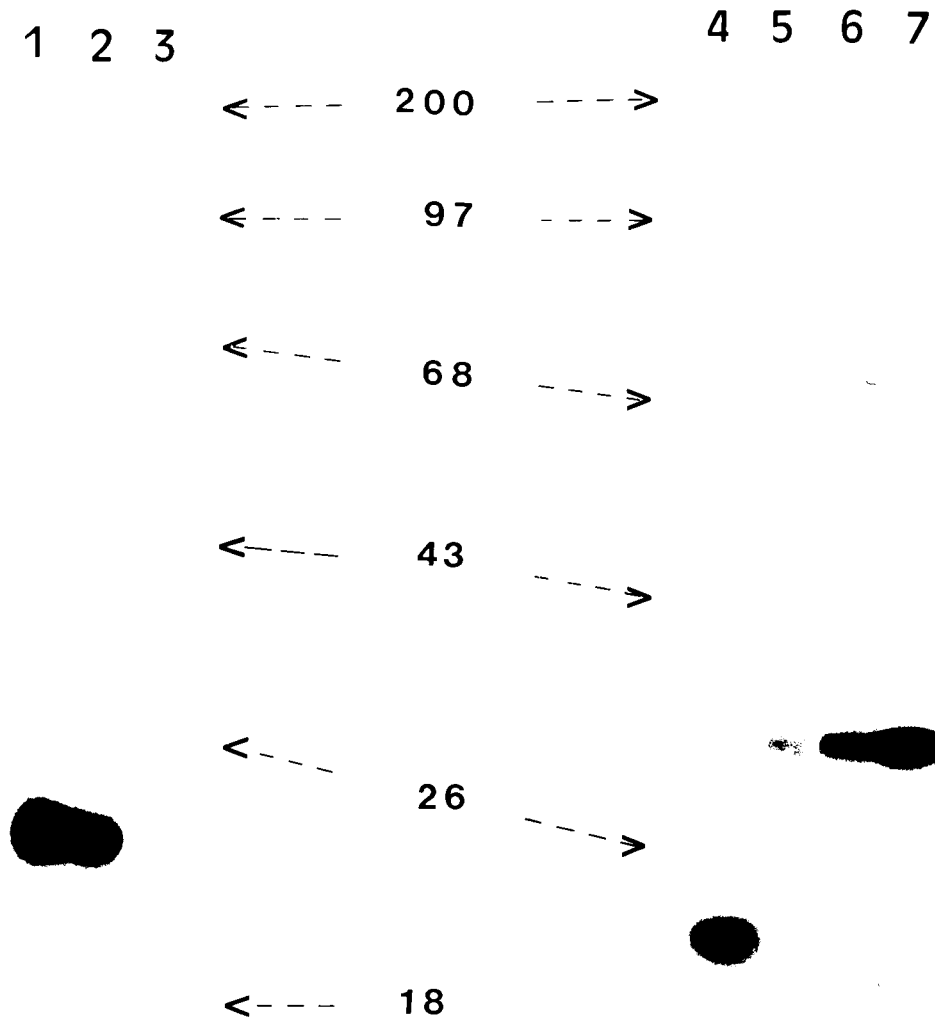


FIGURE 11. Identification des antigènes de surface des tachyzoïtes marqués par ^{125}I et cibles des AcMc.

Immunoprécipitation des antigènes de surface radiomarqués des tachyzoïtes par les AcMc: TG17-190 (pistes 1 et 4), TG17-49 (piste 2), TG17-155 (piste 5), TG17-97 (piste 6), TG05-54 (piste 7) et par le surnageant du myélome SP2/O (piste 3). (SDS-PAGE, 10% d'acrylamide).

6.1.2. Les antigènes solubles marqués par ^{125}I

L'immunoprécipitation des antigènes solubles marqués par ^{125}I avec les surnageants des différents hybridomes n'a pas révélé de bande, sauf dans le cas du clone TG17-43 qui reconnaît un antigène de 27 kDa (Fig 12).

6.1.3. Les antigènes excrétés-sécrétés marqués par la ^{35}S -méthionine

Les AES produits après marquage métabolique des tachyzoïtes par la ^{35}S -Met ont été immunoprécipités par les surnageants des différents hybridomes et comme contrôles, par un sérum de souris saine (Fig 13, A, piste 2) et par un sérum de souris immunisée par les AES (Fig 13, A, piste 3).

Seul le surnageant du clone TG17-43 a immunoprécipité une molécule de 27 kDa (Fig 13, A, piste 1). Cet antigène de 27 kDa est un AES qui suscite une réponse humorale intense chez les souris immunisées par les AES bien que d'autres molécules de 28,5, 39 ou 69 kDa soient également fortement reconnues (Fig 13, A, piste 3).

6.1.4. Les antigènes somatiques marqués par la ^{35}S -méthionine

La figure 13,B montre le profil des antigènes somatiques extraits par le détergent NP40, immunoprécipités à l'aide d'un sérum de souris anti-AES (piste 3), d'un sérum de souris saine (piste 2) ou par le surnageant du clone TG17-43 qui reconnaît l'antigène de 27 kDa (piste 1).

En conclusion, par la technique d'immunoprécipitation des antigènes radiomarqués des tachyzoïtes, nous avons pu caractériser la spécificité antigénique de cinq AcMc (voir tableau récapitulatif, Table 5). Parmi les cinq clones d'hybrides, le clone TG17-43 produit un AcMc dirigé contre un AES de 27 kDa. Les autres clones produisent des anticorps dirigés contre deux antigènes majeurs de la surface des tachyzoïtes, P22 et P30. En effet, ces deux antigènes membranaires, bien que très faiblement présents dans les préparations d'AES, sont apparemment fort immunogènes.

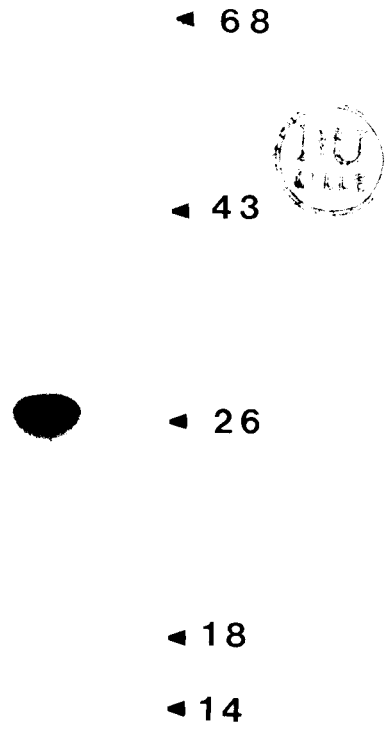


FIGURE 12. Immunoprécipitation des antigènes solubles marqués par ^{125}I par l'AcMc TG17-43 (dernière piste à droite) et par les autres AcMc TG17 (les autres pistes).

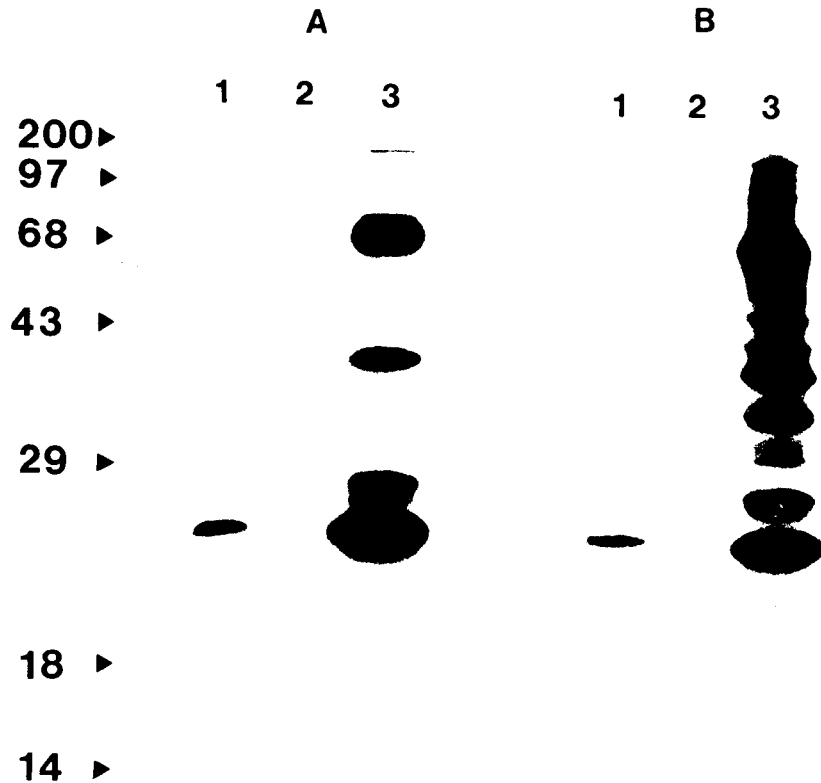


FIGURE 13. Identification des antigènes de tachyzoïtes marqués par la ^{35}S -Met reconnus par des AcMc.

Analyse électrophorétique (SDS-PAGE, 13% d'acrylamide) des AES (A) et des antigènes somatiques extraits au NP40 (B) immunoprécipités par l'AcMc TG17-43 (pistes 1), par un sérum de souris contrôle (pistes 2) et par un sérum de souris immunisée par les AES (pistes 3).

6.2. Identification des antigènes cibles par immunoélectrotransfert

6.2.1. Immunoélectrotransfert d'un extrait antigénique total

La figure 14 démontre l'immunoréactivité des AcMc (pistes 1 à 5) comparée à celle des sérums polyclonaux (pistes 6 à 10), vis-à-vis des antigènes d'un extrait total de tachyzoïtes, en conditions réductrices (en présence de β mercaptoéthanol) (Fig 14,A) ou non réductrices (sans β mercaptoéthanol) (Fig 14,B).

Nous avons pu ainsi caractériser la spécificité antigénique d'un clone d'hybrides, l'AcMc TG17-179, qui reconnaît un antigène de P.M. apparent de 28,5 kDa, en conditions réduites et non réduites (pistes 2, A et B). Ce même antigène est également reconnu par un sérum de souris en phase chronique d'infection (piste 6,A) et par des sérums de souris immunisées par les AES (pistes 7 et 8, A).

Par cette technique également, l'AcMc TG17-43 détecte un antigène de P.M. apparent de 27 kDa (pistes 1, A et B).

Les AcMc TG17-190 (pistes 3) et TG17-49 (pistes 4) qui sont dirigés contre l'antigène de surface des tachyzoïtes, P22, se comportent, cependant, différemment en conditions réduites (A) et non réduites (B): alors qu'en conditions réductrices l'antigène de 22 kDa n'est que faiblement reconnu par ces AcMc (pistes 3 et 4, A) et par les sérums polyclonaux (pistes 6, 7, 8 et 9, A), en conditions non réductrices, un antigène de P.M. apparent de 19 kDa est fortement détecté par les 2 AcMc (pistes 3 et 4, B) ainsi que par les mêmes sérums polyclonaux de souris infectée (piste 6, B) ou immunisées par les AES (pistes 7 et 8, B) et de lapin immunisé par un extrait total de tachyzoïtes (Leite-Cardarelli, 1988) (piste 9, B). De la même façon, l'AcMc contrôle anti-P30, TG05-54, ne reconnaît pas, en immunoélectrotransfert, l'antigène P30 sous sa forme réduite (piste 5, A), alors que dans les mêmes conditions, P30 est reconnu par les sérums de souris e phase chronique de l'infection (piste 6, A), de lapin hyperimmun (piste 9, A) et un sérum de lapin polyclonal monospécifique anti-P30 (Leite-Cardarelli, 1988) (piste 10, A). Enfin, nous constatons qu'en absence de β mercaptoéthanol et dans ces conditions de gels à 13% de polyacrylamide, l'antigène de 28,5 kDa cible de l'AcMc TG17-179 (piste 2, B) et l'antigène P30 cible de l'AcMc TG05-54 (piste 5, B) et du sérum polyclonal anti-P30 de lapin (piste 10, B)

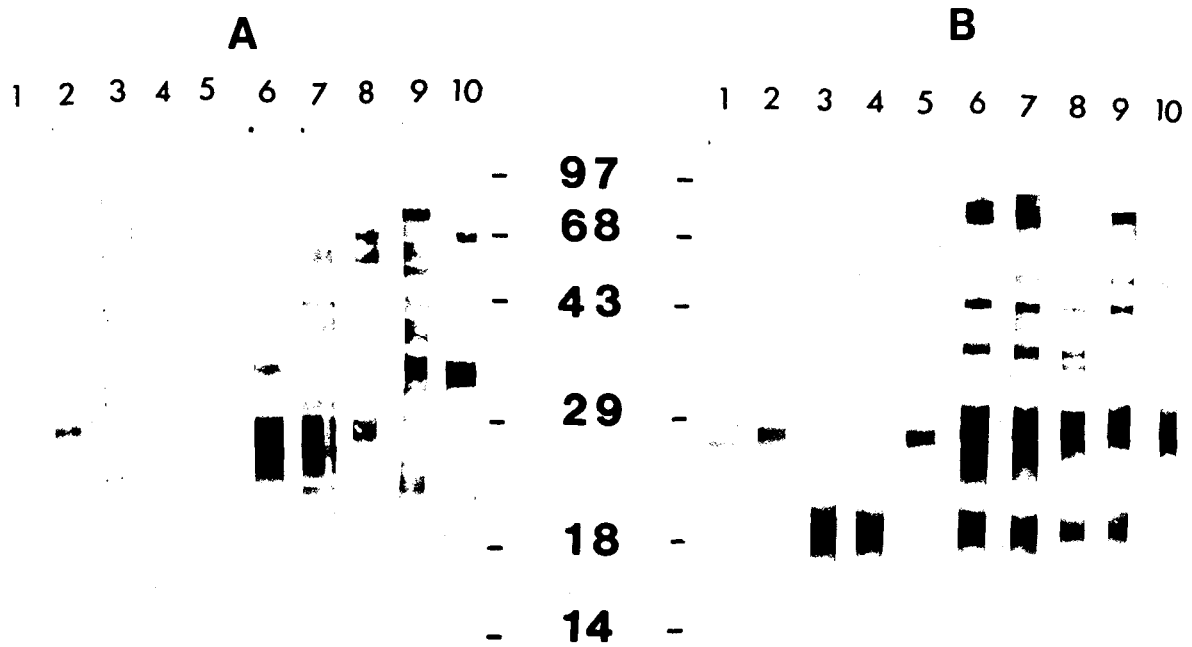


FIGURE 14. Identification des antigènes cibles des AcMc par immunoélectrotransfert d'un extrait antigénique total de tachyzoïtes après leur migration en SDS-PAGE (13% d'acrylamide), en présence (A) ou en absence de mercaptoéthanol (B).

- AcMc TG17-43 (1), TG17-179 (2), TG17-190 (3), TG17-49 (4), TG05-54 (5),
 - Sérums de souris en phase chronique d'infection (6), de souris immunisées par les AES (7 et 8), de lapin immunisé par un extrait total de tachyzoïtes (9), de lapin immunisé par l'antigène P30 purifié (10).

présentent des migrations comparables.

6.2.2. Immunoélectrotransfert des antigènes excrétés-sécrétés

Lorsque les différents AcMc ont été testés par immunoélectrotransfert contre les AES non réduits (Fig 15), l'AcMc TG17-113 qui réagit avec une molécule de 21 kDa (piste 2) a été identifié. L'AcMc TG17-43 reconnaît l'antigène de 27 kDa (piste 3) et l'AcMc TG17-179, l'antigène de 28,5 kDa (piste 4). La piste 1 montre les AES révélés par un sérum de souris immunisée par les AES, utilisé comme témoin.

Il faut noter que la présence d'une grande quantité de protéines sériques, due au sérum de veau dans les préparations d'AES exclut l'observation, par cette technique, des antigènes de P.M. 40 à 80 kDa. Néanmoins, ces préparations conviennent pour la détection des antigènes de bas P.M. cibles de nos AcMc, ce qui nous permet de démontrer que l'antigène de 21 kDa, détecté beaucoup plus intensément dans les AES que dans les antigènes somatiques, est activement sécrété.

6.2.3. Réactivité vis-à-vis de l'antigène recombinant P24

Dans le but du clonage d'un AES de *T. gondii* potentiellement protecteur, les produits de traduction des ARN messagers des tachyzoïtes ont été immunoprécipités par un sérum de lapin immunisé par les AES, par des sérums humains en phase aiguë et chronique de toxoplasmose et par nos AcMc: un produit de traduction de 24 kDa a été détecté par le sérum de lapin anti-AES et par les sérums humains en phase chronique (Cesbron-Delauw et coll., 1989), et également par l'AcMc TG17-43 (Cesbron-Delauw, comm. personnelle). Par la suite, Cesbron-Delauw et coll. (1989) ont réalisé le clonage du gène codant pour la protéine P24: une banque d'ADNc a été construite dans le vecteur d'expression Lambda gt 11 et les clones recombinants ont été criblés de façon différentielle, d'une part par le sérum de lapin anti-AES et d'autre part par un sérum humain en phase aiguë non réactif vis-à-vis de P24. Trois clones (TX8, TX10 et TX11) ont été sélectionnés et leur inserts sous-clonés dans le phage M13 avant d'être séquencés (Fig 17).

Nous avons vérifié la réactivité des AcMc anti-AES vis-à-vis des protéines recombinantes exprimées chez *E. coli*. La figure 16 illustre la réaction des AcMc anti-AES en



FIGURE 15. Identification des AES reconnus par les AcMc.

Immunoélectrotransfert des AES après migration en SDS-PAGE (10% d'acrylamide) en conditions non réductrices:

- (1) sérum de souris immunisée par les AES,
- (2) AcMc TG17-113,
- (3) AcMc TG17-43,
- (4) AcMc TG17-179.

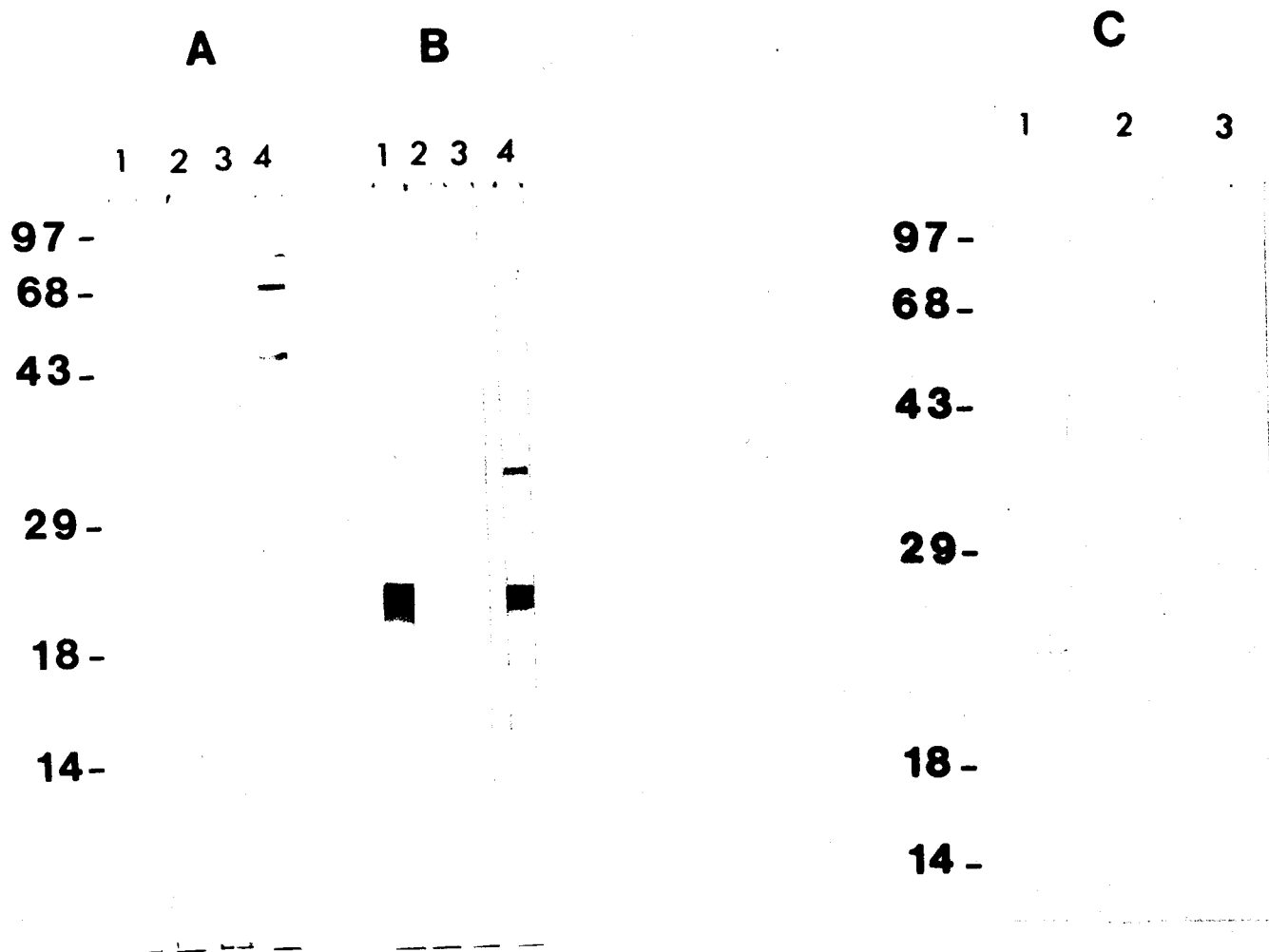


FIGURE 16. Reconnaissance de l'antigène recombinant P24 par l'AcMc TG17-43.

