

50376
1990
63

69542

50376
1990
63

N° d'ordre: 517

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE
FLANDRES-ARTOIS**

Thèse présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé

par

Véronique DUQUESNE

**Etude du rôle fonctionnel des
lymphocytes T dirigés contre des
antigènes excrétés-sécrétés par
*Toxoplasma gondii***



Soutenue le 25 Avril 1990

Membres du Jury	Président	: M. J. Montreuil
	Rapporteurs	: M. C. Auriault M. J.F. Dubremetz
	Examineurs	: M. A. Capron Mme G. Spik Mme F. Darcy

L'ensemble de ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'INSTITUT PASTEUR de LILLE (INSERM 167-CNRS 624) sous la direction de Monsieur le professeur André Capron

Je dédie cette Thèse :

A mes parents,

A Didier,

A Isabelle,

A mes amis,

en témoignage de mon affection et de ma profonde
reconnaissance.

A mon directeur de recherches,

Monsieur le Professeur André CAPRON,

Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire et m'avez honorée de votre confiance. Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Docteur Claude AURIAULT,

Qui m'avez accueillie si gentiment au sein de votre groupe de recherches et avez suivi les travaux rapportés dans ce mémoire.
Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon amitié.

A mon président de Thèse,

Monsieur le Professeur MONTREUIL,

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de présider la
soutenance de cette thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde
gratitude.

Je remercie tout particulièrement

Monsieur le Docteur Jean-François DUBREMETZ

Madame le Professeur Geneviève SPIK

Madame le Docteur Françoise DARCY

Qui ont accepté de juger cette thèse.

Qu'ils soient assurés de mon amitié et de ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé par leur soutien à mener à bien ce travail et en particulier les membres du groupe de Claude AURIAULT :

Anne DELANOYE

Catherine VENDEVILLE

Christine MAZINGUE

Françoise COTTREZ

Florence VELGE

Martine DAMONNEVILLE

Véronique PANCRE

Ainsi que :

Christian DROLEZ

Christophe BOUTILLON

Didier DESLEE

Gérard TORPIER

Hélène GRAS-MASSE

Hubert CARON

Isabelle GODARD

Jean-Pierre DECAVEL

Marie-France CESBRON-DELAUW

Pierre BILLAUT

RESUMIE

L'implication de la composante cellulaire dans l'immunité développée au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii* a été largement décrite. Parmi ces cellules, le lymphocyte T apparaît être au centre des mécanismes effecteurs. En effet, un grand nombre d'antigènes sont thymodépendants ; c'est-à-dire qu'ils nécessitent la stimulation de lymphocytes T pour la production d'anticorps. De plus, les lymphocytes T interviennent dans la stimulation d'autres cellules effectrices.

Le rôle des lymphocytes T dans la toxoplasmose a notamment été confirmé par le fait que des rats génétiquement athymiques (ou "Nude") (animaux déficients en lymphocytes T) sont incapables de résister à une infection par *Toxoplasma gondii*, alors que des rats Fischer sont insensibles à cette infection. Parmi les antigènes susceptibles d'induire des mécanismes effecteurs efficaces pour l'élimination du parasite, les antigènes excrétés-sécrétés (ES) par *Toxoplasma gondii* apparaissent comme étant de bons candidats.

Le travail présenté dans ce mémoire montre que le transfert adoptif de lymphocytes T provenant de rats Fischer immunisés avec les antigènes ES induit la survie des rats "Nude"

après l'infection par *Toxoplasma gondii*. De plus, ces cellules cultivées *in vitro* entraînent la production d'anticorps spécifiques chez des rats "Nude" qui sont normalement incapables de développer une réponse humorale. Les molécules reconnues par ces anticorps ont des masses moléculaires de 104, 97, 57, 39, 30, 21 et 18 kDa. Certains de ces antigènes ont été caractérisés comme étant des antigènes ES.