- Immunoélectrotransfert de l'extrait soluble de tachyzoïtes (A) et de la protéine recombinante issue du clone bactérien TX8 (B):

- (1) AcMc TG17-43,
- (2) AcMc TG17-179,
- (3) AcMc TG17-113,
- (4) sérum de souris immunisée par les AES.

- En C: immunoréactivité de l'AcMc TG17-43 vis-à-vis des protéines recombinantes issues des clones bactériens TX8 (piste 1), TX11 (piste 2) et de l'extrait brut d'*E.coli* Y1090 (contrôle) (piste 3).

immunoélectrotransfert, vis-à-vis d'un extrait soluble de tachyzoïtes (A) comparé au produit du clone recombinant TX8 (B) et en particulier, la réaction de l'AcMc TG17-43 (en C) vis-à-vis des protéines recombinantes exprimées par les clones TX8 (piste 1, C) et TX11 (piste 2,C).

L'AcMc TG17-43 réagit d'une part avec un antigène soluble de 27 kDa (piste 1, A), mais aussi avec la protéine recombinante exprimée par le clone TX8 (piste 1, B). Parallèlement, les mêmes bandes sont détectées par un sérum de souris anti-AES (pistes 4, A et 4, B). Il est intéressant de noter que les AcMc TG17-179 (pistes 2, B) et TG17-113 (pistes 3, B) ne détectent ni la protéine recombinante, ni d'antigènes dans l'extrait soluble (pistes 2 et 3, A), les antigènes cibles se trouvant dans l'extrait membranaire des tachyzoïtes. Les bandes d'intensité plus faible observées avec le sérum de souris anti-AES et avec l'AcMc TG17-43 dans la préparation de protéine recombinante (pistes 1 et 4, B) sont dues à des réactions non spécifiques qui disparaissent quand les sérums et l'AcMc sont auparavant épuisés contre un extrait d'*E. coli* (Fig 16, C).

La figure 16,C montre la réaction de l'AcMc TG17-43 avec les produits d'expression des clones bactériens TX8 (piste 1) et TX11 (piste 2) en comparaison avec l'extrait brut d'*E. coli* Y1090 (piste 3). Le clone TX11 renfermant un insert plus long que le clone TX8 et également plus long que l'antigène natif (voir Fig 17), les protéines recombinantes correspondantes ont des P.M. apparents différents.

Ainsi, nous disposons d'une sonde AcMc spécifique de la protéine recombinante P24.

7. SEQUENCAGE PARTIEL DE L'ANTIGENE NATIF P27

Suite à la construction d'une banque d'ADN génomique de tachyzoïtes qui a été criblée par une sonde oligonucléotidique de synthèse correspondant à l'extrémité 5' de l'ADNc de TX11, un fragment d'ADN génomique de 1,5 kb a été sélectionné et séquencé ainsi que les inserts des clones TX8, TX10 et TX11 (Cesbron-Delauw et coll., 1989), (Fig17).

Afin de comparer les séquences nucléotidiques obtenues avec la séquence en amino-acides de la protéine native, l'antigène de 27 kDa a été isolé des préparations d'AES, par

```

AAAACCCCTCGAAGGCTGCTAGTACTGGTGTGATCGTATGGACACGGCGAATCACGGCGTATGGACAAGCCGGGAT 75
GCTGATGAGCGTGCTTCCCCTGAAGGEGCGGAGTGGTGGCCACCACCGGTACCTGGCGTCTCAGCTGCGC 150
GAGGCACCCCTCTCATAGCGTGGTACTCGTACGAAATACCAATCGCTGGGGTCGGGCGGAGGAATATGCTGTT 225
TGTTGACCATACGATCACCCTGAACGAAAACATGGTATGAGACGGCGTAAGCGGGCACAGGTTGTTGCCCTCGT 300
CTCATTCGGGACCAATCCCCTGCCCGCTCCCGTCCGCTCGACTCGACGGTGTGACCACCCCACTTCGCATTCGGC 375
AGTCGGTAAAGCCACAACATTACTTTGCAATTTATCGGTTGAAACTGCCGAGGAGCTTCGGTTTTTGGGTGCT 450
      17
      L O F Y R L K L P S E L A F L G A
ATCTTCTCCCACCTTTTATCAGTTAAGTTGTACAGTGAGTGTGACGTTGTTTCGACAGCTGTATAGACGCAAC 525
      42
      I F S H L L S V K L Y S E C Q L V S T R L Y R R N
TCGGTTTGCCTGTGTGTTGGTGGCTGGCCAAATCAAAGGCTATTCATTTTCACTTGCCTGTGTCTTGAAG 600
      67
      S V C L C C L V A G O I K G Y S F F T C C C S L K
AAATCAAGCAACATGTCGCTGTGAGCGCTATTGTCCGAGCTGCTGCATCGGTGTGCTGTGCTGTCCGGC 675
      72
      K S S K M V R V S A I V G A A A S V F V C L S A G
GCTTACGCTGCCAAGGGCGGACAAACCAGTCGAGCGCGTCTCAGATCGGGCGTCTCTTTGGTTTGGTGTGAGT 750
      117
      A Y A A E G G D [ N O S ] S A V S D R A S L F G L L S
      YTX10      YTX8
GGAGGCACAGGGCAGGGATTAGGAATCGGAGAACTGTAGATTGGAGATGATGGGGAACACGATTCGTGTGGAG 825
      142
      G G T G Q G L G I G E S V D L E M M G N T Y R V E
      . . . . .
AGACCCACAGGCAACCCCGACTTGCCTCAAGATCGCCATTAAGCTTCAGATGGATCGTACAGGAAAGTCGGCAAT 900
      167
      R P T G N P D [ L L K I A I K A S D G S Y S E V G N
      . . . . .
GTTAACGTGGAGGAGGTGATTGATACTATGAAAAGCATGCAGAGGGACGAGGACATTTCTTCTGTCGTTGAAC 975
      192
      V N V E E V I D I M K S M [ Q R D E D I F L R A L N
      . . . . .
AAAGGCCAAGCAGTAGAGGAAGCGATCGAAGACGTGGCTCAAGCAGAAGGGCTTAATTCGGGCAAAACCTGCAA 1050
      217
      K G E T [ V E E A I E D V A Q A E G L N S E Q T L Q
      . . . . .
CTCGAAGATGCAGTGAAGCGGTTGGCGTCTGTTGTTCAAGACGAGATGAAGTGTGACGATGTGCAGCAGCTT 1125
      242
      L E D A V S [ A V A S V V Q D E M K V I D D V Q Q L
      . . . . .
GAAAAGGCAAAACACAGCTTAAGGATGACATTCGGTTCCTAACAGGAGAGAGAGTAATTCGGGTTAGCTTTG 1200
      261
      E K D K Q Q L K D D I G F L T G E R E *
TTGTGATCGTACCCCATGTTACTTCACTGCTGTGGCATATGTTGGGGGAAATGCTCGGATATCTTCATTTG 1275
GTTGCTCGTATATCTTCATTTGGTTTCAATCGACGGCGTGTGTCAGCTGTGAAAGTGTGATGGTGGTACCCGGT 1350
GACGAAATCGCAGGTTAATAGTGGAAAGACCGGTGACATGGTCTTTGGGAGCAGTTCTCCAGTCTTTCTCAGTGA 1425
CGGCAAAAATGAACGATGCACGGCCGATAGAATGGGGAGCAGTGGCCCAACCCAGCAGGCGGTGAATACATT 1500
GGGTTGAGGGCTGGCGTGCAGCTCCATTTTCTCAACCCGAGTAAATGTAGTTCGCCGTGGTTGTTGCTCAGTTEA 1575
ATTCCGTGCGTCCGTTTTGCGTTTTGCTAGTGGCAGCAGATGTAGTGTCAAGAACTAGGAAAGAAGAGAG 1650
GAGGCAGGAATAATTTGCACACGACGAAAAA 1690

```

FIGURE 17. Séquence nucléotidique du gène codant pour P24.

Les têtes de flèches indiquent les extrémités 5' des quatre ADNc (TX3.3, TX11, TX10 et TX8). Les codons stop sont soulignés en gras. Une région CAAT et des séquences riches en G+C dans la région promotrice potentielle sont soulignées. La séquence en aminoacides indiquée est déduite à partir de la séquence du plus long ADNc en phase avec la β -galactosidase. Le codon d'initiation présumé au niveau de la Met-72 est encadré. Le site de clivage potentiel situé après le peptide hydrophobe ressemblant à une séquence signal est indiqué par une flèche descendante (après l'Ala-95). Un site possible de glycosylation est encadré en pointillés. Les aminoacides correspondant aux trois peptides obtenus après clivage au CNBr de l'antigène natif sont soulignés par des points. Les deux domaines liant le calcium sont aussi encadrés.

(d'après Cesbron-Delauw et coll., 1989).

chromatographie d'affinité et soumis au séquençage en acides aminés par la société Transgène (Strasbourg). Bien que l'acide aminé en position N-terminale soit bloqué, le séquençage partiel après coupure par le bromure de cyanogène a permis l'analyse de 3 peptides différents qui correspondent à des séquences nucléotidiques des ADNc (Fig 17).

Ces observations démontrent que l'antigène natif correspond bien à la protéine recombinante P24, et confirment la séquence nucléotidique de son gène.

8. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES EXCRETES-SECRETES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

8.1. Fixation de calcium par l'antigène cible de l'AcMc TG17-43

Récemment Cesbron-Delauw et coll. (1989) ont démontré que la protéine recombinante exprimée par le clone bactérien TX8 est capable de fixer le $^{45}\text{Ca}^{2+}$; par ailleurs la séquence nucléotidique du gène codant pour P24 présente deux domaines susceptibles de fixer le calcium (Fig 17).

Nous avons alors recherché si l'antigène natif P27, cible de l'AcMc TG17-43, présente également la propriété de fixer le calcium (Fig 18). Une préparation d'antigènes solubles (selon Sibley et coll., 1986) séparés par SDS-PAGE, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose a été incubée d'une part avec du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ puis autoradiographiée (piste 1); d'autre part, la même membrane a été incubée avec l'AcMc TG17-43, incubation suivie d'une révélation immunoenzymatique (piste 2). La même bande est révélée par les deux procédés, ce qui confirme que l'antigène natif P27 fixe le calcium.

8.2. Fixation à la Con A de l'antigène cible de l'AcMc TG17-179

Ayant auparavant caractérisé un AES majeur de 28,5 kDa qui se fixait à la Con A (voir 4.2), nous avons voulu vérifier si l'AcMc TG17-179 est effectivement dirigé contre cet antigène glycosylé.

Comme, il nous était impossible d'identifier l'antigène cible de TG17-179 par la technique d'immunoprécipitation, cet AcMc n'étant pas immunoprécipitant, nous avons testé

$^{45}\text{Ca}^{++}$ TG17-43



1

2



FIGURE 18. Analyse en SDS-PAGE des protéines sécrétées dans un milieu dépourvu de calcium et transférées sur feuille de nitrocellulose.

(1) Autoradiographie après révélation par $^{45}\text{Ca}^{2+}$

(2) Révélation immunoenzymatique après incubation de la même feuille par l'AcMc TG17-43.

les AcMc dirigés contre les AES en ELISA, vis-à-vis des antigènes d'un extrait total de tachyzoïtes élués à partir d'une colonne de Con A.

Alors que les trois AcMc TG17-113, TG17-43 et TG17-179 sont bien positifs en ELISA vis-à-vis d'un extrait total de tachyzoïtes (procédé de détection des hybridomes producteurs d'AcMc), seul l'AcMc TG17-179 réagit quand il s'agit des antigènes élués sur une colonne de Con A. En effet, l'ascite contenant l'AcMc TG17-179 diluée au 500ème est encore réactive vis-à-vis de l'extrait Con A alors que les ascites renfermant les AcMc TG17-113, TG17-43 et l'ascite du myélome non sécrétant SP2/O diluées au 50ème sont négatives dans ce test (Table 3). Ceci démontre que l'AES glycosylé GP28,5 est bien la cible de l'AcMc TG17-179.

8.3. Etablissement de la nature protéique de l'épitope de GP28,5 reconnu par l'AcMc TG17-179

Afin de vérifier la nature protéique du déterminant antigénique de GP28,5 reconnu par l'AcMc TG17-179, nous avons procédé à la déglycosylation des antigènes d'un extrait total de tachyzoïtes.

La figure 19 montre l'immunoélectrotransfert des antigènes non réduits par le β mercaptoéthanol, déglycosylés par le TFMS (A) ou par le périodate de sodium (B) en comparaison avec l'extrait antigénique initial (C) testés vis-à-vis des AcMc suivants:

-pistes 1: TG22-DG5, dirigé contre l'antigène de 97 kDa, vraisemblablement glycosylé, de *T.gondii* (AcMc contrôle, récemment préparé dans notre laboratoire)

-pistes 2: TG05-54, anti-P30 (contrôle)

-pistes 3: TG17-43, anti-P27

-pistes 4: TG17-179, anti-GP28,5

-pistes 5: TG17-49, anti-P22

Les deux procédés de déglycosylation semblent être satisfaisants puisque l'antigène cible de l'AcMc contrôle TG22-DG5 présente un P.M. apparent plus faible, après 3 h de traitement par le périodate de sodium (piste 1, B) et perd son antigénicité après déglycosylation par le TFMS (piste 1, A). Cet antigène pourrait être une glycoprotéine avec

TABLE 3. Test ELISA utilisant la fraction antigénique qui se fixe à la Con A⁽¹⁾

Echantillons	Dilutions			
	1:50	1:100	1:500	1:5000
sérum de souris saine	0.53	0.20	0.20	0.12
sérum de souris anti-AES	>2	>2	>2	0.65
ascites				
SP2/O	0.18	0.15	0.10	0.10
TG17-113	0.17	0.12	0.08	0.08
TG17-43	0.23	0.15	0.10	0.07
TG17-179	>2	1.20	0.43	0.10

(1) Densité optique à 492 nm.

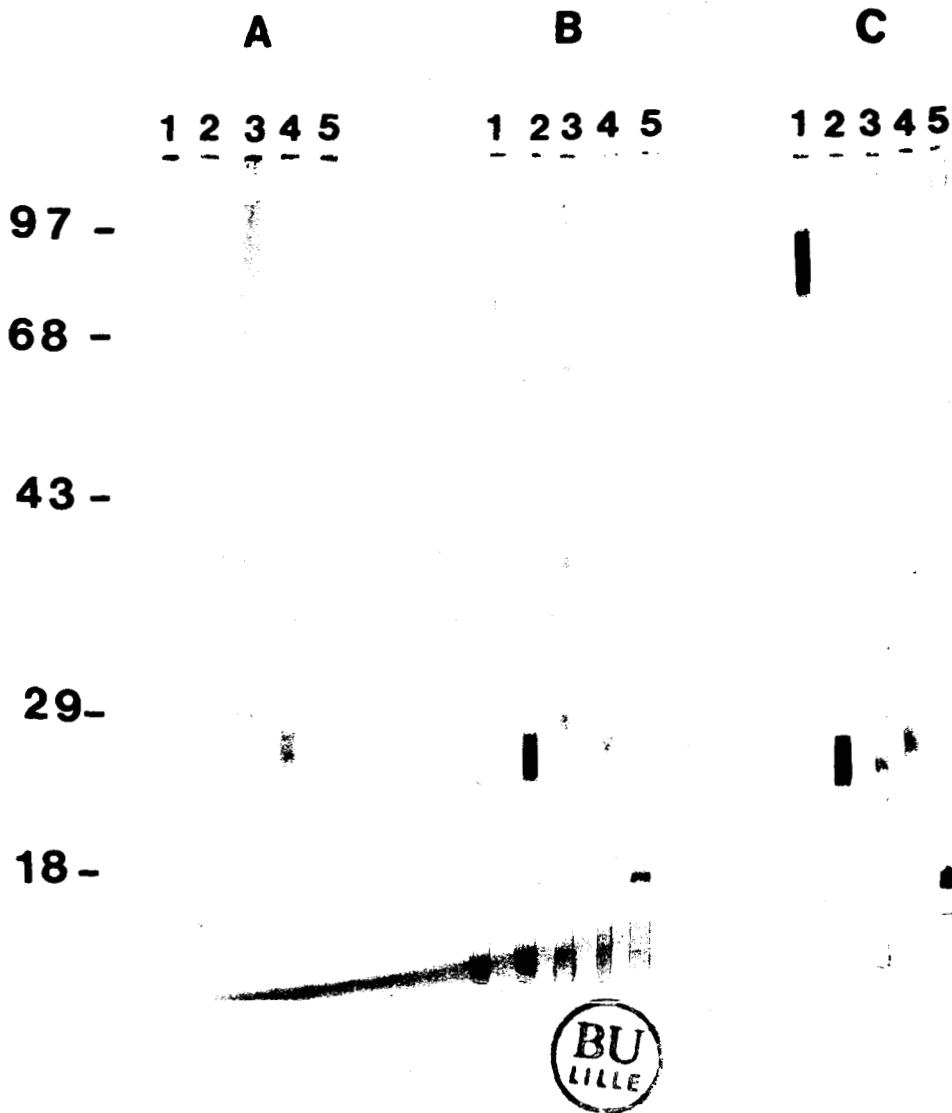


FIGURE 19. Immunoélectrotransfert des antigènes de l'extrait de tachyzoïtes déglycosylés par le TFMS (A) ou par le périodate de sodium (B) comparés aux antigènes non déglycosylés (C):

- (1) AcMc TG22-DG5,
- (2) AcMc TG05-54,
- (3) AcMc TG17-43,
- (4) AcMc TG17-179,
- (5) AcMc TG17-49.

un déterminant antigénique de nature glycosidique qui serait partiellement déglycosylée à la suite de 3 h d'oxydation par le périodate, alors que le traitement par le TFMS étant plus sévère aboutirait à la dénaturation totale de son épitope. D'autres antigènes, P30 (pistes 2) et P22 (pistes 5) de nature protéique ne semblent pas être affectés par ces traitements puisque leur antigénicité et leur migration sur gels SDS-PAGE ne sont pas modifiées. Cependant, l'antigène P27 qui est aussi de nature protéique (antigène non retenu par la Con A) semble être légèrement dénaturé suite aux traitements par ces acides (pistes 3, A et B); la molécule faiblement dénaturée présenterait alors une structure tertiaire plus relâchée, ce qui peut expliquer une migration plus difficile dans le gel d'acrylamide et un P.M. apparent qui augmente de 27 kDa (piste 3, C) à 29 kDa après les traitements acides (pistes 3, A et B).

Enfin, l'AcMc TG17-179, qui reconnaît l'antigène GP28,5 même après déglycosylation (pistes 4, A et B), est vraisemblablement dirigé contre un épitope de nature protéique. Ayant vérifié la nature protéique du déterminant antigénique de GP28,5, l'AcMc TG17-179 a pu être utilisé dans notre laboratoire, pour le criblage de clones recombinants dans deux banques d'ADNc (Miquey et Mercier, en préparation).

9. LOCALISATION DES ANTIGENES CIBLES

9.1. Analyse en cytofluorométrie de flux

Alors que par la technique d'immunofluorescence indirecte, les AcMc TG17-179 (anti-GP28,5) et TG17-113 (anti-P21) induisaient une immunofluorescence membranaire au niveau d'un grand nombre de tachyzoïtes formolés, l'AcMc TG17-43 (anti-P27) ne réagissait nullement avec ces tachyzoïtes (voir 5.1). Nous avons alors quantifié la proportion relative des tachyzoïtes formolés réagissant avec chaque AcMc par une analyse en cytofluorométrie de flux.

Les pics d'intensité de fluorescence révèlent que plus de 60% des tachyzoïtes réagissent avec les AcMc TG17-179 (Fig 20, A) et TG17-113 (Fig 20, B). Par contre, suite à l'incubation avec l'AcMc TG17-43, les tachyzoïtes ne montrent aucune fluorescence significative (Fig 20, C).

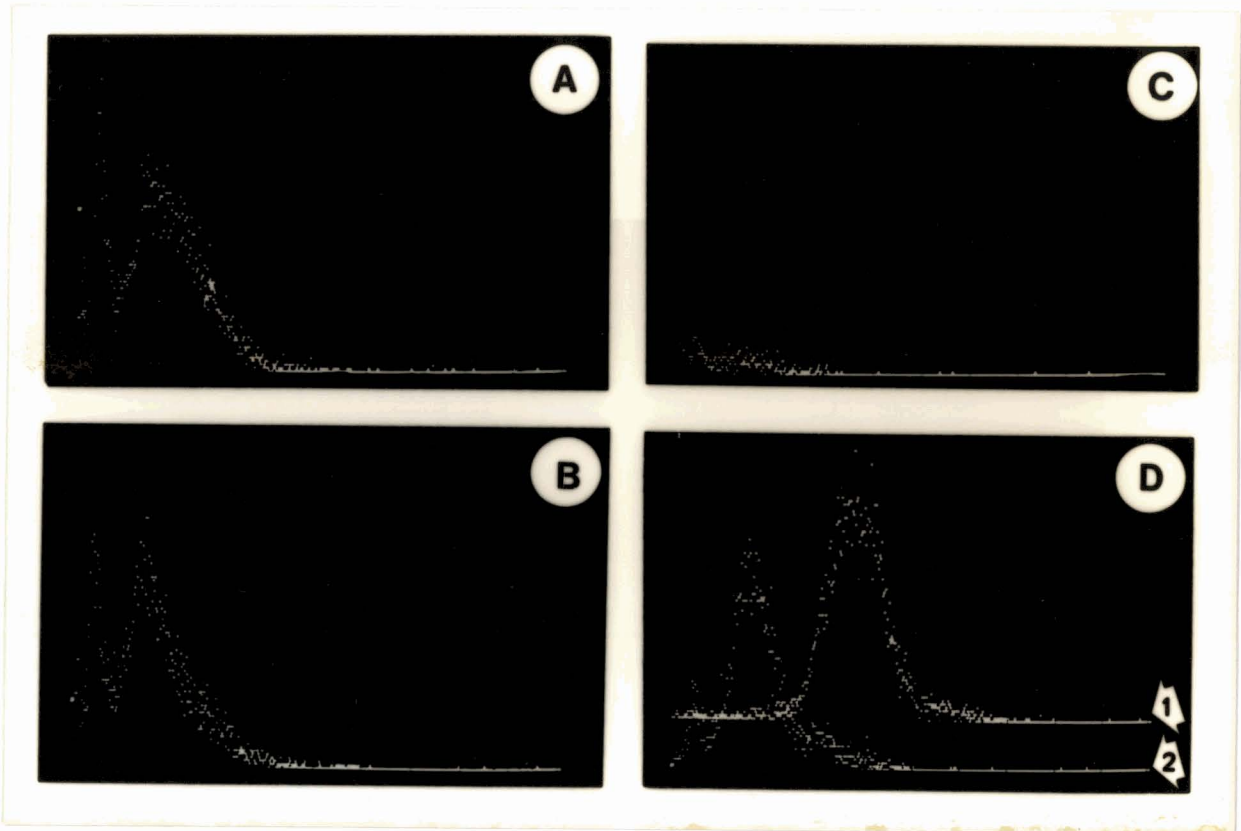


FIGURE 20. Analyse en cytofluorométrie de flux des tachyzoïtes formolés incubés avec les AcMc:

- (A) TG17-179,
- (B) TG17-113,
- (C) TG17-43,
- (D, 1) TG05-54,
- (D, 2) TG17-49.

Intensité relative de fluorescence, en abscisse;
 Nombre relatif de parasites, en ordonnée.

L'incubation des tachyzoïtes avec des AcMc dirigés contre les antigènes de surface du tachyzoïte P22 ou P30 entraîne des pics de fluorescence correspondant à la quasi-totalité des tachyzoïtes, avec cependant une intensité de fluorescence relativement plus importante pour les tachyzoïtes réagissant avec l'AcMc anti-P30, TG05-54 (Fig 20, D,1) en comparaison à la réaction induite par l'AcMc anti-P22, TG17-49 (Fig 20, D,2).

9.2. Localisation ultrastructurale des antigènes excrétés-sécrétés: mise en évidence du mécanisme de sécrétion de *T. gondii*

Des études en immunocytochimie ultrastructurale, par marquage à l'or colloïdal, ont été réalisées sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes et de kystes intracérébraux incubées avec les AcMc anti-AES par le Dr G. Torpier, afin d'obtenir des informations sur la distribution subcellulaire des antigènes cibles.

9.2.1. Immunolocalisation des antigènes dans les tachyzoïtes

Des coupes ultrafines de tachyzoïtes libres ou intracellulaires ont été incubées avec les AcMc TG17-43, TG17-113 et TG17-179, avant d'être révélées par un sérum anti-IgG de souris conjugué à l'or colloïdal. En microscopie électronique, une immunoréactivité spécifique est observée en association avec la matrice des granules denses des tachyzoïtes incubés avec chacun de ces 3 AcMc (Fig 21, a et b), alors que les micronèmes et les rhoptries ne sont pas marqués. De plus, un marquage par l'AcMc TG17-179 peut être observé au niveau de l'appareil de Golgi (Fig 21, a).

En plus de leur localisation dans les granules denses, les antigènes P21 et GP28,5 sont détectés associés au complexe membranaire d'une subpopulation de tachyzoïtes (Fig 22, a). Cette observation est en corrélation avec les 60% de tachyzoïtes fluorescents révélés par les AcMc TG17-179 et TG17-113, en cytofluorométrie de flux. Ces antigènes sont préférentiellement associés à la face interne du complexe membranaire des tachyzoïtes (Fig 22, b). La localisation membranaire de P21 et GP28,5 semble être, de ce fait, différente de celle de l'antigène majeur de surface P30 qui, après révélation par un sérum de lapin

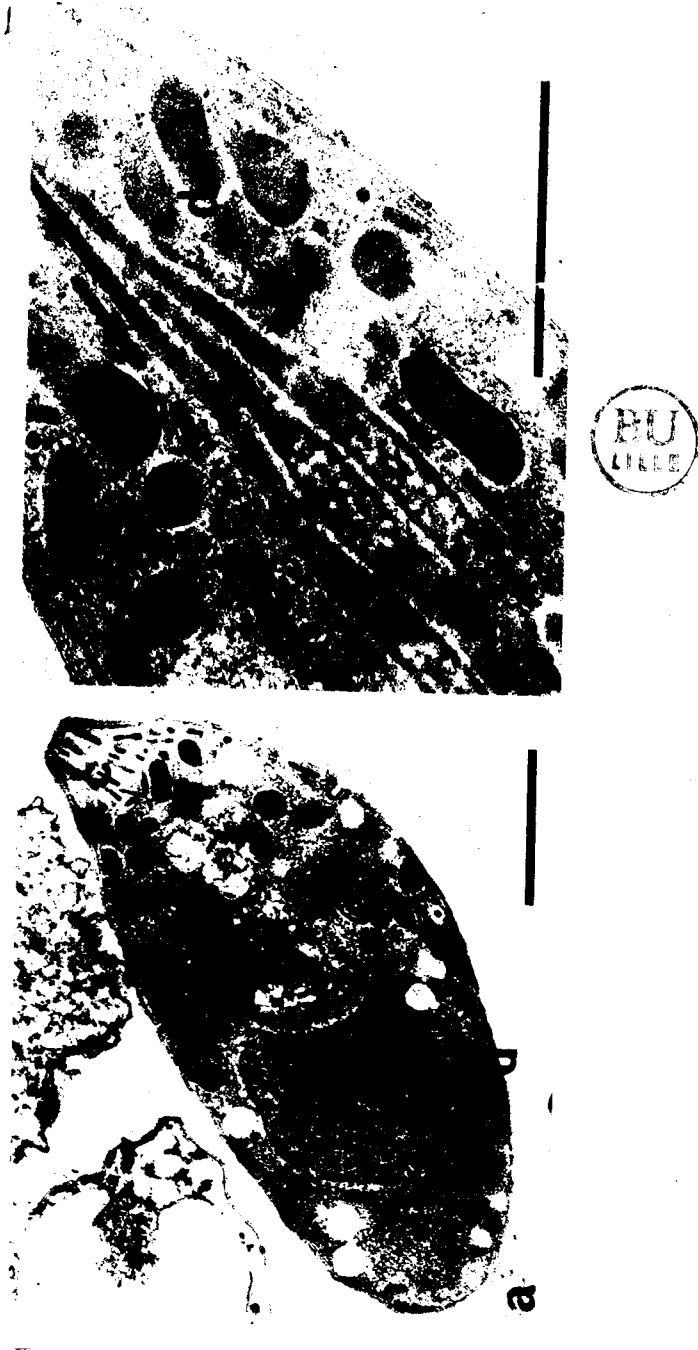


FIGURE 21. Immunomarquage à l'or colloïdal de GP28,5 (a) et de P21 (b) sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes.

Ces antigènes sont spécifiquement localisés dans la matrice des granules denses (d). GP28,5 est de plus détecté dans l'appareil de Golgi (G). En a, le marquage est amplifié par marquage à l'argent (Moeremans et coll., 1984). c, conoïde; R, rhoptries; N, noyau; barres = 1 μ m.

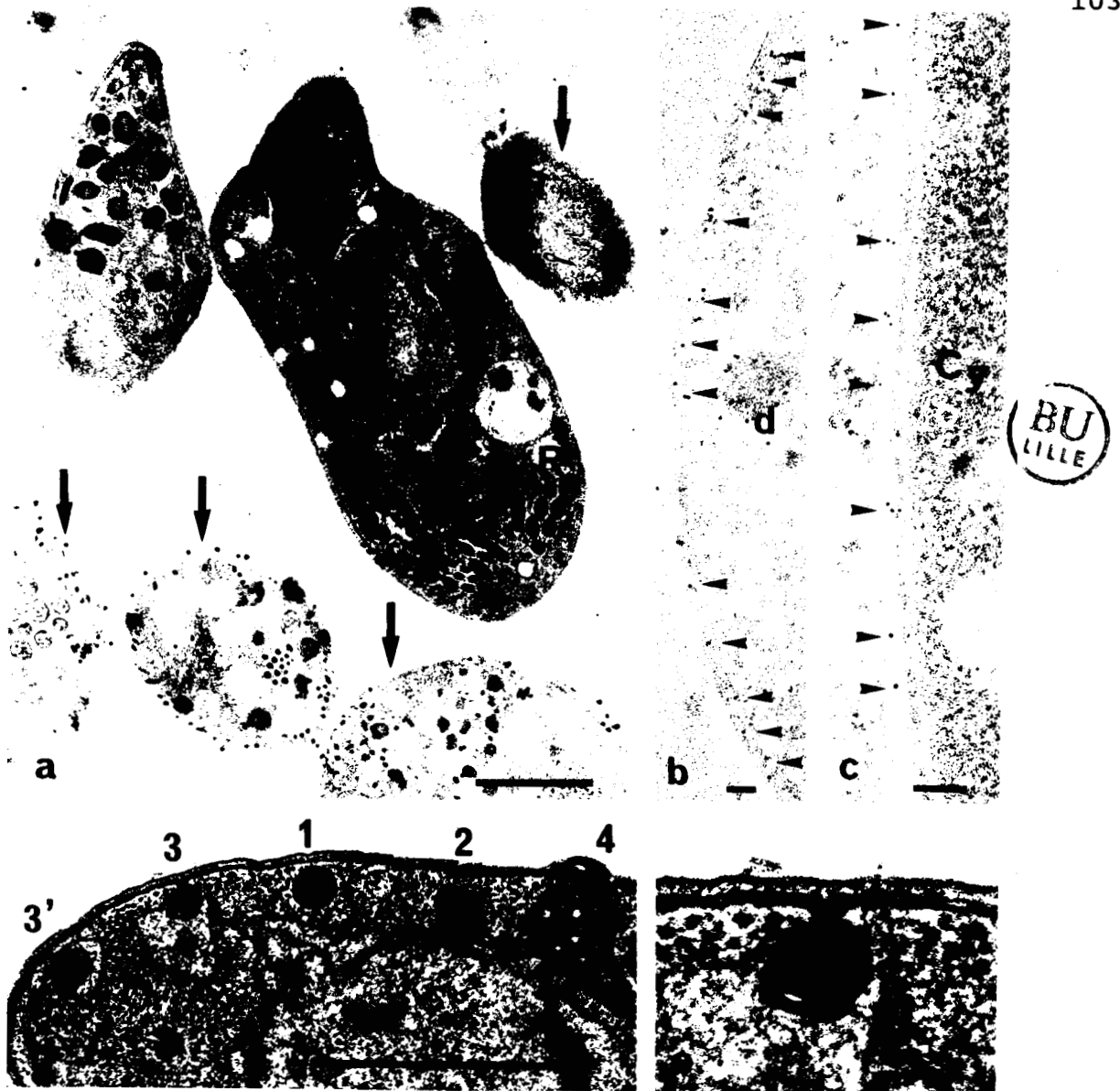


FIGURE 22.

- Immunomarquage à l'or colloïdal des tachyzoïtes démontrant la localisation membranaire des antigènes GP28,5 (a), P21 (b) et P30 (c):

En a, l'immunoréactivité de l'AcMc TG17-179 est associée aux granules denses (d) et au complexe membranaire délimitant certains tachyzoïtes (flèches); barre = 1 μ m.

En b, l'immunomarquage par l'AcMc TG17-113 est observé endessous du plasmalemme (flèches).

En c, un sérum de lapin monospécifique anti-P30 réagit avec la surface externe du plasmalemme (flèches); barre = 0,1 μ m.

- Microscopie électronique de tachyzoïtes inclus en araldite (d et e):

En d, section de parasite montrant un granule dense normale (1), la décondensation du contenu du granule (2), la formation de membranes dans les granules (3 et 3') et l'exocytose d'un granule vers l'intérieur du complexe membranaire (4); barre = 1 μ m.

En e, agrandissement du cliché d (3), montrant la fusion d'un granule dense modifié avec la membrane interne du complexe membranaire; barre = 0,1 μ m.

R, rhoptries; Cy, cytoplasme; d, granule dense.

monospécifique anti-P30, est essentiellement détecté à la surface externe du plasmalemme (Fig 22, c).

Généralement, les granules denses qui sont distribués à travers le cytoplasme se trouvent à proximité des rhoptries et l'observation de granules denses fusionnant avec le complexe membranaire entourant le parasite, n'est guère commun. Cependant, la figure 22,d illustre des granules qui semblent suivre des étapes de différenciation caractéristiques (séquences 1 à 4, Fig 22, d); il s'agit tout d'abord d'une décondensation de leur contenu (en 2) suivie de la formation de membranes (3') et enfin, de leur fusion avec la membrane interne du complexe membranaire délimitant le parasite (Fig 22, d, étape 3, observation détaillée sur la Fig 22, e). Cette observation, bien qu'exceptionnelle, pourrait expliquer la libération de certains composants des granules denses, à l'intérieur de la pellicule, juste en dessous du plasmalemme (Fig 22, d, étapes 3 et 4).

Enfin, les sections de tachyzoïtes intracellulaires incubés avec les 3 AcMc anti-AES révèlent un immunomarquage intense, associé au réseau membranaire présent dans la vacuole parasitophore (Fig 23).

9.2.2. Immunolocalisation des antigènes dans les kystes et dans les bradyzoïtes

Des sections ultrafines de cerveaux de souris infectées et contenant des kystes de la souche 76K ont été incubées avec les trois AcMc anti-AES.

Sur les sections de kystes intracérébraux, l'antigène cible de l'AcMc TG17-43 est révélé dans les granules denses des bradyzoïtes (Fig 24).

L'AcMc TG17-179 réagit avec un antigène localisé d'une part dans les granules denses des bradyzoïtes mais aussi associé à avec la matrice de la paroi du kyste (Fig 25).

L'AcMc TG17-113 reconnaît une molécule localisée d'une part dans les granules denses des bradyzoïtes, mais aussi à l'extérieur des bradyzoïtes, dans la paroi du kyste (Fig 26, a) et plus précisément en association avec les invaginations de la membrane du kyste (Fig 26, b). Cet antigène est même fréquemment observé à l'extérieur du kyste (Fig 26, a, flèches).

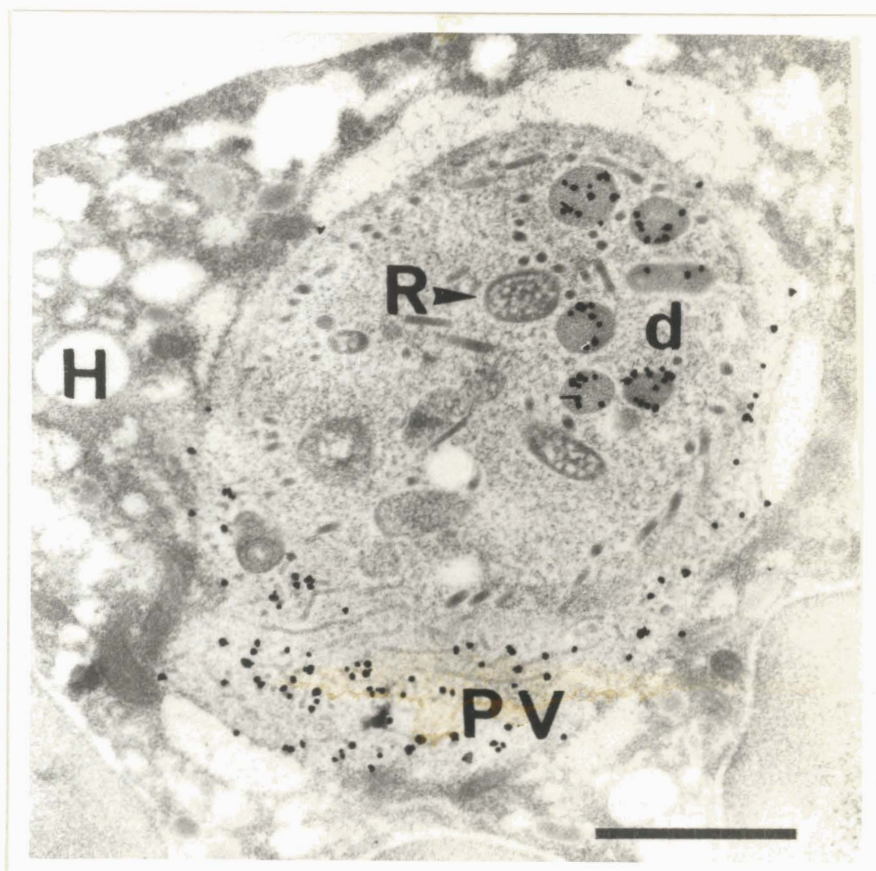


FIGURE 23. Immunolocalisation ultrastructurale de GP28,5 sur une section de tachyzoïte intracellulaire.

Les particules d'or colloïdal sont observées dans les granules denses (d) et associées au réseau membranaire présent dans la vacuole parasitophore (PV). H, cellule-hôte; R, rhoptries; barre = 1 μm .