L'étude d'un antigène potentiellement protecteur présent dans les produits d'excrétion a été entreprise. Grâce au clonage de cette molécule de 23 kDa (dont le produit de traduction est de 24 kDa), la synthèse de peptides a permis l'étude épitopique de cet antigène dans différentes situations immunologiques. La détermination d'épitopes T immunodominants lors de l'infection, de l'immunisation par les antigènes ES ou par la construction P24-virus de la Vaccine a entraîné la mise en évidence d'un peptide (le peptide 170-193) capable d'induire après immunisation des lymphocytes T potentiellement protecteurs. Ces lymphocytes T ne peuvent entraîner la production d'anticorps spécifiques comme cela avait été démontré pour les lymphocytes T spécifiques des antigènes ES.

L'ensemble de ce travail montre donc l'implication des antigènes ES dans le développement d'une immunité cellulaire protectrice contre la toxoplasmose. De plus, le peptide 170-193, dérivé de la séquence de la P24, peut éliciter des lymphocytes T pouvant induire la protection de rats "Nude".

INTRODUCTION

La toxoplasmose, maladie généralement bénigne chez l'individu immunocompétent, peut présenter par contre des formes très graves et même mortelles chez les nouveaux-nés contaminés par voie transplacentaire (en France, la toxoplasmose congénitale est l'une des causes principales des anomalies foetales sévères) ainsi que chez les patients présentant un déficit immunitaire sévère (notamment à l'occasion de greffes de moelle osseuse, de transplantations d'organes, ou d'infection par le virus VIH : le SIDA). Chez ces patients, la maladie se déclarerait principalement par une réactivation de kystes toxoplasmiques présents dans les organes soit du malade lui-même, soit du donneur lorsqu'il s'agit d'une transplantation.

L'incidence très lourde de la toxoplasmose à la fois comme maladie congénitale et comme complication fatale chez les patients atteints de SIDA justifie l'intensification des recherches à but immunoprophylactique mais aussi diagnostique.

L'infection par *Toxoplasma gondii*, l'agent pathogène de cette maladie, entraînerait une immunité à la réinfection durable et spécifique tant que le système immunitaire n'est pas atteint. Cette

situation, exceptionnelle chez les parasites en général, a suscité de nombreux travaux visant à obtenir par immunisation des anticorps inhibant la multiplication du parasite. Ces recherches ont abouti à définir les principaux antigènes membranaires et cytoplasmiques de la forme multiplicative du toxoplasme, le tachyzoïte, présent uniquement au cours de la phase aiguë de la maladie.

Au cours d'une infection comme la toxoplasmose, l'organisme hébergeant le parasite se défend en mettant en oeuvre différentes stratégies qui ont pour but l'élimination de l'organisme étranger. Comme la plupart des protozoonoses, la toxoplasmose entraîne une réponse immunitaire où le rôle des lymphocytes T semble être le centre des mécanismes de défense. Ces lymphocytes sont en effet capables, en présence de l'agent étranger, d'être stimulés entraînant ainsi la production et la libération de molécules, les lymphokines, agissant sur d'autres populations cellulaires comme les macrophages, les lymphocytes B, ou l'activation de leurs fonctions effectrices.

Dans notre laboratoire, la participation des lymphocytes T a notamment été démontrée dans la toxoplasmose du rat par l'utilisation d'un modèle animal particulier: le rat génétiquement athymique (Santoro et al., 1987). Les observations faites montraient le rôle protecteur de lymphocytes T non spécifiques, utilisés à des doses importantes et suggèraient leur implication dans la résistance

du rat à la toxoplasmose. Le problème posé était donc de définir quels étaient les antigènes potentiellement protecteurs en utilisant ce modèle expérimental. C'est pour répondre à cette question que nous avons entrepris les travaux décrits dans ce mémoire.

GENERALITES

A- Le parasite : *Toxoplasma gondii*

La découverte de ce parasite fut réalisée en 1908 à l'Institut Pasteur de Tunis par Nicolle et Manceaux. Il s'agit d'un protozoaire qu'ils dénommèrent *Toxoplasma gondii*, *Toxoplasma* par référence à la forme arquée du parasite et *gondii* en raison de l'hôte chez lequel fut découvert ce parasite : le gondi, petit rongeur des régions semi-désertiques du sud tunisien.

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

1- Morphologie du toxoplasme

Le toxoplasme existe sous trois formes : le trophozoïte ou tachyzoïte, le bradyzoïte (forme enkystée) et le sporozoïte (présent dans l'oocyste). Les trois formes correspondent à différents stades d'évolution du parasite.