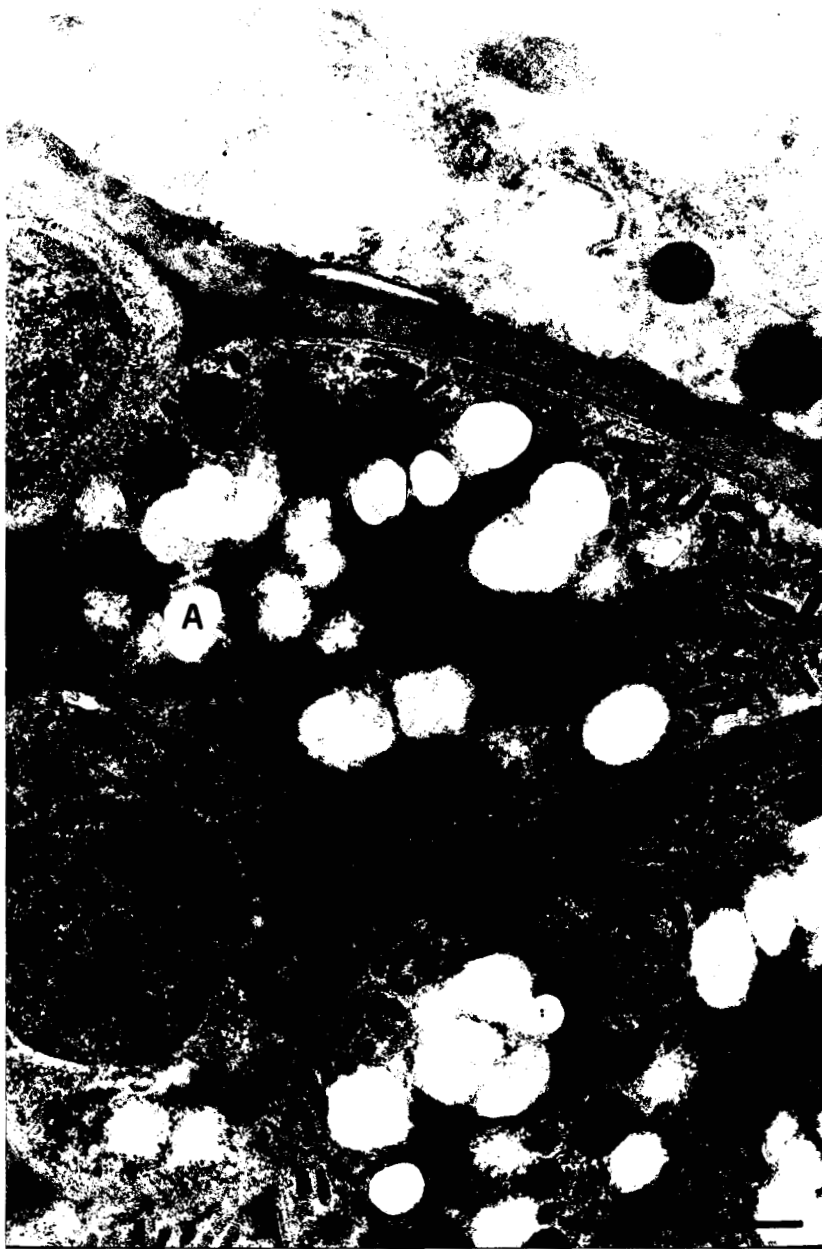


FIGURE 24. Immunomarquage de sections de kystes intracérébraux par l'AcMc TG17-43.

L'immunomarquage à l'or colloïdal des coupes ultrafines incubées par l'AcMc TG17-43 est observé dans les granules denses (D) des bradyzoïtes. A, grain d'amylopectine; CW, paroi du kyste.

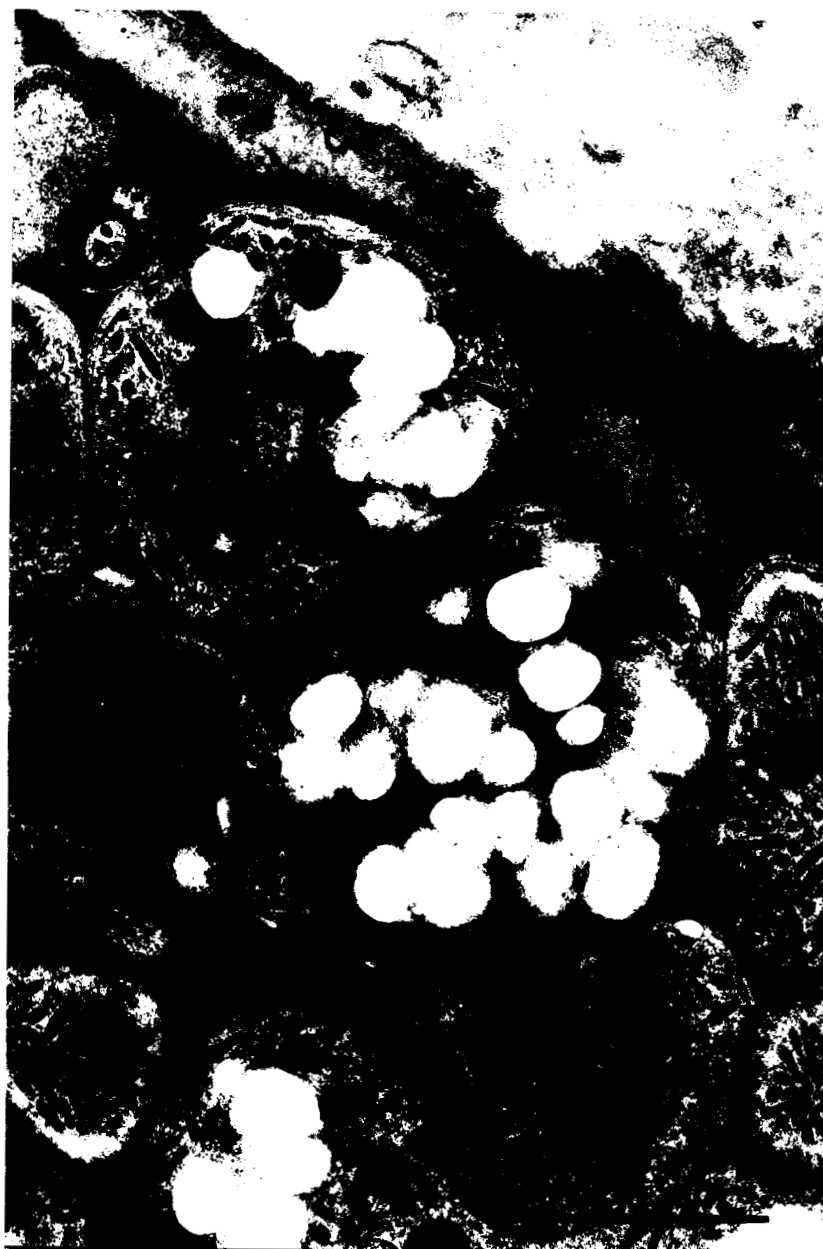


FIGURE 25. Immunomarquage de sections de kystes intracérébraux par l'AcMc TG17-179.

Suite à l'incubation avec l'AcMc TG17-179, l'immunomarquage à l'or colloïdal est observé dans les granules denses (D) des bradyzoïtes et dans la paroi du kyste (CW).

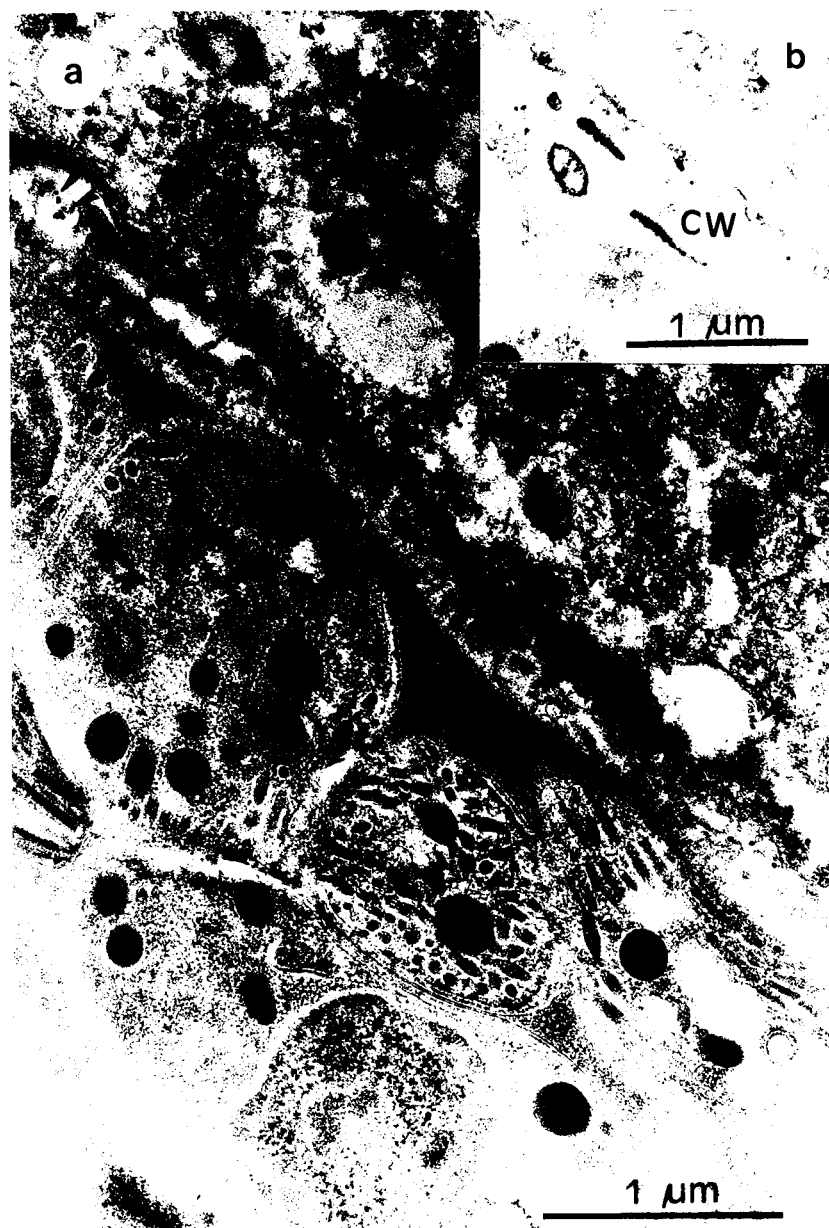


FIGURE 26. Immunomarquage de sections de kystes intracérébraux par l'AcMc TG17-113.

En a, l'immunoréactivité de l'AcMc TG17-113 est observée dans les granules denses (D) des bradyzoïtes, dans la paroi du kyste (CW) et fréquemment à l'extérieur du kyste (flèches).

En b, cliché à fort grossissement démontrant la localisation de l'antigène cible de l'AcMc TG17-113 en association avec les invaginations de la membrane du kyste.

La spécificité antigénique des AcMc décrits dans ce travail ainsi que la localisation ultrastructurale des antigènes cibles des AcMc anti-AES sont résumées dans un tableau récapitulatif (Table 5).

10. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX

L'étude de l'activité biologique des AcMc a été abordée, d'une part *in vitro*, par un test de lyse complément-dépendante et d'autre part *in vivo*, chez le rat "Nude".

10.1. Activité biologique *in vitro*

Le pouvoir lytique des AcMc anti-AES (P21, P27, GP28,5) et des AcMc dirigés contre les antigènes de surface du tachyzoïte (P30 et P22), vis-à-vis des tachyzoïtes en présence de complément, est évalué selon la technique de "Dye test" modifiée par Feldman et Lamb (1966).

Comme il est présenté sur le tableau 4, les trois AcMc anti-AES, TG17-113, TG17-179 et TG17-43 se sont révélés négatifs dans ce test, alors que les AcMc TG17-49 et TG05-54 présentent des pouvoirs lytiques élevés.

En effet, seuls les antigènes présents à la surface du parasite, comme P30 et P22, semblent être visés par ce procédé de lyse complément-dépendante. D'autres molécules exclusivement cytoplasmiques (P27) ou ayant de plus une localisation membranaire non superficielle (P21 et GP28,5) ne semblent pas directement accessibles à l'action toxoplasmicide des anticorps.

10.2. Activité biologique *in vivo* chez le rat "Nude"

Ayant auparavant démontré, chez les rats "Nude" infectés par *T. gondii*, le pouvoir protecteur des anticorps présents dans les sérums de rats Fischer immunisés par les AES, nous avons utilisé ce même modèle expérimental afin de vérifier le rôle protecteur des différents AcMc dont certains sont dirigés contre des AES.

TABLE 4. Pouvoir lytique des AcMc anti-*T.gondii*

Ascites	Titres en "Dye-test"
TG17-43	< 1:8
TG17-113	< 1:8
TG17-179	< 1:8
TG17-49	1:25600
TG05-54	1:25600

A la suite de plusieurs expériences, nous avons constaté que les rats "Nude" qui avaient reçu par transfert passif les AcMc anti-AES (TG17-43, TG17-113 ou TG17-179), un jour avant d'être infectés, présentaient globalement les mêmes durées de survie que les rats contrôles ayant reçu un AcMc irrelevant.

Seuls, les transferts passifs des AcMc anti-P22 (TG17-49) et anti-P30 (TG05-54) induisent une augmentation significative de la survie des rats "Nude" infectés par 10^5 tachyzoïtes de la souche virulente RH. Comme le montre la figure 27, le transfert passif de l'ascite anti-P22 prolonge de 4 à 5 jours la durée de vie des rats infectés et l'ascite anti-P30 améliore cette survie de plus de 10 jours, en comparaison avec les rats contrôles.

11. APPROCHE DIAGNOSTIQUE: RECHERCHE D'ANTIGENES CIRCULANTS CHEZ LA SOURIS

Comme les antigènes sécrétés semblent représenter la majorité des antigènes circulants détectables très tôt au cours de l'infection par *T. gondii* (Hughes et Van Knapen, 1982), il était intéressant de rechercher les antigènes circulants qui seraient reconnus par les sondes AcMc anti-AES dont nous disposions.

Chez la souris OF1, l'infection par la souche virulente RH de *T. gondii* conduisant à une parasitémie intense et à la mort des animaux en 4 à 5 jours, nous avons choisi ce modèle car les quantités d'antigènes circulants y sont relativement élevées.

11.1. Identification d'un antigène circulant

Un grand nombre de souris OF1 ont été infestées par la souche RH du toxoplasme. Ces souris ont ensuite été saignées, par séries, à un jour d'intervalle (J0, J1, J2, J3 et J4). Les saignées de chaque jour ont été rassemblées et les sérums collectés. Ces pools de sérums susceptibles de renfermer des antigènes circulants ont subi une migration en SDS-PAGE, puis les protéines ont été transférées électrophorétiquement sur des feuilles de nitrocellulose. Chaque pool de sérums (correspondant à un jour donné, après l'infestation) a ensuite été testé vis-à-vis des différents AcMc.

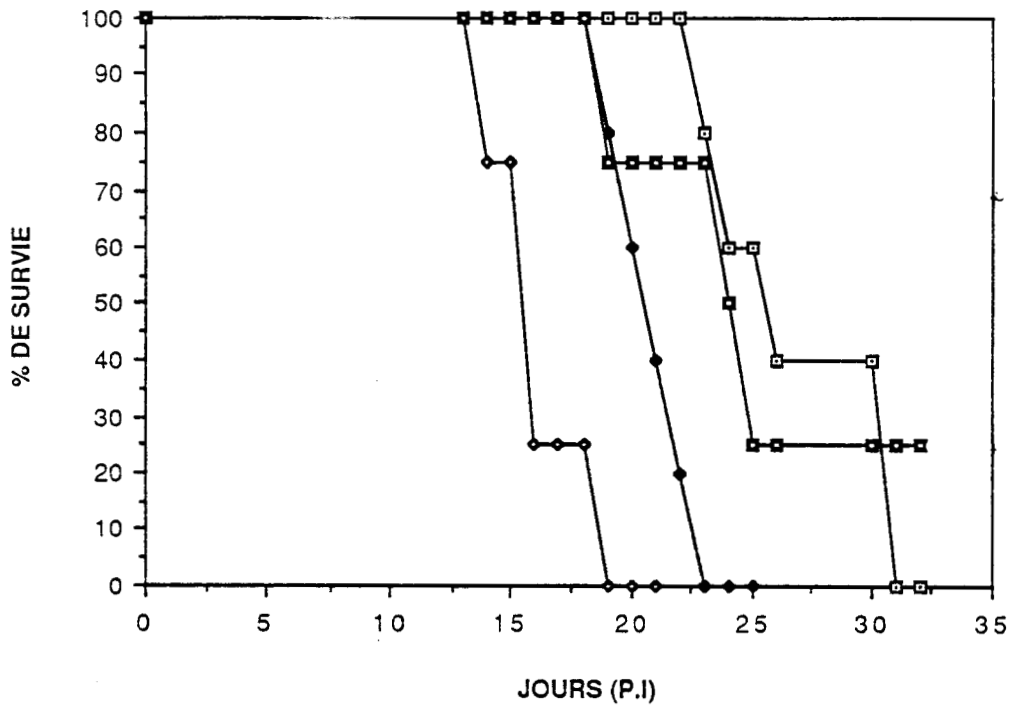


FIGURE 27. Pouvoir protecteur des AcMc chez le rat "Nude".

Survie des rats "Nude" infectés par 10^5 tachyzoïtes, 24 h après le transfert passif de:

- l'AcMc TG05-54 (□),
- l'AcMc TG17-49 (◆),
- Sérum de rats immunisés par les AES (○),
- Sérum de rats ayant reçu de l'adjuvant seul (●).

Aucune immunoréactivité des AcMc anti-AES, anti-P30 et anti-P22 n'a été mise en évidence pour les profils électrophorétiques des sérums correspondant aux jours J0, J1 et J2 après l'infestation. Par contre, les sérums de souris obtenus au 3ème et surtout au 4ème jour de l'infection présentaient une quantité d'antigène P27 circulant suffisamment importante pour être détectée après immunoélectrotransfert par l'AcMc TG17-43 (Fig 28, piste 1).

11.2. Détection de l'antigène circulant P27, par une méthode radioimmunologique

Après avoir démontré l'existence d'un AES circulant, P27, chez la souris, nous avons mis au point une technique radioimmunologique en phase solide (SRIA), dans le but de quantifier cet antigène circulant dans les sérums d'infection aiguë par *T. gondii*.

11.2.1. Utilisation d'un peptide synthétique

Après analyse de la séquence nucléotidique de l'antigène recombinant P24 (Cesbron-Delauw et coll., 1989), des peptides ont été synthétisés (Dr H. Gras-Masse et Pr A. Tartar). Les séquences sélectionnées présentent des caractéristiques physico-chimiques pouvant correspondre à celle des épitopes majeurs (Hopp et Woods, 1981). Un peptide de 24 acides aminés qui correspond à la séquence 170-193 de P24 nous a plus particulièrement intéressé car il est reconnu par l'AcMc TG17-43.

La séquence en acides aminés du peptide 170-193 est la suivante:
VEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNK.

11.2.2. Mesure de la constante d'affinité

La reconnaissance par l'AcMc TG17-43 du peptide 170-193 indique que ce dernier renferme tout ou au moins une partie essentielle de l'épitope de P27 pour l'AcMc.

Comme l'affinité d'un anticorps pour sa cible est un facteur important dans la sensibilité des essais immunologiques et des tests diagnostiques, nous avons entrepris la mesure de la constante d'affinité de l'AcMc TG17-43 pour le peptide 170-193. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes, la technique consiste en une compétition entre le peptide marqué par ^{125}I (peptide traceur à une concentration fixe, T_1)

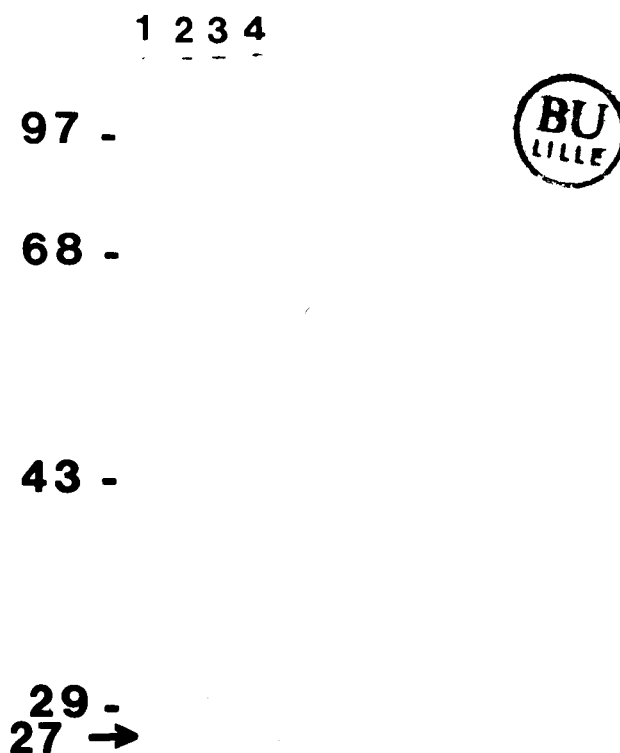


FIGURE 28. Identification d'un antigène circulant dans les sérums de souris infectées par la souche RH.