1-1- Le tachyzoïte (ou trophozoïte)

C'est la forme de multiplication intracellulaire du parasite, elle n'est présente qu'au moment de la phase aiguë de la maladie. Le tachyzoïte se présente sous forme d'un élément arciforme, mesurant 6 à 8 μm de long et 2 à 3 μm de large (Figure 1A), dont l'un des pôles est plus effilé que l'autre. Le tachyzoïte comporte un système complexe, constitué des rhoptries (organites en forme de massue), de microtubules, de micronèmes et du conoïde, qui constituerait l'appareil de pénétration. En microscopie électronique, le tachyzoïte présente une double membrane régulière et continue. Le parasite possède un noyau et un cytoplasme où sont présents notamment un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des mitochondries de type tubulaire et des granules denses.

Le développement du tachyzoïte est toujours intracellulaire (et concerne toute cellule à l'exception des cellules non nucléées du sang) (Figure 1B). L'entrée du parasite dans les cellules a fait l'objet de nombreuses études (Jones et al., 1972; Steriu et Dunareanu, 1976; Lycke et al., 1975; Aikawa et al., 1977; Nichols et al., 1983). Le rôle des rhoptries dans la pénétration du parasite a été décrit (Nichols et al., 1983; Norrby and Lycke, 1967; Lycke et al., 1975; Norrby, 1971; Schwartzman, 1986). La multiplication est rapide et se fait par endodyogénie (Goldman et al., 1958). Elle aboutit à l'éclatement de la cellule-hôte libérant des formes libres capables

FIGURE 1: Différentes formes du parasite *Toxoplasma gondii* vues en microscopies électroniques :

(A)- Le parasite (tachyzoïte) apparaît bordé d'une double membrane (M). On peut notamment remarquer sur ce cliché, le noyau (N) souvent central, les rhoptries (R), des granules denses (GD). Cette forme libre ne peut être observée que lors de la phase aiguë de la maladie.

(B)- Après leur pénétration dans la cellule hôte, les tachyzoïtes ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une vacuole parasitophore (VP)

(Ch) cytoplasme de la cellule hôte

(Nh) noyau de la cellule hôte.

(C)- La phase chronique de la maladie est caractérisée par la présence de formes kystiques. Le kyste, délimité par une membrane (MK), peut contenir des centaines de bradyzoïtes (B) : forme de latence du parasite. On peut noter le peu de différences entre les deux formes tachyzoïte et bradyzoïte. Les bradyzoïtes sont cependant plus petits en taille, ont généralement un noyau (N) situé dans la partie postérieure, possèdent des granules de polysaccharides (GP) qui sont peu présents ou absents du tachyzoïte.

(échelle : 1 μ m)