Immunoélectrotransfert d'un pool de sérums collectés 4 jours après l'infection, testé vis-à-vis des AcMc:

- (1) TG17-43
- (2) TG17-179
- (3) TG17-113
- (4) TG05-54.

et des concentrations variables du peptide froid (inhibiteur, I) vis-à-vis de l'AcMc. Après la détermination de la molarité de l'inhibiteur (I_t) entraînant une inhibition de 50% de la fixation du traceur, la constante d'affinité K peut être calculée, selon Müller (1980):

$$K = 8 / (3 \times ([I_t] - [T_t])).$$

En pratique, nous avons tout d'abord choisi une concentration du traceur $[T_t]$ permettant d'obtenir un signal significatif (en absence d'inhibiteur), par précipitation avec l'AcMc en excès: $[T_t] = 1,006 \times 10^{-7}$ mole/l.

Puis, la concentration d'AcMc précipitant 50% du traceur $[T_t]$ a été déterminée; elle est de l'ordre de 0,025 mg/ml.

Enfin, la figure 29 montre les pourcentages d'inhibition obtenue en présence de $1,006 \times 10^{-7}$ mole/l de traceur radioactif et de 0,025 mg/ml d'AcMc, en fonction de différentes molarités d'inhibiteur; une inhibition de 50% est obtenue avec $2,24 \times 10^{-7}$ mole/l d'inhibiteur, $[I_t]$.

La constante d'affinité est ensuite calculée:

$$K = 8 / (3 \times (2,24 \times 10^{-7} - 1,006 \times 10^{-7})) \text{ M}^{-1}$$

$$K = 2,16 \times 10^7 \text{ M}^{-1}.$$

11.2.3. Test de compétition SRIA

Un test SRIA a été mis au point, basé sur une compétition entre la fixation du peptide 170-193 marqué par ^{125}I et de l'antigène P27 circulant dans les sérums d'infection aiguë de souris, vis-à-vis de l'AcMc TG17-43 qui est adsorbé sur le support.

Dans un premier temps et pour vérifier la sensibilité du test, le peptide radiomarqué (5 ng) a été mis en compétition avec le peptide non marqué à différentes concentrations ($2,5 \times 10^{-5}$ à 5×10^{-9} mole/l). Comme il est montré sur la figure 30, l'apport du peptide froid entraîne une inhibition dose-dépendante de la fixation du peptide marqué sur l'AcMc. Une inhibition de 100% est obtenue avec 5×10^{-6} mole/l du peptide non marqué.

La figure 31 illustre les taux d'inhibition obtenus par incubation des différentes dilutions des pools de sérums de souris infectées par la souche RH et saignées à des jours différents (J0, J1, J2, J3 et J4 après l'infestation) avec 5 ng de peptide radiomarqué. Une

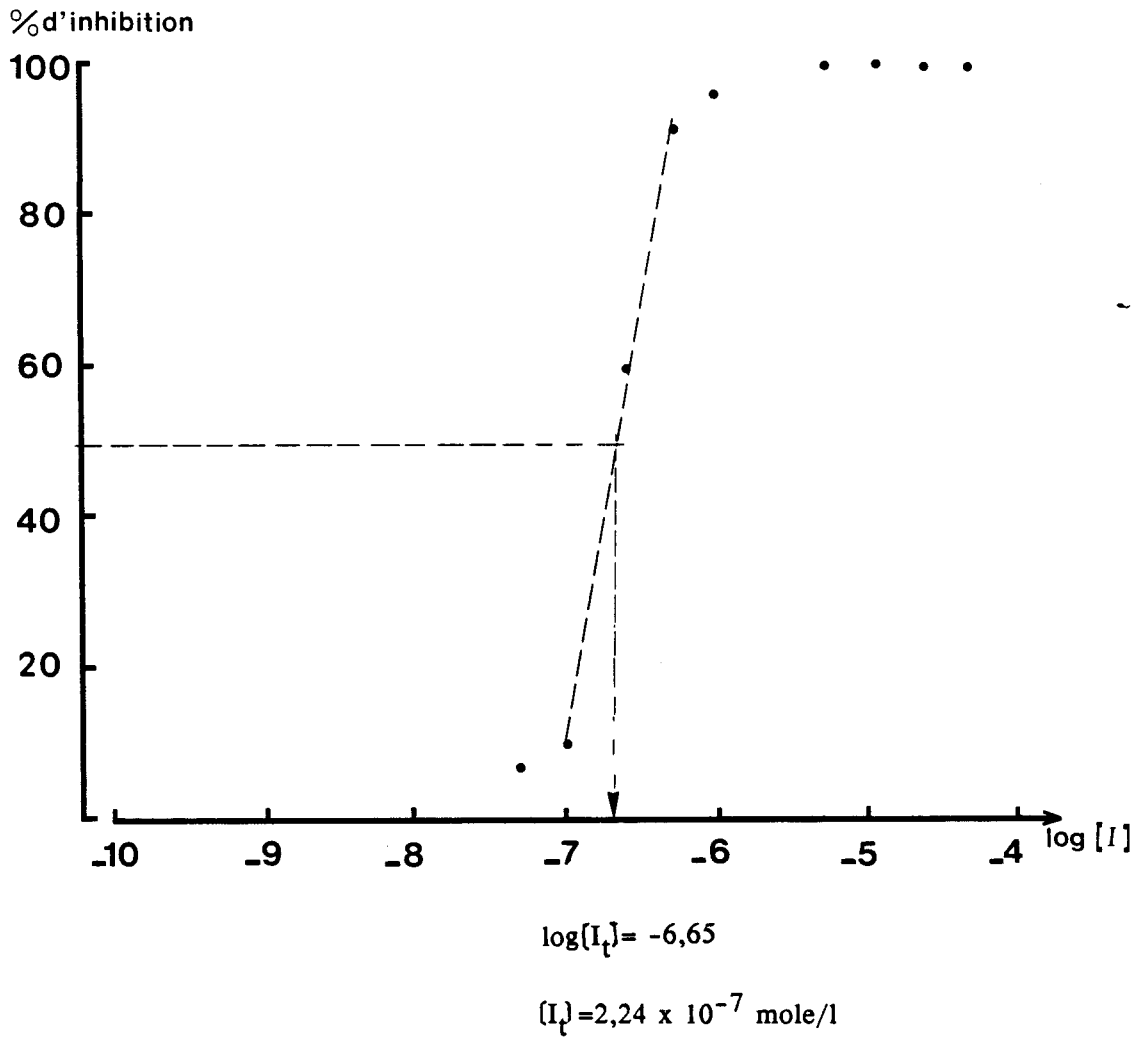


FIGURE 29. Constante d'affinité de l'AcMc TG17-43 pour le peptide 170-193. Détermination de la molarité de l'inhibiteur (I_t) entraînant une inhibition de 50% de la fixation du traceur sur l'AcMc.[I], concentration en inhibiteur.

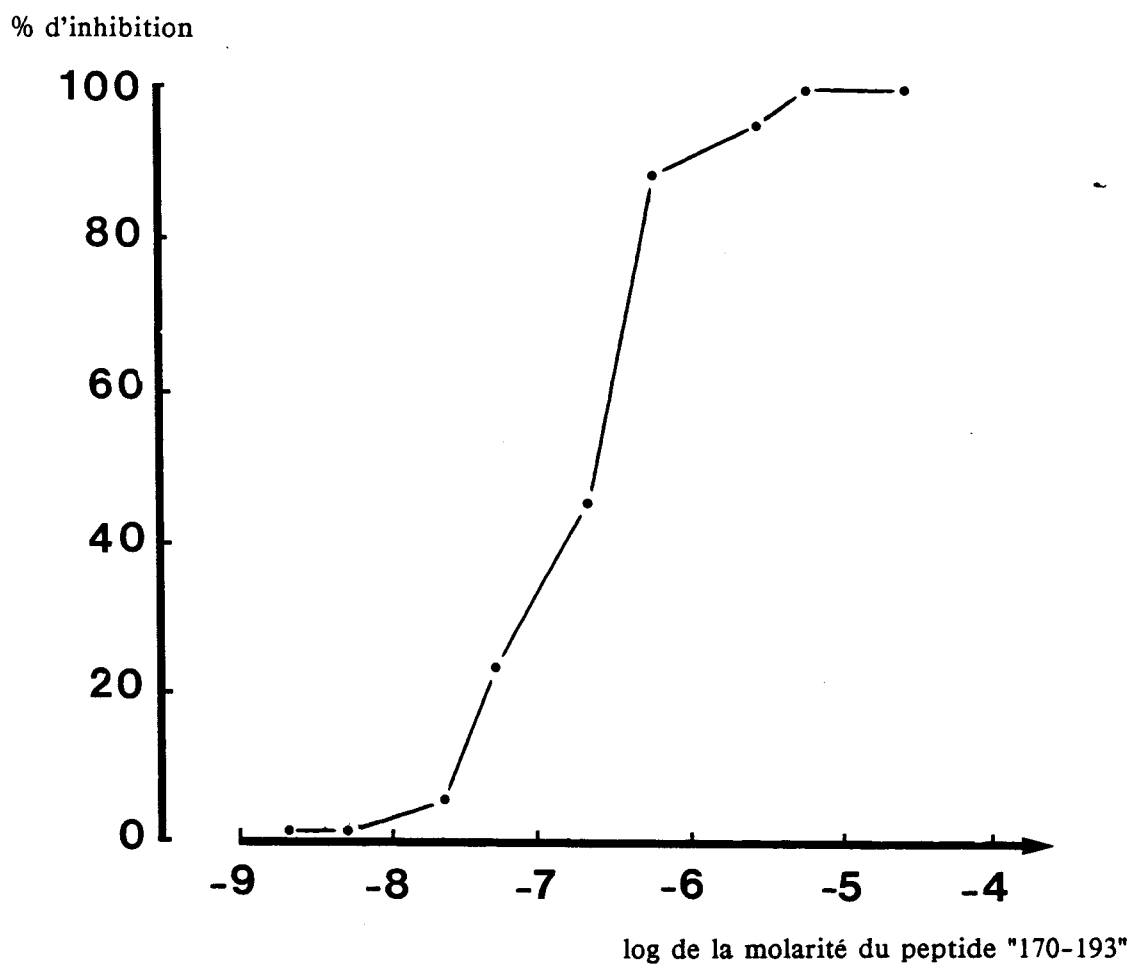


FIGURE 30. Standardisation du test de compétition SRIA pour la détection de l'antigène circulant P27: inhibition dose-dépendante de la fixation du peptide radioactif sur l'AcMc TG17-43, par le peptide froid.

inhibition de 10% est tout d'abord observée avec les sérums du deuxième jour suivant l'infestation (J2) dilués au 1/2 ou au 1/4. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les sérums prélevés les 3ème et 4ème jours, avec des inhibitions significatives de l'ordre de 50% (pool de sérums dilué au 1/2) à 25% (dilution au 1/16) pour les sérums à J4.

Ces résultats montrent la cinétique d'apparition de la protéine P27 circulante, chez la souris, au cours de l'infection par la souche virulente RH de *T. gondii*.

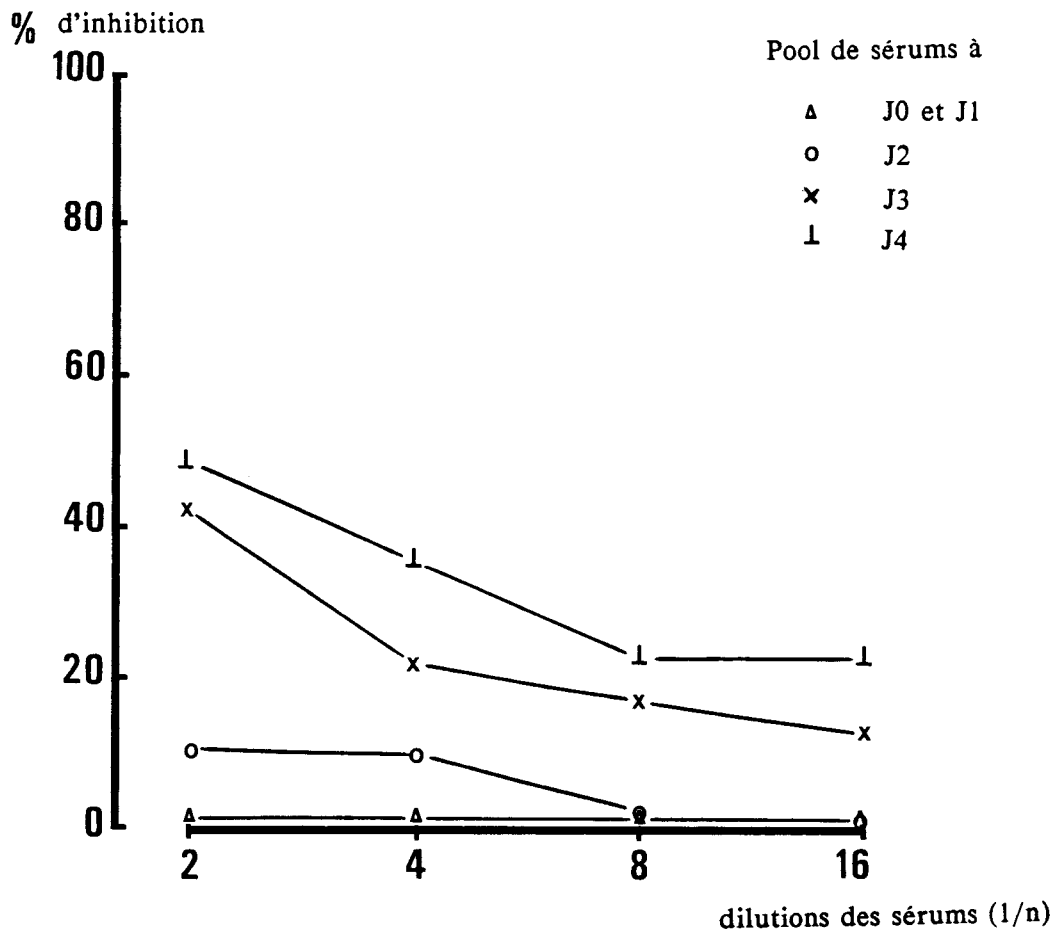


FIGURE 31. Test de compétition SRIA pour la détection de l'antigène circulant P27 démontrant l'apparition de P27 circulant dans les sérums de souris, à différents jours après l'infection par la souche RH de *T.gondii*.

TABLE 5. Tableau récapitulatif des AcMc et des antigènes cibles.

AcMc	Isotype	IFI	Antigène cible	Type d'antigènes de tachyzoïtes reconnus	Localisation ultrastructurale	
					Tachyzoïte	Bradyzoïte
TG17-113	IgG1	+	P21	AES, extrait membranaire	G.D., C.M. V.P.	G.D. paroi du kyste
TG17-179	IgG1	+	GP28,5	AES, extrait membranaire	G.D., C.M. A.G., V.P.	G.D. paroi du kyste
TG17-43	IgG1	-	P27 (P24)	AES, extrait soluble, antigène circulant	G.D. V.P.	G.D.
TG17-49	IgG3	++	P22	Antigène de surface, extrait membranaire		
TG17-190	IgG3	++	P22	Idem		
TG17-155	IgG1	++	P30	Antigène de surface, extrait membranaire		
TG17-97	?	++	P30	Idem		
TG05-54	IgG2b	+++	P30	Antigène de surface, extrait membranaire		
TG22-DG5	IgG2a	-	GP97	AES, extrait soluble		

G.D., granules denses
 C.M., complexe membranaire
 A.G., appareil de Golgi
 V.P., vacuole parasitophore

DISCUSSION

Cette étude des antigènes d'intérêt dans l'immunité au cours de la toxoplasmose a été fondée sur une nouvelle approche à partir d'hypothèses qui postulent d'une part le rôle important des molécules d'excrétion-sécrétion des parasites dans l'immunité anti-parasitaire et d'autre part, selon le concept de l'immunité de prémunition, le rôle important que pourraient jouer les antigènes communs aux différents stades infectieux du parasite (Capron et Dessaint, 1988).

1. CARACTERISATION ET ROLE PROTECTEUR DES ANTIGENES D'EXCRETION-SECRETION DE *T. GONDII*

Contrairement aux antigènes somatiques de *Toxoplasma gondii*, peu d'études ont été consacrées aux antigènes sécrétés ou excrétés par ce parasite. Mis à part le PEF ("Penetration enhancing Factor") sécrété par les rhoptries et qui intervient durant l'invasion de la cellule-hôte (Lycke et coll., 1975), les antigènes décrits comme étant des produits d'excrétion-sécrétion de *T. gondii* étaient généralement constitués par les exo-antigènes présents dans les milieux de cultures cellulaires infectées par des tachyzoïtes (Desgeorges et coll., 1980; Chumpitazi et coll., 1987). L'analyse de la composition protéique de ces surnageants de cultures a montré que certaines molécules présentes dans ces préparations étaient des composants de la cellule-hôte (Roques et coll., 1986). Pour pallier cet inconvénient, nous avons tout d'abord mis au point un procédé d'obtention d'antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) des tachyzoïtes en milieu acellulaire, dans de bonnes conditions de survie parasitaire. Ainsi, la possibilité de contamination des préparations d'AES par les antigènes d'origine cellulaire a été écartée. Après standardisation de notre technique de préparations des AES, nous avons pu estimer qu'environ 15 µg de protéines sont excrétées-sécrétées par 10^8 tachyzoïtes, et que des quantités minimales d'antigènes somatiques sont relargués par la lyse des parasites.

Par la suite, nous avons identifié les AES qui sont immunogènes au cours des toxoplasmoses humaine et expérimentales. Près de 20 antigènes ont été identifiés par immunoprécipitation d'un sérum humain prélevé en phase chronique de l'infection avec les AES marqués par la ^{35}S -méthionine parmi lesquels certains antigènes, comme celui de 108 kDa qui n'est pas détecté dans l'extrait total du toxoplasme semblent être activement excrétés-sécrétés par le parasite. Parallèlement, Decoster et coll. (1988) ont démontré qu'au cours de la toxoplasmose humaine, des AES de 108 et 28,5 kDa sont reconnus par tous les sérums prélevés en phase chronique de l'infection (antigènes marqueurs d'immunité), alors qu'un autre AES de 97 kDa, détecté très précocement par les anticorps IgM au cours de l'infection aiguë, peut être considéré comme un marqueur de séroconversion. D'ores et déjà, ces observations suggèrent l'intérêt diagnostique des AES comme marqueurs des différentes étapes de l'infection humaine par *T. gondii*.

L'immunisation de rats, souris et lapins avec les AES a confirmé la grande immunogénicité de ces antigènes. Les antigènes de 108, 97, 57, 42, 39 et 28,5 kDa sont reconnus par les sérums de tous les animaux infectés ou immunisés, de même que par des sérums humains d'infection chronique.

Ces résultats nous ont incité à étudier le pouvoir protecteur des anticorps induits par les AES, dans le modèle expérimental du rat athymique ("Nude"). En effet, à cause de son caractère bénin, même inapparent chez les animaux immunocompétents et de ses conséquences mortelles chez les rats "Nude" immunodéprimés, l'infection du rat par *T. gondii* est un modèle comparable à la toxoplasmose humaine. De plus, il a été établi précédemment dans notre laboratoire (Santoro et coll., 1987) que le transfert passif de 5×10^6 cellules lymphocytaires de rats Fischer euthymiques (immunocompétents) non infectés chez les rats "Nude" génétiquement athymiques (immunodéprimés) induit une protection totale contre une infection par 10^5 tachyzoïtes de la souche très virulente RH. Ces résultats démontraient la participation des cellules T dans la résistance du rat à l'infection par *T. gondii*.

Dans le présent travail, nous démontrons de plus la participation de la réponse humorale dans l'immunité protectrice, par des expériences de transfert passif de sérums immuns chez les rats "Nude".

Le transfert passif de sérums de rats Fischer immunisés par les AES aux rats "Nude" leur confère en effet une protection significative contre l'infection par des doses léthales de tachyzoïtes de la souche RH. De plus, la résistance des rats "Nude" ayant reçu un transfert de sérum de rats immunisés par les AES est supérieure à celle des rats injectés avec des sérums d'infections par des parasites vivants et surtout par des tachyzoïtes irradiés. Les anticorps dirigés contre les AES semblent donc jouer un rôle plus efficace dans l'immunité protectrice que les anticorps présents dans les sérums d'infection en partie dirigés contre les antigènes somatiques.

Quels pourraient être le mode d'action des anticorps des sérums de rats immunisés par les AES dans la protection chez des rats "Nude"? Les anticorps spécifiques peuvent détruire rapidement les tachyzoïtes extracellulaires, en présence de complément, ce qui est à la base du "dye test" (Sabin et Feldman, 1948) ou encore opsoniser les parasites qui sont alors détruits par les macrophages non immuns (Hauser et Remington, 1981). Il est intéressant de noter dans cet esprit que les sérums d'animaux immunisés par les AES présentent un titre élevé en "dye test", ce qui correspond à une forte cytotoxicité pour les toxoplasmes. D'autre part, il a été démontré dans notre laboratoire que l'infection par *T. gondii* ou que l'immunisation avec les AES induit chez les rats Fischer des anticorps IgE spécifiques qui protègent partiellement les rats "Nude" contre l'infection. Les plaquettes immunes portant ces IgE à leur surface sont cytotoxiques *in vitro* pour les parasites et impliquées *in vivo* dans la résistance du rat "Nude" contre l'infection (Ridel et coll., 1988).

Cependant, ces différents modes d'actions des anticorps ne semblent possibles que si les antigènes cibles se trouvent naturellement (antigènes membranaires) ou transitoirement exprimés à la surface des parasites. Ces conditions semblent être vérifiées par les tests d'immunofluorescence indirecte qui nous ont permis d'observer que les sérums d'animaux immunisés par les AES induisent une fluorescence membranaire des tachyzoïtes.

Parallèlement, Duquesne et coll. (1990) ont démontré que des taux de protection élevés peuvent être obtenus chez les rats "Nude" par le transfert passif de seulement 10^3 lymphocytes T spécifiques provenant de rats immunisés par les AES. Les rats "Nude" peuvent même ainsi acquérir une immunité protectrice durable contre la réinfection, suite au transfert

de 5×10^4 lymphocytes T spécifiques, ce qui nécessite le transfert de 100 fois plus de cellules, dans le cas de lymphocytes T non spécifiques.

Si l'ensemble de ces résultats met en évidence la grande immunogénicité des AES et leur rôle protecteur contre la toxoplasmose, ils démontrent clairement que plusieurs composantes, humorale et cellulaires, participent à cette protection induite par les AES.

2. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES DES STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE PRESENTANT DES EPITOPES COMMUNS

Nous avons entrepris cette étude en considérant que l'immunité protectrice durable contre la réinfection observée dans la toxoplasmose doit être maintenue grâce à des stimulations répétées du système immunitaire par des antigènes du stade persistant, le bradyzoïte, qui seraient présents également au stade tachyzoïte, forme invasive responsable de l'induction de l'immunité et cible des mécanismes effecteurs au cours de la réinfection.

Par immunoprécipitation des antigènes des tachyzoïtes de la souche RH marqués par la ^{35}S -méthionine avec des sérums d'animaux immunisés par un extrait total de bradyzoïtes de la souche 76K, nous avons mis en évidence que deux AES de 28,5 kDa (immunogène chez le rat) et 39 kDa (immunogène chez la souris) présentent des épitopes communs, non seulement aux deux stades infectieux, mais également à deux souches différentes du parasite. De plus, l'immunoprécipitation des antigènes membranaires des tachyzoïtes ou d'un extrait de bradyzoïtes marqués par ^{125}I par différents sérums immuns a démontré que l'antigène membranaire de 43 kDa des tachyzoïtes RH est aussi présent avec le même poids moléculaire chez les bradyzoïtes de la souche 76K.

Bien que certains auteurs aient préféré rechercher les antigènes spécifiques de stade (Kasper et coll., 1984; Kasper, 1989; Omata et coll., 1989) ou de souche (Ware et Kasper, 1987; Dardé et coll., 1988), des antigènes communs aux différents stades et souches de *T. gondii* ont été décrits dans la littérature. Ainsi, l'antigène de surface des tachyzoïtes de 43 kDa, est également présent chez les sporozoïtes de la souche C (Kasper et coll., 1984). Des antigènes de rhoptries de 55 et 60 kDa sont communs aux trois stades infectieux, tachyzoïte,

bradyzoïte et sporozoïte (Sadak et coll., 1988). Par une étude en immunocytochimie ultrastructurale, des sérums de souris immunisées par la protéine recombinante P24 ont permis de localiser chez les tachyzoïtes, l'antigène natif correspondant, et chez les bradyzoïtes, un antigène présentant des épitopes communs (Cesbron-Delauw et coll., 1989).

Malgré les communautés antigéniques qui existent entre les tachyzoïtes et les bradyzoïtes, les parasites de ces deux stades présentent des différences de structure. L'une des différences les plus caractéristiques réside dans le taux d'antigènes glycosylés qui est beaucoup plus élevé chez le parasite enkysté. En effet, les bradyzoïtes présentent un grand nombre de grains d'amylopectine sensibles à la coloration par l'acide periodique-Schiff (Dubey et Frenkel, 1976) et différentes lectines se fixent à la paroi des kystes (Sethi et coll., 1977). Par contre, la membrane des tachyzoïtes a longtemps été considérée comme dépourvue de sites de fixation des lectines, à la suite d'études utilisant des lectines marquées à la fluorescéine (Sethi et coll., 1977). Cependant l'utilisation de lectines radiomarquées a permis de détecter une faible fixation de la Con A à la surface des tachyzoïtes (Mauras et coll., 1980). Après séparation en SDS-PAGE de lysats de tachyzoïtes, il a été démontré que des antigènes de 29, 53, 123 (Johnson et coll., 1981) et 6 kDa (Sharma et coll., 1983) se lient à la Con A.

Une meilleure connaissance de la nature biochimique des antigènes du toxoplasme et notamment de leur éventuelle glycosylation, devrait conduire à une meilleure compréhension de la réponse immune au cours de la toxoplasmose, en particulier dans le but du développement d'un vaccin. Nous avons donc étudié la capacité de fixation à la Con A, des AES marqués par la ^{35}S -Met et des antigènes membranaires des tachyzoïtes marqués par ^{125}I , par immunoprécipitation des antigènes élués à partir d'une colonne de Con A par des sérums immuns.

Ainsi, les AES de 28,5, 37 et 67 kDa et l'antigène membranaire de 43 kDa se sont révélés être glycosylés. La glycosylation de l'antigène de 43 kDa est en corrélation avec les études de Sharma et coll. (1983) qui ont démontré la coloration d'un antigène de 43 kDa par l'acide periodique-Schiff.

GP43 est de plus l'antigène membranaire le plus intensément reconnu par les sérums humains prélevés au cours de la phase chronique de la toxoplasmose qui ne présentent qu'un faible taux d'anticorps résiduels. GP43 ainsi que les AES P39 et GP28,5 présentant des épitopes communs aux stades tachyzoïte et bradyzoïte pourraient jouer un rôle important d'une part dans l'induction de la réponse immune au premier stade de l'infection, mais aussi par la suite dans le maintien de l'immunité protectrice et seraient ainsi de bons candidats à une éventuelle immunoprophylaxie.

3. UTILISATION DE SONDES ANTICORPS MONOCLONALES DANS LA MISE EN EVIDENCE DES MECANISMES DE SECRETION

Ayant clairement démontré le rôle des AES dans l'induction d'une réponse humorale protectrice au cours de la toxoplasmose du rat "Nude", la suite de notre travail a consisté à produire des anticorps monoclonaux (AcMc) dirigés contre ces antigènes afin d'identifier leur localisation dans les tachyzoïtes et les bradyzoïtes, et de mettre en évidence les éventuels mécanismes de sécrétion ou d'excrétion.

L'hybridation cellulaire qui a été effectuée à partir des cellules spléniques d'une souris immunisée par les AES a conduit à l'obtention d'un grand nombre de clones d'hybrides producteurs d'AcMc anti-*T. gondii*, identifiés par les techniques d'ELISA et d'IFI. Par la suite, les techniques d'immunoprécipitation et d'immunoélectrotransfert ont permis d'une part de sélectionner trois AcMc (TG17-113, TG17-43 et TG17-179) dirigés contre des AES de 21, 27 et 28,5 kDa respectivement, mais aussi des AcMc dirigés contre des antigènes de surface des tachyzoïtes, P30 et P22, qui se trouvent présents en faible quantité dans les préparations d'AES.

Suite à l'immunoprécipitation des produits de traduction des ARN messagers des tachyzoïtes par un sérum de lapin immunisé par les AES et par des sérums humains prélevés en phases aiguë et chronique de la toxoplasmose, un polypeptide majeur de 24 kDa a été reconnu par le sérum de lapin anti-AES et également par les sérums humains provenant de la phase chronique mais pas de la phase aiguë de l'infection; le gène codant pour cette protéine

a été isolé, séquencé et exprimé chez *E. coli* et dans le virus de la vaccine. De plus, les sérums de souris immunisées par la protéine recombinante P24 ont permis de localiser l'antigène natif, par immunocytochimie ultrastructurale, à la fois dans les granules denses des tachyzoïtes et des bradyzoïtes, ainsi que dans la vacuole parasitophore après invasion de la cellule-hôte (Cesbron-Delauw et coll., 1989). Par la suite, l'identité de l'antigène recombinant P24 avec l'antigène soluble de 27 kDa a été établie par la reconnaissance des protéines recombinantes par l'AcMc TG17-43 dirigé contre l'antigène de 27 kDa. Cet AcMc a été utilisé pour purifier l'antigène natif par immunoadsorption et l'établissement de la séquence partielle en acides aminés de cet antigène a alors permis de confirmer la séquence nucléotidique du gène codant pour P24.

Comme il a été démontré par Sibley et coll. (1986), très vite après l'invasion de la cellule-hôte, *T. gondii* élabore à l'intérieur de la vacuole parasitophore, un réseau membranaire riche en protéines. D'après ces auteurs, la stabilité de ce réseau membranaire au sein du phagosome modifié de *T. gondii* est calcium-dépendant et une molécule parasitaire soluble de 22 kDa isolée des préparations de vésicules membranaires de la vacuole parasitophore se lie au calcium. Plus récemment, Cesbron-Delauw et coll. (1989) ayant démontré que l'antigène recombinant P24 fixe le calcium, l'utilisation de l'AcMc qui reconnaît P24 nous a permis d'établir que l'antigène natif possède également cette propriété. Dans d'autres modèles que la toxoplasmose, des protéines liant le calcium ont été citées pour leur participation dans la régulation des événements intracellulaires tels que la contraction, la sécrétion et la glycogénolyse (Goodman et coll., 1979).

Parmi les AcMc obtenus, TG17-179 réagit avec GP28,5, l'AES hautement immunogène dont nous avons démontré la reconnaissance par tous les sérums humains de phase chronique, la présence d'au moins un épitope commun aux deux stades bradyzoïte et tachyzoïte et les propriétés de fixation à la Con A. Cependant, le déterminant antigénique reconnu par l'AcMc de cette glycoprotéine n'ayant pas été dénaturé suite aux traitements par le périodate et par le TFMS, semble être de nature protéique, ce qui nous a permis de l'utiliser comme sonde pour le criblage de deux banques d'expression présentes dans notre laboratoire. Le criblage de la banque d'ADNc construite dans le vecteur λ gt11 a conduit à

l'isolement des clones d'ADNc codant pour la partie carboxyterminale de l'antigène, ce qui confirme la nature protéique de l'épitope reconnu par l'AcMc. Une région carboxyterminale de 15 aminoacides est en plus reconnue à la fois par l'AcMc et par les sérums humains. Le séquençage de la copie complète des ADNc codant pour cet antigène est actuellement en cours dans notre laboratoire.

Une étude par immunocytochimie ultrastructurale a permis de localiser les trois AES de 21, 27 et 28,5 kDa cibles des AcMc TG17-113, TG17-43 et TG17-179, respectivement, d'une part sur des coupes ultrafines de tachyzoïtes libres ou intracellulaires et d'autre part de localiser les épitopes correspondant sur des coupes de bradyzoïtes enkystés.

Après incubation des sections ultrafines de tachyzoïtes avec les différents AcMc et révélation par un conjugué marqué par l'or colloïdal, les trois antigènes cibles, P21, P27 et GP28,5 sont détectés dans les granules denses des tachyzoïtes ainsi que dans le réseau membranaire de la vacuole parasitophore après invasion de la cellule-hôte. GP28,5 est de plus localisée au niveau de l'appareil de Golgi, ce qui est un argument supplémentaire en faveur de la glycosylation de cet antigène. Sur des coupes de kystes intracérébraux, les épitopes cibles des trois AcMc anti-AES (TG17-43, TG17-179 et TG17-113) sont observés dans les granules denses des bradyzoïtes; de plus, les immunomarquages associés aux AcMc TG17-113 et TG17-179 montrent que les antigènes 21 et 28,5 sont également associés à la paroi des kystes. La localisation particulière de ces antigènes au niveau du compartiment de la cellule-hôte qui contient des tachyzoïtes ou des bradyzoïtes, associée à leur présence dans les granules denses des parasites est en faveur de leur sécrétion à partir d'organites de réserve (les granules denses) vers le phagosome modifié ou le kyste.

L'exocytose et le relargage actif des contenus des granules denses dans la vacuole parasitophore suite à l'invasion de la cellule-hôte a été déjà observé dans le modèle *Sarcocystis muris* (Entzeroth et coll., 1986). Chez le toxoplasme, Sibley et Krahenbuhl (1988) ont suggéré la sécrétion active d'un antigène de 32 kDa purifié à partir des préparations de vésicules membranaires de phagosome et qui était également présent dans les granules denses des tachyzoïtes. Nos résultats confirment ces observations préliminaires et démontrent clairement le mécanisme de sécrétion du toxoplasme à l'aide d'AcMc reconnaissant trois

antigènes cibles différents qu'il convient dorénavant d'appeler antigènes sécrétés et non excrétés-sécrétés. Nos observations ont été récemment en partie retrouvées par Leriche et Dubremetz (1990) qui démontrent l'immunolocalisation d'un antigène de 27 kDa à la fois dans les granules denses du tachyzoïte et dans la vacuole parasitophore.

L'incubation des sections ultrafines avec les AcMc TG17-113 et TG17-179 a permis de mettre en évidence la localisation membranaire de P21 et de GP28,5, chez une subpopulation de tachyzoïtes. Contrairement à l'antigène majeur P30 détecté à la surface externe du plasmalemme, les antigènes P21 et GP28,5 sont localisés à l'intérieur du complexe membranaire sous le plasmalemme, ce qui peut refléter une étape transitoire caractéristique de leur sécrétion. L'observation d'une image d'exocytose dans le complexe membranaire est en faveur de cette hypothèse. Cette localisation périphérique non externe des antigènes 21 et 28,5 kDa est de plus en accord avec les résultats obtenus par cytofluorométrie de flux qui révèlent que 60% de parasites formolés réagissent avec les AcMc TG17-113 et TG17-179. Sibley et Sharma (1987) ont décrit deux antigènes de 28 et 58 kDa purifiés à partir des préparations de vésicules membranaires contenues dans les vacuoles parasitophores et cibles d'un AcMc unique (F3G3). Suite à l'immunomarquage enzymatique des tachyzoïtes préalablement traités au triton X-100, ces auteurs suggèrent la localisation périphérique non superficielle de ces antigènes, ce qui correspondrait à nos observations beaucoup plus précises obtenues *in situ* sur des parasites n'ayant pas subi de traitements par des détergents. GP28,5 et l'antigène de 28 kDa décrit par ces auteurs pourraient être la même molécule, alors que les AcMc F3G3 et TG17-179 seraient dirigés contre des épitopes différents puisque TG17-179 ne réagit pas avec le composé de 58 kDa.

Suite à l'invasion de la cellule-hôte, l'inhibition de fusion de la vacuole parasitophore avec les lysosomes est accompagnée de modifications morphologiques du phagosome (Porchet-Henneré et Torpier, 1983) qui seraient induites par la sécrétion de certains composants de surface ou du cytoplasme du parasite (Sibley et coll., 1986; Sibley et Krahenbuhl, 1988). Ainsi, bien que la fonction exacte des antigènes P21, P27 et GP28,5 que nous avons décrits, de même que celle de l'antigène de 32 kDa décrit par Sibley et Krahenbuhl (1988) reste à élucider, leur localisation spécifique dans les granules denses et dans le phagosome modifié

suggère leur rôle significatif dans la création d'un espace privilégié au sein de la cellule-hôte qui permettrait d'assurer la survie et la multiplication du parasite. Parmi ces molécules sécrétées par le parasite, la protéine P27 liant le calcium est présente simultanément avec P21 et GP28,5 dans la matrice des granules denses. Bien que le rôle régulateur calcium-dépendant du trafic trans-membranaire durant l'exocytose reste à définir, le rôle de cette protéine liant le calcium dans l'emballage des molécules sécrétées dans les granules denses peut être envisagé.

P21, P27 et GP28,5 possèdent toutes trois des épitopes qui sont présents dans les granules denses des bradyzoïtes; de plus, des épitopes de P21 et GP28,5 étant détectés dans la paroi des kystes. Les molécules correspondantes semblent être activement sécrétées, et ceci malgré le métabolisme ralenti des parasites enkystés. Un tel mécanisme de sécrétion des bradyzoïtes n'avait à notre connaissance jamais été décrit.

Les trois antigènes de tachyzoïtes P21, P27 et GP28,5 présentant des épitopes communs avec des antigènes du stade bradyzoïte et de plus à deux souches différentes du parasite pourraient être des candidats potentiels à l'immunoprophylaxie de la toxoplasmose. L'antigène du bradyzoïte présentant un épitope commun avec P21, étant préférentiellement associé aux invaginations de la membrane des kystes et occasionnellement observé à l'extérieur des kystes dans les tissus de l'hôte, pourrait jouer un rôle particulier dans les relations hôte-parasite et dans le maintien de l'immunité protectrice par des stimulations continues du système immunitaire de l'hôte. A la suite de ces observations qui suggèrent le rôle privilégié de P21 dans l'immunité, le clonage moléculaire de cet antigène a été entrepris dans notre laboratoire.

Afin de vérifier la participation des anticorps dirigés contre P21, P27 et GP28,5 dans la réponse humorale vis-à-vis de *T. gondii*, les AcMc correspondants ainsi que des AcMc dirigés contre les antigènes de surface des tachyzoïtes P30 et P22 ont été transférés chez les rats "Nude" avant leur infestation par la souche RH de *T. gondii*. Seuls les transferts d'AcMc anti-P22 et anti-P30 ont induit une augmentation significative de la survie des rats "Nude". Il faut signaler que les AcMc dirigés contre les trois antigènes sécrétés P21, P27 et GP28,5 n'induisent pas la lyse des tachyzoïtes au cours du "dye test", alors que les 2 AcMc anti-P30

et anti-P22 présentent un pouvoir lytique élevé par cette technique de cytotoxicité complément-dépendante. Considérant que seuls les antigènes présents à la surface des parasites sont impliqués dans un tel mécanisme de lyse (Handman et Remington, 1980), il semble logique que P27 qui est cytoplasmique de même que les antigènes P21 et GP28,5 qui ont été localisés à l'intérieur du complexe membranaire et non à la surface du parasite ne soient pas directement accessibles aux anticorps. Les résultats obtenus par les transferts d'AcMc chez le rat "Nude" ainsi que les résultats du "dye test" semblent indiquer que la réponse humorale protectrice observée doit être dirigée efficace vis-à-vis des antigènes présents à la surface du parasite. Les titres élevés en "dye test" et en IFI des sérums de rats immunisés par les AES (sérums protecteurs chez les rats "Nude") suggèrent fortement que d'autres AES, que nous n'avons pas encore identifier, pourraient se présenter à la surface du toxoplasme.

Dans notre laboratoire, la réponse cellulaire T vis-à-vis des différents peptides synthétisés à partir de la séquence nucléotidique de P24 correspondant à l'antigène de sécrétion P27 a été étudiée chez des rats Fischer infectés par la souche RH ou immunisés par les AES ou par une construction P24-virus de la vaccine. Parmi ces peptides, le peptide 170-193 est capable d'éliciter des lymphocytes T pouvant induire par transfert passif, une protection des rats "Nude" contre l'infection par *T. gondii* (Duquesne et coll., en préparation). En suivant la même démarche, le rôle protecteur des lymphocytes T spécifiques des différents antigènes sécrétés P21, P27 et GP28,5 exprimés sous forme de molécules recombinantes ou de peptides dérivés de leur séquence nucléotidique sera étudié. En parallèle, nous utiliserons un modèle faisant intervenir à la fois les composantes humorales et cellulaires du système immunitaire. Des résultats préliminaires de notre laboratoire ont permis d'observer un taux élevé de protection vis-à-vis de l'infection par la souche 76K, par immunisation directe de souris par les AES. Le rôle protecteur des différents antigènes purifiés et des molécules recombinantes P24, GP28,5 puis P21, devra de même être recherché dans ce modèle d'immunisation.