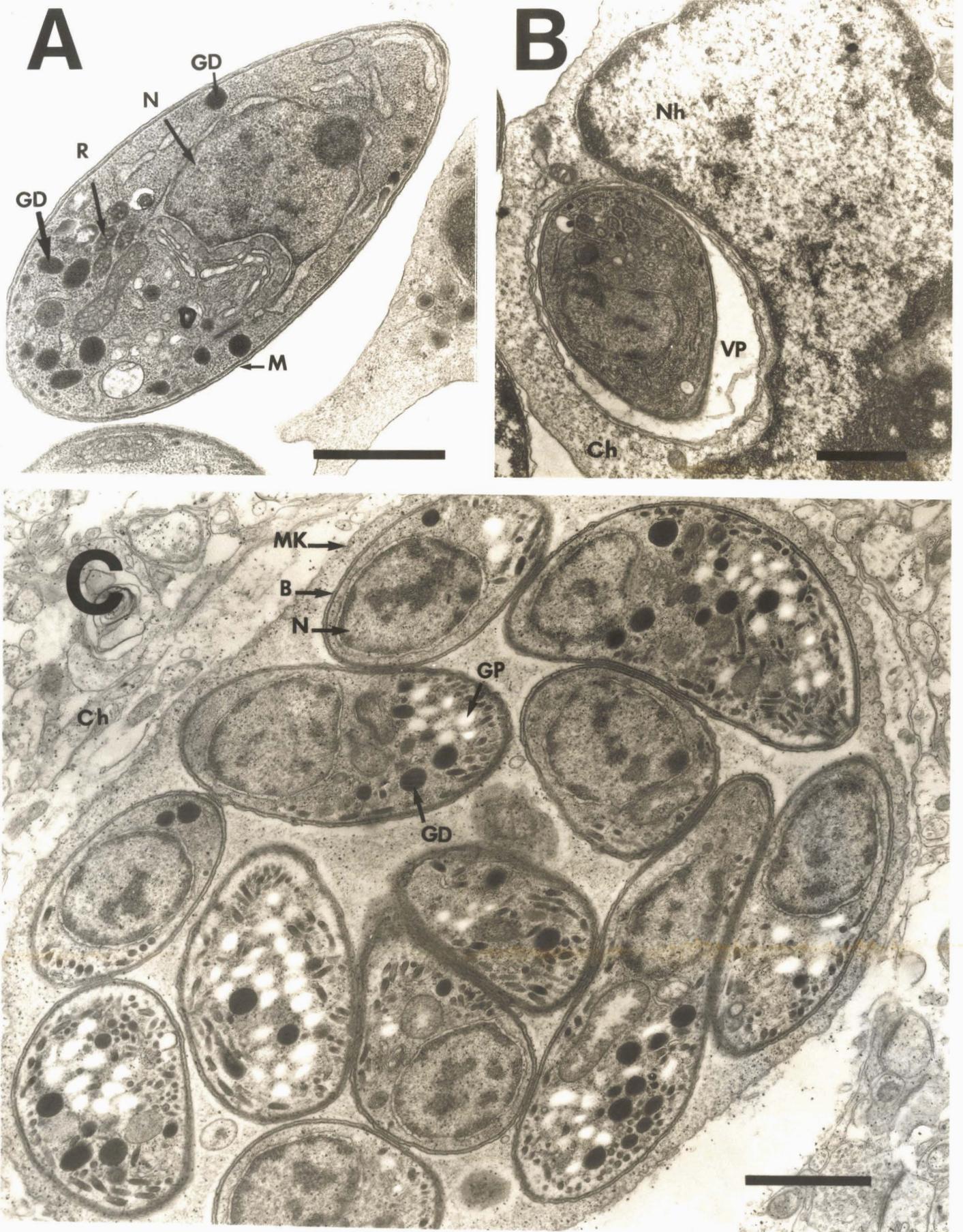


FIGURE 1

formes libres capables de réinfecter de nouvelles cellules.

Les tachyzoïtes étant des éléments très fragiles détruits par les sucs digestifs, ils ne sont donc pas impliqués dans la contamination par ingestion de viande contaminée. Les tachyzoïtes sont également détruits en présence de complément par les anticorps circulants, lorsqu'ils sont transitoirement extracellulaires. Ceci explique leur présence et leur multiplication uniquement au moment de la phase aiguë de la maladie, la réponse immunitaire étant encore très faible.

1-2- Les kystes (Figure 1C)

Ce sont des éléments sphériques ou ovoïdes, mesurant de 15 à 200 μm de diamètre. Les kystes sont délimités par une membrane d'origine parasitaire et cellulaire, et renferment plusieurs centaines de parasites tassés les uns sur les autres. Ces parasites sont plus petits que les tachyzoïtes et sont appelés bradyzoïtes. Leur multiplication est lente par rapport à la forme multiplicative, le tachyzoïte. Les kystes sont présents lors de la phase chronique de la maladie. Lors de l'apparition des anticorps chez l'individu, les parasites migrent vers les tissus pauvres en anticorps où ils formeront des kystes. Ces derniers se trouvent donc essentiellement dans le cerveau, le coeur, les muscles squelettiques

et au niveau de l'oeil (Remington et Cavanaugh, 1965). Dans la plupart des cas, il n'y a pas de réaction inflammatoire autour de ces kystes. Cependant, certains de ces éléments libèrent probablement de faibles quantités d'antigènes parasites qui seraient responsables de l'immunité protectrice et définitive existant dans la toxoplasmose.