4. APPLICATION DIAGNOSTIQUE: IDENTIFICATION ET RECHERCHE D'ANTIGENES CIRCULANTS

Afin d'identifier les antigènes toxoplasmiques circulants, nous avons choisi le modèle d'infection de la souris par la souche virulente RH de *T. gondii*. En effet, chez ces souris, les antigènes circulants sont détectés très tôt après l'infestation, avant l'apparition des anticorps spécifiques et des immunocomplexes circulants (Raizman et Neva, 1975; Van Knapen et coll., 1985). De plus, il a été démontré par la technique de double diffusion (Ouchterlony) que les antigènes circulants contenus dans les sérums de souris infectées par la souche RH sont en partie identiques aux exo-antigènes recueillis en culture *in vitro* (Van Knapen, 1982). Par la suite, différents antigènes de P.M. 400, 220, 130 et 45 kDa ont été mis en évidence dans les sérums d'infection aiguë de lapin (Ise et coll., 1985). L'enzyme nucleoside triphosphate hydrolase des tachyzoïtes a été également détectée chez la souris dans les sérums d'infection aiguë par deux souches, virulente et non virulente (Asai et coll., 1987).

Dans le présent travail et en utilisant différents AcMc, nous avons démontré que P27 est un antigène circulant. Nous avons ensuite déterminé la cinétique de l'apparition de P27 dans les sérums de souris au cours de l'infection aiguë, par la mise au point d'un test original de compétition entre l'antigène P27 circulant et le peptide 170-193 qui renferme au moins une partie essentielle de l'épitope de P27 reconnu par l'AcMc TG17-43. L'affinité de cet AcMc pour le peptide 170-193 est moyennement élevée ($K = 2,16 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), en comparaison avec les constantes d'affinités des anticorps de sérums de lapins immunisés par des nucléosides conjugués à des protéines, vis-à-vis des nucléosides correspondants (K variables, se situant entre $2,7 \times 10^5$ et $1,8 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$), obtenues par Müller (1980). Cette faible affinité de notre AcMc pour le peptide 170-193 favorise l'inhibition de la fixation du peptide sur l'AcMc par les quantités relativement faibles de l'antigène P27 circulant présentes dans les sérums.

Dans les limites de la sensibilité de ce test, l'antigène circulant P27 est détecté dès le 2ème jour de l'infection et son taux augmente jusqu'à la mort des souris après 4 à 5 jours. D'autres auteurs ont détecté, par des techniques d'immunodiffusion, des antigènes circulants

chez les souris infectées par la souche RH à partir du 2ème jour (Raizman et coll., 1975) ou du 4ème jour (Hafid et coll., 1989) après infection. Par un test ELISA, Van Knapen et coll. (1985) ont détecté des antigènes circulants, dès le premier jour, mais leurs conditions d'infection semblaient être plus virulentes puisqu'au 4ème jour toutes les souris étaient mortes. Dans l'avenir, nous espérons augmenter la sensibilité de notre test, par la biotinylation du peptide et la mise au point d'un système de révélation enzymatique à l'aide de streptavidine conjuguée à une enzyme.

Cette technique présenterait tout son intérêt dans le diagnostic précoce des cas de réactivations de toxoplasmose chez les sujets immunodéprimés. Actuellement, le diagnostic sérologique de l'encéphalite toxoplasmique est en effet difficile car la démonstration par les techniques classiques d'IgG spécifiques ne permet pas de distinguer entre l'infection latente quiescente et une infection active et qu'il ne semble pas exister de corrélation entre le titre en anticorps IgG et la pathologie. De plus, la présence d'anticorps IgM, révélatrice de toxoplasmose aiguë chez les sujets immunocompétents, n'est que rarement observée chez les patients atteints du SIDA (Luft et coll., 1984; Holliman, 1988) et ne peut donc constituer un élément de diagnostic chez ces malades. Par contre, les antigènes circulants sont détectés chez certains patients sous traitements immunosuppresseurs durant la réactivation de leur toxoplasmose chronique (Candolfi et coll., 1987). De même, Suzuki et Kobayashi (1987) ont démontré la présence de taux important d'antigènes circulants, chez les souris "Nude" immunodéficientes au cours de l'infection aiguë par une souche avirulente de *T. gondii* qui par ailleurs n'induit que très peu d'antigènes circulants chez les souris normales immunocompétentes. Enfin, des antigènes circulants de 27 et 57 kDa ont été identifiés par immunoélectrotransfert des sérums, de manière comparable à notre travail, dans les sérums de patients immunodéprimés atteints du SIDA et ayant contracté la toxoplasmose (Hassl et coll., 1988). Par conséquent, chez les patients immunodéprimés, l'utilisation de notre technique pour la recherche de l'antigène circulant P27, dans le sérum ou dans les autres liquides biologiques tels que les liquides céphalo-rachidiens et broncho-alvéolaires, pourrait présenter un intérêt indéniable pour un dépistage rapide des réactivations de toxoplasmoses et la mise en oeuvre de traitements adaptés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas P., Cagnard M.Y., Roumiantzeff M. et Colombet G. (1982)** Détection de l'immunité toxoplasmique par intradermo-réactions à l'aide d'exo-antigènes de *Toxoplasma gondii*. *Lyon Méd.* **248**: 79.
- Ambroise-Thomas P. et Garin J.P. (1984)** Toxoplasmose. *Encycl. Méd. Chir., Paris. Maladies infectieuses*, 8098 A¹⁰, 4.
- Anderson S.E., Bautista S.C. et Remington J.S. (1976a)** Specific antibody-dependant killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **26**: 375.
- Anderson S.E., Bautista S.C. et Remington J.S. (1976b)** Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocyte products. *J. Immunol.* **117**: 381.
- Araujo F.G. et Remington J.S. (1984)** Partially purified antigen preparations of *Toxoplasma gondii* protect against lethal infection in mice. *Infect. Immun.* **45**: 122.
- Araujo F.G. et Remington J.S. (1987)** Toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**: 1.
- Asai T., Kim T., Kobayashi M. et Kojima S. (1987)** Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**: 1332.
- Barski G., Sorieul S. et Cornefert F. (1960)** Production dans des cultures *in vitro* de deux souches cellulaires en association, de cellules de caractère "hybride". *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **251**: 1825.
- Black C.M., Catterall J.R. et Remington J.S. (1987)** *In vivo* and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J. Immunol.* **138**: 491.
- Bloom B.R. (1979)** Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. *Nature.* **279**: 21.
- Burg J.L., Perelman D., Kasper L.H., Ware P.L. et Boothroyd J.C. (1988)** Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3584.
- Burg J.L., Grover C.M., Pouletty P. et Boothroyd J.C. (1989)** Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1787.
- Butterworth A.E., Dunne D., Fulford A., Capron M., Capron A., Koech D., Ouma J.H. et Sturrock R. (1988)** Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie* **70**: 1053.
- Buttin G. et Cazenave P.A. (1980)** L'hybridation des cellules lymphocytaires. *Bull. Ins. Pasteur.* **78**: 7.
- Candolfi E., Derouin F. et Kien T. (1987)** Detection of circulating antigens in immunocompromised patients during reactivation of chronic toxoplasmosis. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**: 44.

Capron A. et Dessaint J.P. (1988) Vaccination against parasitic diseases: some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur/Immunol.* 139: 109.

Capron A., Cesbron-Delauw M.F. et Darcy F. (1990) Nouvelles approches moléculaires dans le diagnostic et la prévention de la toxoplasmose. *Bull. Acad. Natl. Méd.* 174: 387.

Catterall J.R., Hofflin J.M. et Remington J.S. (1986a) Pulmonary toxoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133: 704.

Catterall J.R., Sharma S.D. et Remington J.S. (1986b) Oxygen-independent killing by alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 163: 1113.

Catterall J.R., Black C.M., Leventhal J.P., Rizk N.W., Wachtel J.S. et Remington J.S. (1987) Non oxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 55: 1635.

Cesbron J.Y., Capron A., Ovlaque G. et 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. Meth.* 83: 151.

Cesbron-Delauw M.F., Guy B., Torpier G., Pierce R.J., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq J.P. et Capron A. (1989) Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7537.

Chumpitazi B., Ambroise-Thomas P., Cagnard M.Y. et Colombet G. (1983) Exo-antigènes toxoplasmiques produits en cultures *in vitro*, détermination des poids moléculaires. *Bull. Soc. Franç. Paras.* 1: 89.

Chumpitazi B., Ambroise-Thomas P., Cagnard M.Y. et Autheman J.M. (1987) Isolation et characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from *in vitro* culture in MRC5 and Vero cells. *Int. J. Parasitol.* 17: 829.

Couvreur G., Sadak S., Fortier B. et Dubremetz J.F. (1988a) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 97: 1.

Couvreur G., Desmouts G. et Thulliez P. (1988b) Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of Spiramycin on placenta infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 22: 193.

Dannemann B.R., Morris V.A., Araujo F.G. et Remington J.S. (1989) Assessment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cycts. *J. Immunol.* 143: 2684.

Dardé M.L., Bouteille B. et Pestre-Alexandre M. (1988) Isoenzymatic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 551.

Davidson R.L. et Gerald P.S. (1976) Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol. *Somat. Cell. Genet.* 2: 165.

De Carvalho L. et De Souza W. (1989) Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* 36: 164.

Decoster A., Darcy F., Caron A. et Capron A. (1988a) IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* II: 1104.

Decoster A., Darcy F. et Capron A. (1988b) 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.* 73: 376.

Derouin F., Mazeron M.C. et Garin Y.J.F. (1987) Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1597.

Derouin F. et Chastang C. (1989) *In vitro* effects of folate inhibitors on *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1753.

Derouin F., Sarfati C., Beauvais B., Iliou M.C., Dehen L. et Lariviere M. (1989) Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1661.

Desgeorges P.T., Billault X., Ambroise-Thomas P. et 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.

Desmots G., Couvreur J., Alison F., Baudelot J., Gerbeaux J. et Lelong M. (1965) Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* 10: 952.

Desmots G., Naot Y. et 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.

Desmots G., Forestier F., Thulliez Ph., Daffos F., Capella-Pavlovsky M. et Chartier M. (1985) Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet*: 500.

Dubey J.P. et Beattie C.P. (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*, by *CRC Press, Inc.*

Duquesne V., Auriault C., Darcy F., Decavel J.P. et Capron A. (1990) Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells. *Inf. Immun.*, 58: 2120.

Edge A.S.B., Faltynek C.R., Hof L., Reichert L.E. et Weber P. (1981) Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. *Anal. Biochem.* 118: 131.

Entzeroth R., Dubremetz J.F., Hodick D. et Ferreira E. (1986) Immunoelectron microscopic demonstration of the exocytosis of dense granule contents into the secondary parasitophorous vacuole of *Sarcocystis muris* (Protozoa, Apicomplexa). *Eur. J. Cell Biol.* 41: 182.

Feldman H.A. et Lamb G.A. (1966) A micromodification of the *Toxoplasma* dye test. *J. Parasitol.* 52: 415.

Ferguson D.J.P. et Hutchison W.M. (1987a) An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* 73: 483.

Ferguson D.J.P. et Hutchison W.M. (1987b) The host-parasite relationship of *Toxoplasma gondii* in the brains of chronically infected mice. *Virchows Arch. A.* 411: 39.

Ferguson D.L.P., Hutchison W.M. et Pettersen E. (1989) Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Research.* 75: 599.

Foster B.G. et 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. (1973) Toxoplasmosis: parasite life cycle, pathology and immunology: *The Coccidia* (D.M. Hammond, ed.) University Park Press, Baltimore. p. 343.

Frenkel J.K. (1988) Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* 4: 273.

Frenkel J.K., Dubey J.P. et Miller N.L. (1969) *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science.* 164: 432.

Frenkel J.K., Dubey J.P. et Miller N.L. (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science.* 167: 893.

Gershon D. et Sachs L. (1963) Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. *Nature.* 198: 912.

Gill H.S. et Prakash O. (1970) A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. *Indian J. Med. Res.* 58: 1157.

Goodman M., Pechere T.F., Haiech J. et Demaille J.G. (1979) Evolutionary diversification of structure and function in the family of intracellular calcium-binding proteins. *J. Mol. Evol.* 13: 331.

Grzych J.M., Capron M., Bazin H. et Capron A. (1982) *In vitro* and *in vivo* effector function of rat IgG2a monoclonal anti-*S. mansoni* antibodies. *J. Immunol.* 129: 2739.

Grzych J.M., Capron M., Dissous C. et Capron A. (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* 133: 998.

Hafid J., Tran Manh Sung R. et Raberin H. (1989) Détection des antigènes circulants de *Toxoplasma gondii* par réactions d'immunoprécipitation dans la toxoplasmose murine. *Ann. Soc. belge Méd. trop.* 69: 49.

Handman E. et Remington J.S. (1980) Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology.* 40: 579.

Handman E., Goding J.W. et Remington J.S. (1980) Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 124: 2578.

Hassl A., Aspöck H. et Flamm H. (1988) Circulating antigen of *Toxoplasma gondii* in patients with AIDS: significance of detection and structural properties. *Zbl. Bakt. Hyg.* 270: 302.

Hauser W.F. et Remington J.S. (1981) Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Infect. Immun.* 32: 637.

Hauser W.F., Sharma S.D. et Remington J.S. (1982) Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell. Immunol.* 69: 330.

- Hauser W.F. et Tsai V. (1986)** Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T.gondii* *in vitro*. *J. Immunol.* 136: 313.
- Holliman R.E. (1988)** Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. *J. Infect.* 16: 121.
- Hopp T.P. et Woods K.R. (1981)** Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3824.
- Howard R.J., Kaushal D.C., Carter R. (1982)** Radioiodination of parasite antigens with 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3, 6-diphenyl glycoluril (Iodogen). Studies with zygotes of *Plasmodium gallinaceum*. *J. Protozool.* 29: 114.
- Hughes H.P.A. et Van Knapen F. (1982)** Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int. J. Parasitol.* 12: 433..
- Hughes H.P.A., Gonzales A., Guhl F. et Hudson L. (1985)** Antigen-specific lymphocyte transformation in congenital toxoplasmosis. *Immunol. Letters* 10: 95.
- Huldt G. (1966)** Experimental toxoplasmosis. Studies of the multiplication and spread of *Toxoplasma* in experimentally infected rabbits. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 67: 401.
- Huldt G. (1971)** Studies on experimental toxoplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 177: 146.
- Hunter W.H. et Greenwood F.C. (1962)** Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature.* 194: 495.
- Hutchison W.M. (1967)** The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 61: 80.
- Hutchison W.M., Dunachie J.F., Süm J.C. et Work K. (1970)** Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br. Med. J.* 1:142.
- Israelski D.M. et Remington J.S. (1988)** Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2: 429.
- Israelski D.M., Skowron G., Leventhal J.P., Long I., Blankenship C.F., Barris G.W., Prince J.B., Araujo F.G. et Remington J.S. (1988)** *Toxoplasma* peritonitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Intern. Med.* 148: 1655.
- Jacobs L. et Lunde M.N. (1957)** A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.* 43: 308.
- Jacobs L., Remington J.S. et Melton M.L. (1960a)** The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 46: 11.
- Jacobs L., Remington J.S. et Melton M.L. (1960b)** A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* 46: 23.
- Jaffe C.L., Grimaldi G. et McMahon-Pratt D. (1984)** The cultivation and cloning of *Leishmania*. dans *Genes and antigens of parasites: a laboratory Manual*, 2ème ed. C. M. Moser, Rio de Janeiro.
- Janku J. (1923)** Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microptalme avec parasite dans la rétine. *Cas. Lek. Cesk.* 62: 1021.

Johnson A.M., McDonald P.J. et Neoh S.H. (1981) Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of *Toxoplasma gondii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100: 934.

Johnson A.M., Haynes W.D., Leppard P.J., McDonald P.J. et Neoh S.H. (1983a) Ultrastructural and biochemical studies on the immunohistochemistry of *Toxoplasma gondii* antigens using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 177: 209.

Johnson A.M., McDonald P.J. et Neoh S.H. (1983b) Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 69: 459.

Johnson A.M., McDonald P.J. et Neoh S.H. (1983c) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.* 30: 351.

Jones T.C., Len L. et Hirsch J.G. (1975) Assessment *in vitro* of immunity against *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* 141: 466.

Khalife J., Capron M., Capron A., Grzych J.M., Butterworth A.E., Dunne D.W. et Ouma J.H. (1986) Immunity in human schistosomiasis mansoni. Regulation of protective immune mechanisms by IgM blocking antibodies. *J. Exp. Med.* 164: 1626.

Kasper L.H., Crabb J.H. et Pfefferkorn E.R. (1982) Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 129: 1694.

Kasper L.H., Crabb J.H. et Pfefferkorn E.R. (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* 130: 2407.

Kasper L.H., Bradley M.S. et Pfefferkorn E.R. (1984) Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 132: 443.

Kasper L.H., Currie K.M. et Bradley M.S. (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 3426.

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

Kasper L.H. (1989) Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 57: 668.

Kelly C.D., Welte K. et Murray H.W. (1987) Antigen-induced human interferon-gamma production. Differential dependence on interleukin 2 and its receptor. *J. Immunol.* 139: 2325.

Kelly C.D., Russo C.M., Rubin B.Y. et Murray H.W. (1989) Antigen-stimulated human interferon-gamma generation: role of accessory cells and their expressed or secreted products. *Clin. exp. Immunol.* 77: 397.

Khan I.A., Smith K.A. et Kasper L.H. (1988) Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141: 3600.

Köhler G. et Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495.

Köhler G., Howe S.C. et Milstein C. (1976) Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.* 6: 292.

Krahenbuhl J.L., Blazkovec A.A. et Lysenko M.G. (1971) *In vivo* and *in vitro* studies of delayed-type hypersensitivity to *Toxoplasma gondii* in guinea pigs. *Infect. Immun.* 3: 260.

Krahenbuhl J.L., Ruskin J. et Remington J.S. (1972a) The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 108: 425.

Krahenbuhl J.L., Gaines J.D. et Remington J.S. (1972b) Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 125: 283.

Kuhn D. et Weiland G. (1969) Experimentelle *Toxoplasma*-infektionen bei der Katze. I. Wiederholte Übertragung von *Toxoplasma gondii* durch Kot von mit Nematoden infizierten Katzen. *Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr.* 82: 401.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.

Laugier M. et Quilici M. (1970) Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée. (Paris)* 45: 389.

Le Fichoux Y., Marty P. et Chan H. (1987) Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Ann. Pédiatr. (Paris).* 34: 375.

Leite-Cardarelli P. (1988) Clonage de l'antigène majeur de surface de *Toxoplasma gondii*, P30. Thèse de Doctorat en Biochimie, Université de Lille I, N° d'ordre: 276.

Leport C., Bastuji-Garin S., Perronne C. et Salmon D. (1989) An open study of pyrimethamine-clindamycin combination in AIDS patients with brain toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 160: 557.

Leriche M.A. et Dubremetz J.F. (1990) Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.*, sous presse.

Littlefield J.W. (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science.* 145: 709.

Luft B.J. et Remington J.S. (1988) Aids commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* 157: 1.

Luft B.J., Brooks R.G., Conley F.K., McCabe R.E. et Remington J.S. (1984) Toxoplasmic encephalitis in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J.A.M.A.* 252: 913.

Lycke E. et Norrby R. (1966) Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured host cells. *Br. J. Exp. Pathol.* 47: 248.

Lycke E., Norrby R. et Remington J.S. (1968) Penetration-Enhancing Factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increases its virulence for mice. *J. Bacteriol.* 96: 785.

Lycke E., Carlberg K. et Norrby R. (1975) Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the Penetration-Enhancing Factor of *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 11: 853.

Maruyama K., Mikawa T. et Ebashi S. (1984) Detection of calcium binding proteins by ^{45}Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. *J. Biochem.* 95: 511.

Masihi R.N. et 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.* 240: 135.

Mauras G., Dodeur M., Laget P., Senet J.M. et Bourrillon R. (1980) Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii* membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 906.

McCabe R.E. et Remington J.S. (1986) Mechanisms of killing of *Toxoplasma gondii* by rat peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 52: 151.

McCabe R.E. et Remington J.S. (1988) Toxoplasmosis: the time has come. *New Engl. J. Med.* 318: 313.

McCabe R.E. et Oster S. (1989) Current recommendations and future prospects in the treatment of toxoplasmosis. *Drugs* 38: 973.

Moeremans M., Daneels G., Van Dijck A., Langanger G. et De Mey J. (1984) Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. *J. Immunol. Meth.* 74: 353.

Müller R. (1980) Calculation of average antibody affinity in anti-hapten sera from data obtained by competitive radioimmunoassay. *J. Immunol. Meth.* 34: 345.

Murray H.W., Spitanly G.L. et Nathan C.F. (1985a) Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-gamma. *J. Immunol.* 134: 1619.

Murray H.W., Rubin B.Y., Carriero S.M., Harris A.M. et Jaffe E.A. (1985 b) Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 1982.

Nagasawa H., Igarashi I., Matsumoto T., Sakurai H., Marbella C. et Suzuki N. (1980) Mouse spleen cell-derived *Toxoplasma* growth inhibitory factor: its separation from macrophage migration inhibitory factor. *Immunoobiol.* 157: 307.

Nakabayashi T. et Motomura I. (1968) A method for separating cysts of *Toxoplasma gondii* from infected mouse brains by multilayer centrifugation with gum arabic solution. *Trop. Med.* 10: 72.

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

Naot Y. et Remington J.S. (1980) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* 142: 757.

Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E. et Rubin B.Y. (1983) Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158: 670.

Nichols B.A. et O'Connor G.R. (1981) Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. *Lab. Invest.* 44: 324.

Nichols B.A., Chiappino M.L. et O'Connor G.R. (1983) Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83: 85.

Nichols B.A. et Chiappino M.L. (1987) Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* 34: 217.

Nicolle C. et Manceaux L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du *gondii*. *C.R. Acad. Sci.* 147: 763.

Norrby R. (1970) Host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2: 250.

Norrby R. (1971) Immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 3: 278.

Omata Y., Igarashi M., Ramos M.I. et Nakabayashi T. (1989) *Toxoplasma gondii*: antigenic differences between endozoites and cystozoites defined by monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* 75: 189.

Orozco O., Afchain D., Dissous C., Rodriguez C., Ovlaque G., Lemesre J.L., Loyens M. et Capron A. (1984) Different monoclonal antibodies against the component 5 specific for *Trypanosom cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33: 560.

Ouchterlony D. (1958) Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prøgr. Allergy.* 5: 1.

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

Peterson G.L. (1977) A simplification of protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346.

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

Pinon J.M. et Gruson N. (1982) Intérêts des profils immunologiques comparés ELIFA dans le diagnostic précoce de la toxoplasmose congénitale. *Lyon Méd.* 248: 27.

Pinon J.M., Thoannes H. et Gruson N. (1985) An Enzyme-Linked Immuno-Filtration Assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. *J. Immunol. Meth.* 77: 15.

Pinon J.M., Thoannes H., Pouletty P.H., Poirriez J., Damiens J. et Pelletier P. (1986) Detection of IgA specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzymatic IgA-capture assay. *Diagn. Immunol.* 4: 223.

Pinon J.M., Toubas D., Marx C., Mugeot G., Bonnin A., Bonhomme A., Villaume H., Foudrinier F. et Lèpan H. (1990) Detection of specific Immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1739.

Porchet-Henneré E. et Torpier G. (1983) Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule-hôte. *Protistologica* 3: 357.

Prince J.B., Araujo F.G., Remington J.S., Burg J.L., Boothroyd J.C. et Sharma S.D. (1989) Cloning of cDNAs encoding 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34: 3.

Pujol M., Morel B. et Malbruny B. (1989) Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Path. Biol.* 37: 893.

Raizman R.E. et Neva F.A. (1975) Detection of circulating antigen in acute experimental infections. *J. Infect. Dis.* 132: 44.

Remington J.S. et Cavanaugh E.N. (1965) Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from skeletal muscle and brain. *New Engl. J. Med.* 273: 1308.

Remington J.S., Miller M.J. et Brownlee I. (1968) IgM antibodies in acute toxoplasmosis. II. Prevalence and significance in acquired cases. *J. Lab. Clin. Med.* 71: 855.

Remington J.S. et Krahenbuhl J.L. (1982) Immunology of *Toxoplasma gondii*. in: *Comprehensive Immunology* (A.J. Nahmias and J.R. O'Reilly, eds) pp 327-371. Plenum Publishing Company, New York.

Revol L. (1964) Toxoplasmose ganglionnaire acquise et mononucléose infectieuse. *J. Méd. Lyon.* 1054: 901.

Ridel P.R., Auriault C., Darcy F., Pierce R., Leite P., Santoro F., Neyrinck J.L., Kusnierz J.P. et Capron A. (1988) Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* 141: 978.

Rodriguez C., Afchain D., Capron A., Dissous C. et Santoro F. (1985) Major surface of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur. J. Immunol.* 15: 747.

Roques C., Bessieres M.H. et Seguela J.P. (1986) Caractérisation immuno-chimique des protéines des exo-antigènes provenant de différentes souches de *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* 4: 79.

Roth. J., Bendayan M., Carlemalm E., Villinger W. et Garavito M. (1981) Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 663.

Ruskin J. et Remington J.S. (1976) Toxoplasmosis in the compromised host. *Ann. Intern. Med.* 84: 193.

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

Sabin A.B. (1942) Toxoplasmosis, a recently recognized disease of human beings. *Adv. Pediatr.* 1: 1.

Sabin A.B. et Feldman H.A. (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science.* 108: 660.

Sadak A., Taghy Z., Fortier B. et Dubremetz J.F. (1988) Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 29: 203.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A. et Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230: 1350.

Santoro F., Auriault C., Leite P., Darcy F. et Capron A. (1987) Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 11: 297.

Savva D., Morris J.C., Johnson J.D. et Holliman R.E. (1990) Polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii*. *J. Med. Microbiol.* 32: 25.

Schupp E., Michel R., Raether W., Niemeitz H. et Uphoff M. (1978) Invasion non erythrozyten durch *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenkd.* **55**: 189.

Schwartzman J.D. (1986) Inhibition of a Penetration-Enhancing Factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect. Immun.* **51**: 760.

Schwartzman J.D. et Krug E.C. (1989) *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. *Exp. Parasitol.* **68**: 74.

Seligman M. et Brouet J.C. (1973) Antibody activity of human myeloma globulins. *Seminars in Hematology.* **10**: 163.

Sethi K.K., Rahman A., Pelster B. et Brandis H. (1977) Search for the presence of lectin-binding sites on *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **63**: 1076.

Sethi K.K., Endo T. et Brandis H. (1980) Hybridomas secreting monoclonal antibody with specificity for *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **6**: 132.

Sethi K.K., Endo T. et Brandis H. (1981) *Toxoplasma gondii* trophozoites precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. *Immunol. Letters* **2**: 343.

Sharma S.D., Mullenax J., Araujo F.G., Erlich H.A. et Remington J.S. (1983) Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* **131**: 977.

Sharma S.D., Araujo F.D. et 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., Hofflin J.M. et Remington J.S. (1985) *In vivo* recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **135**: 4160.

Sheffield H.G. et Melton M.L. (1969) *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. *Science.* **164**: 431.

Sheffield H.G. et Melton M.L. (1970) *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science.* **167**: 892.

Shepp D.H., Hackman R.C., Conley F.K., Anderson J.B. et Meyers J.B. (1985) *Toxoplasma gondii* reactivation identified by detection of parasitemia in tissue culture. *Ann. Intern. Med.* **103**: 218.

Shulman M., Wilde C.D. et Köhler G. (1978) A better line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature.* **276**: 269.

Sibley L.D., Weidner E. et Krahenbuhl J.L. (1985a) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* **315**: 416.

Sibley L.D., Krahenbuhl J.L. et Weidner E. (1985b) Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **49**: 760.

Sibley L.D., Krahenbuhl J.L., Adams G.M. et 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. et Sharma S.D. (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.* 55: 2137.
- Sibley L.D. et Krahenbuhl J.L. (1988) Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *Eur. J. Cell Biol.* 47: 81.
- Sorieul S. et Ephrussi B. (1961) Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells *in vitro*. *Nature.* 190: 653.
- Splendore A. (1909) Sur un nouveau protozoaire parasite de lapin, 2ème note préliminaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* 2: 462.
- Stewart W.E., Lin L.S., Wiranowska-Stewart M. et Cantell K. (1977) Elimination of size and charge heterogeneities of human leukocyte interferons by chemical cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4200.
- Suzuki Y. et Kobayashi A. (1987) Presence of high concentrations of circulating *Toxoplasma* antigens during acute *Toxoplasma* infection in athymic nude mice. *Infect. Immun.* 55: 1017.
- Suzuki Y. et Remington J.S. (1988) Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2⁺ and Lyt-1⁺, L3T4⁺ T cells in mice. *J. Immunol.* 140: 3943.
- Suzuki Y., Orellana M.A., Schreiber R.D. et Remington J.S. (1988) Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 240: 516.
- Thulliez P. (1989) Sérologies au cours de la grossesse: toxoplasmose et rubéole. *Option/Bio* N°4.
- Tomavo S., Schwarz R.T. et Dubremetz J.F. (1989) Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4576.
- Towbin H., Staehelin T. et Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350.
- Turunen H., Vuorio K.A. et 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.
- Van Knapen F. (1982) Detection and significance of circulating antigens and complexes in *Toxoplasma* infections. *Lyon Méd.* 248: 51.
- Van Knapen F., Panggabean S.D. et Van Leusden J. (1985) Demonstration of *Toxoplasma* antigen containing complexes in active toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* 22: 645.
- Verwaerde C., Joseph M., Capron M., Pierce R.J., Damonville M., Velge F., Auriault C. et Capron A. (1987) Functional properties of a rat monoclonal IgE antibody specific for *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 138: 4441.
- Vivier E. et Petitprez A. (1969) Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils de *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 43: 329.
- Voller A., Bidwell D.E., Barlett A., Fleck D.G., Perkins M. et Oladehin B. (1976) A microplate enzyme-immunoassay for *Toxoplasma* antibody. *J. Clin. Path.* 29: 150.

Waldeland H. et Frenkel J.K. (1983) Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J. Parasitol.* 69: 60.

Walton B.C., Benchoff B.M. et Brooks W.H. (1966) Comparaison of the indirect fluorescent antibody test and the methylene blue dye test for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 149: 152.

Ware P.L. et Kasper L.H. (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 55: 778.

Weigert M., Rashke W.C., Carson D. et Cohn M. (1974) Immunochemical analysis of the idiotypes of mouse myeloma proteins with specificity for levan or dextran. *J. Exp. Med.* 139: 137.

Westblom T.U. et Belshe R.B. (1988) Clindamycin therapy of cerebral toxoplasmosis in an AIDS patient. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 561.

Wolf A. et Cowen D. (1937) A new protozoan disease of man. *Bull. Neurol. Inst. N.Y.* 6: 306.

Wolf A. et Cowen D. et Paize B.A. (1939) Human toxoplasmosis; occurrence in infants as an encephalomyelitis, verification by transmission to animals. *Science.* 89: 226.

Wolfson F. (1941) Mammalian *Toxoplasma* in the erythrocytes of canaries, ducks, and duck embryos. *Am. J. Trop. Med.* 21: 653.

Work K. et Hutchison W.M. (1969) A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 75: 191.

Yerganian G. et Nell M.B. (1966) Hybridization of dwarf hamster cells by UV-inactivated Sendai virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 55: 1066.

Zavala F., Tam J.P., Hollingdale M.R., Cochrane A.H., Quakyi I., Nussenzweig R.S. et Nussenzweig V. (1985) Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science.* 228: 1436.

Zychlinsky A., Karim M., Nonacs R. et Young J.D.E. (1990) A homogeneous population of lymphokine-activated killer (LAK) cells is incapable of killing virus-, bacteria-, or parasite-infected macrophages. *Cell. Immunol.* 125: 261.

TABLE DES MATIERES

RESUME	11
INTRODUCTION	13
GENERALITES	16
1. LE TOXOPLASME ET LA TOXOPLASMOSE	17
1.1. Historique	17
1.2. Le parasite et son cycle	19
1.2.1. Morphologie des différents stades infectieux du toxoplasme	19
1.2.2. Cycle évolutif	21
1.3. La toxoplasmose	21
1.3.1. La toxoplasmose acquise	23
1.3.2. La toxoplasmose congénitale	24
2. L'IMMUNITE DANS LA TOXOPLASMOSE	25
2.1. Les antigènes de <i>T. gondii</i>	25
2.1.1. Les antigènes solubles	25
2.1.1. Les antigènes membranaires	26
2.1.3. Les antigènes d'excrétion-sécrétion	28
2.2. L'immunité protectrice	29
2.2.1. L'immunité humorale	29
2.2.2. L'immunité à médiation cellulaire	31
3. LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE LA TOXOPLASMOSE	34
3.1. Le diagnostic	34
3.1.1. Diagnostic par la recherche du parasite	34
3.1.2. Diagnostic sérologique	35
3.2. Le traitement	37
4. INTERET DES SONDES ANTICORPS MONOCLONALES	34
4.1. Historique	38
4.2. Les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux	38
4.3. Applications et utilisations des anticorps monoclonaux en parasitologie	40

MATERIELS ET METHODES	43
1. LES PARASITES	44
1.1. Souches de <i>T.gondii</i> utilisées	44
1.2. Obtention et entretien des tachyzoïtes	44
1.3. Obtention et entretien des kystes	45
2. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES	45
2.1. Préparation des extraits antigéniques de tachyzoïtes	45
2.1.1. Extraction des antigènes solubles	45
2.1.2. Extraction des antigènes membranaires	45
2.1.3. Les antigènes se fixant à la concanavoline A	46
2.1.4. Les antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes	46
2.2. Préparation de l'extrait de bradyzoïtes	47
3. IDENTIFICATION DES ANTIGENES CIBLES DES SERUMS IMMUNS ET DES ANTICORPS MONOCLONAUX	47
3.1. Préparations des antigènes radiomarqués	48
3.1.1. Marquage des antigènes de surface des tachyzoïtes par ^{125}I	48
3.1.2. Marquage par ^{125}I des antigènes d'extrait soluble des tachyzoïtes et d'extrait des bradyzoïtes	48
3.1.3. Marquage métabolique des antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes par la ^{35}S -méthionine	49
3.1.4. Extraction des antigènes solubles marqués par la ^{35}S -méthionine des tachyzoïtes	49
3.1.5. Extraction par le nonidet P40 des antigènes marqués par la ^{35}S -méthionine des tachyzoïtes	50
3.1.6. Extraction des antigènes radiomarqués des tachyzoïtes se fixant à la concanavoline A	50
3.2. Les sérums immuns	50
3.2.1. Sérums d'infection	50
3.2.2. Sérums d'immunisation	50
3.2.3. Sérums humains	51
3.3. Immunoprécipitation	51
3.4. Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS	52
3.5. Immunoélectrotransfert	52

4. CARACTERISATION DE LA NATURE BIOCHIMIQUE DE CERTAINS ANTIGENES	
4.1. Mise en évidence d'une protéine fixant le calcium	53
4.2. Déglycosylation des antigènes	53
4.2.1. Déglycosylation par le TFMS	54
4.2.2. Déglycosylation par le métapériodate de sodium	54
5. HYBRIDATION CELLULAIRE ET SELECTION DES HYBRIDES	55
6. IDENTIFICATION DES HYBRIDES PRODUCTEURS D'ANTICORPS ANTI-<i>T. GONDII</i>	
6.1. Immunofluorescence indirecte	57
6.2. ELISA	57
7. CLONAGE CELLULAIRE DES HYBRIDES PRODUCTEURS D'ANTICORPS	58
8. PRODUCTION MASSIVE D'ANTICORPS MONOCLONAUX	59
9. CARACTERISATION ISOTYPIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX	59
10. PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	59
11. PURIFICATION DE L'ANTIGENE P27	60
12. DETERMINATION DE LA CONSTANTE D'AFFINITE DES ANTICORPS MONOCLONAUX	61
12.1. Détermination de la concentration optimale du traceur	61
12.2. Détermination de la dilution optimale de l'anticorps monoclonal	62
12.3. Constante d'affinité	62
13. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS	63
13.1. Activité biologique <i>in vivo</i> : transfert passif d'anticorps chez les rats "Nude"	63
13.2. Activité biologique <i>in vitro</i> : test de lyse complément-dépendante	63
14. LOCALISATION DES ANTIGENES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX	
14.1. Analyse en cytofluorométrie de flux	64
14.2. Analyse en microscopie électronique	65
15. ESSAI RADIOIMMUNOLOGIQUE POUR LA DETECTION D'ANTIGENES CIRCULANTS	65

RESULTATS

67

1. MISE AU POINT DES SYSTEMES D'EXCRETION-SECRETION DES TACHYZOITES

2. IDENTIFICATION DES ANTIGENES EXCRETES-SECRETES IMMUNOGENES
AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE ET EXPERIMENTALE

70

2.1. Caractérisation des antigènes d'excrétion-sécrétion immunoprécipités

par les sérums humains

70

2.2. Caractérisation des antigènes d'excrétion-sécrétion immunoprécipités

par les sérums d'animaux infectés ou immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés

72

3. MISE EN EVIDENCE, DANS LE MODELE EXPERIMENTAL DU RAT "NUDE", DU
ROLE PROTECTEUR DES ANTICORPS INDUITS PAR LES ANTIGENES
EXCRETES-SECRETES

74

4. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES DES
STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE PRESENTANT DES EPITOPES COMMUNS4.1. Les antigènes de tachyzoïtes marqués par la ^{35}S -Met, reconnus par les sérums
d'immunisation par un extrait de bradyzoïtes

76

4.2. Identification des antigènes excrétés-sécrétés glycosylés

78

4.3. Les antigènes marqués par ^{125}I des tachyzoïtes et des bradyzoïtes
présentant des épitopes communs

78

5. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-*T. GONDII*

81

5.1. Sélection des clones hybrides producteurs d'anticorps monoclonaux anti-*T. gondii*

81

5.2. Caractérisation isotypique des anticorps monoclonaux

82

6. IDENTIFICATION DES ANTIGENES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX

6.1. Immunoprécipitation des antigènes de tachyzoïtes par les anticorps monoclonaux

82

6.1.1. Les antigènes de surface marqués par ^{125}I

82

6.1.2. Les antigènes solubles marqués par ^{125}I

84

6.1.3. Les antigènes excrétés-sécrétés marqués par la ^{35}S -méthionine

84

6.1.4. Les antigènes somatiques marqués par la ^{35}S -méthionine

84

6.2. Identification des antigènes cibles par immunoélectrotransfert	87
6.2.1. Immunoélectrotransfert d'un extrait antigénique total	87
6.2.2. Immunoélectrotransfert des antigènes excrétés-sécrétés	89
6.2.3. Réactivité vis-à-vis de l'antigène recombinant P24	89
7. SEQUENCAGE PARTIEL DE L'ANTIGENE NATIF P27	92
8. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES EXCRETES-SECRETES CIBLES DES ANTICORPS MONOCLONAUX	94
8.1. Fixation de calcium par l'antigène cible de l'AcMc TG17-43	94
8.2. Fixation à la concanavaleine A de l'antigène cible de l'AcMc TG17-179	94
8.3. Etablissement de la nature protéique de l'épitope de GP28,5 reconnu par l'AcMc TG17-179	96
9. LOCALISATION DES ANTIGENES CIBLES	99
9.1. Analyse en cytofluorométrie de flux	
9.2. Localisation ultrastructurale des antigènes excrétés-sécrétés: mise en évidence du mécanisme de sécrétion de <i>T. gondii</i>	101
9.2.1. Immunolocalisation des antigènes dans les tachyzoïtes	101
9.2.2. Immunolocalisation des antigènes dans les kystes et dans les bradyzoïtes	104
10. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ANTICORPS MONOCLONAUX	109
10.1. Activité biologique <i>in vitro</i>	109
10.2. Activité biologique <i>in vivo</i> chez le rat "Nude"	109
11. APPROCHE DIAGNOSTIQUE: RECHERCHE D'ANTIGENES CIRCULANTS CHEZ LA SOURIS	111
11.1. Identification d'un antigène circulant	111
11.2. Détection de l'antigène circulant P27, par une méthode radioimmunologique	113
11.2.1. Utilisation d'un peptide synthétique	113
11.2.2. Mesure de la constante d'affinité	113
11.2.3. Test de compétition SRIA	115

DISCUSSION	121
1. CARACTERISATION ET ROLE PROTECTEUR DES ANTIGENES D'EXCRETION-SECRETION DE <i>T. GONDII</i>	122
2. IDENTIFICATION ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES ANTIGENES DES STADES TACHYZOITE ET BRADYZOITE PRESENTANT DES EPITOPES COMMUNS	125
3. UTILISATION DES SONDAS ANTICORPS MONOCLONALES DANS LA MISE EN EVIDENCE DES MECANISMES DE SECRETION	127
4. APPLICATION DIAGNOSTIQUE: IDENTIFICATION ET RECHERCHE D'ANTIGENES CIRCULANTS	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	135
TABLES DES MATIERES	148