Contrairement aux tachyzoïtes, les kystes sont des formes résistantes. Ils supportent sans dommage des températures de 45°C et résistent aux sucs gastriques, ce qui explique leur rôle dans la contamination par ingestion d'aliments parasités (Desmonts et al., 1965). Le kyste joue donc un triple rôle, dans la contamination, dans l'entretien de l'immunité, ainsi que dans l'apparition de manifestations pathologiques comme les chorioretinites lors de la rupture de kystes. Un quatrième rôle est attribué aux kystes, celui de la contamination par transplantation d'organes (coeur).

1-3- L'oocyste (Figure2)

Les oocystes n'ont été décrits que chez les félidés et en particulier chez le chat (Frenkel et al., 1970; Hutchinson et al., 1970). Comme les kystes, ce sont des formes de résistance. Ils résultent d'une reproduction parasitaire sexuée, intervenant uniquement chez le chat qui est considéré comme l'hôte définitif de *Toxoplasma gondii*. L'oocyste est éliminé dans les fèces du chat et subit une

L'OOCYSTE

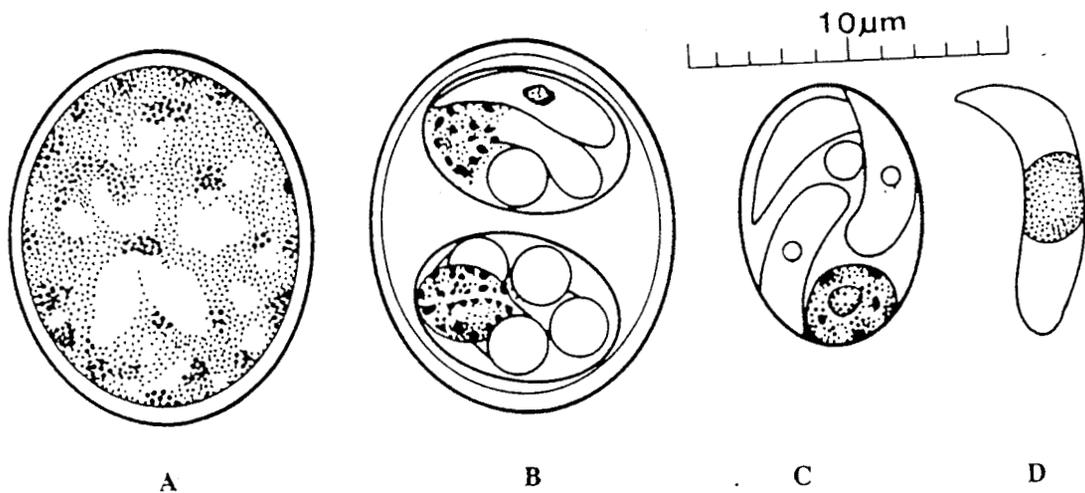


FIGURE 2 : Dessins d'oocystes, de sporocystes et de sporozoïtes de *Toxoplasma gondii* :

- (A) Oocyste non sporulé
- (B) Oocyste sporulé avec 2 sporocystes contenant les sporozoïtes
- (C) Sporocyste avec les sporozoïtes et une masse résiduelle
- (D) Sporozoïte avec son noyau

(Dubey, J.P. and Beattie, C.P., 1988, in *Toxoplasmosis of animals and man*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 14)

maturation dans le milieu extérieur. Sous certaines conditions (humidité), il est le siège d'une sporulation donnant naissance à la forme infestante, le sporozoïte.

2- Le cycle évolutif (Frenkel 1973)(Figure 3)

2-1- Evolution chez l'hôte définitif: le chat (Frenkel, 1973; Golvan, 1983)(Figure 4)

Chez le chat interviennent à la fois la reproduction sexuée (gamogonie) et la reproduction asexuée (schizogonie). Le chat s'infeste soit par des oocystes soit par des kystes (provenant de rongeurs ou d'oiseaux parasités). Les parasites vont donner naissance, au niveau des cellules de l'intestin, à des microgamètes mâles et des macrogamètes femelles dont la fusion conduira à la formation d'un oocyste qui sera éliminé avec les fèces du chat (Frenkel et al., 1970; Dubey et al., 1970). L'oocyste n'atteint sa maturité qu'après un séjour dans le milieu extérieur aboutissant à la sporulation. Les deux sporocystes formés contiennent chacun 4 sporozoïtes qui constituent une des principales sources d'infestation pour les hôtes intermédiaires.

CYCLE DE LA TOXOPLASMOSE

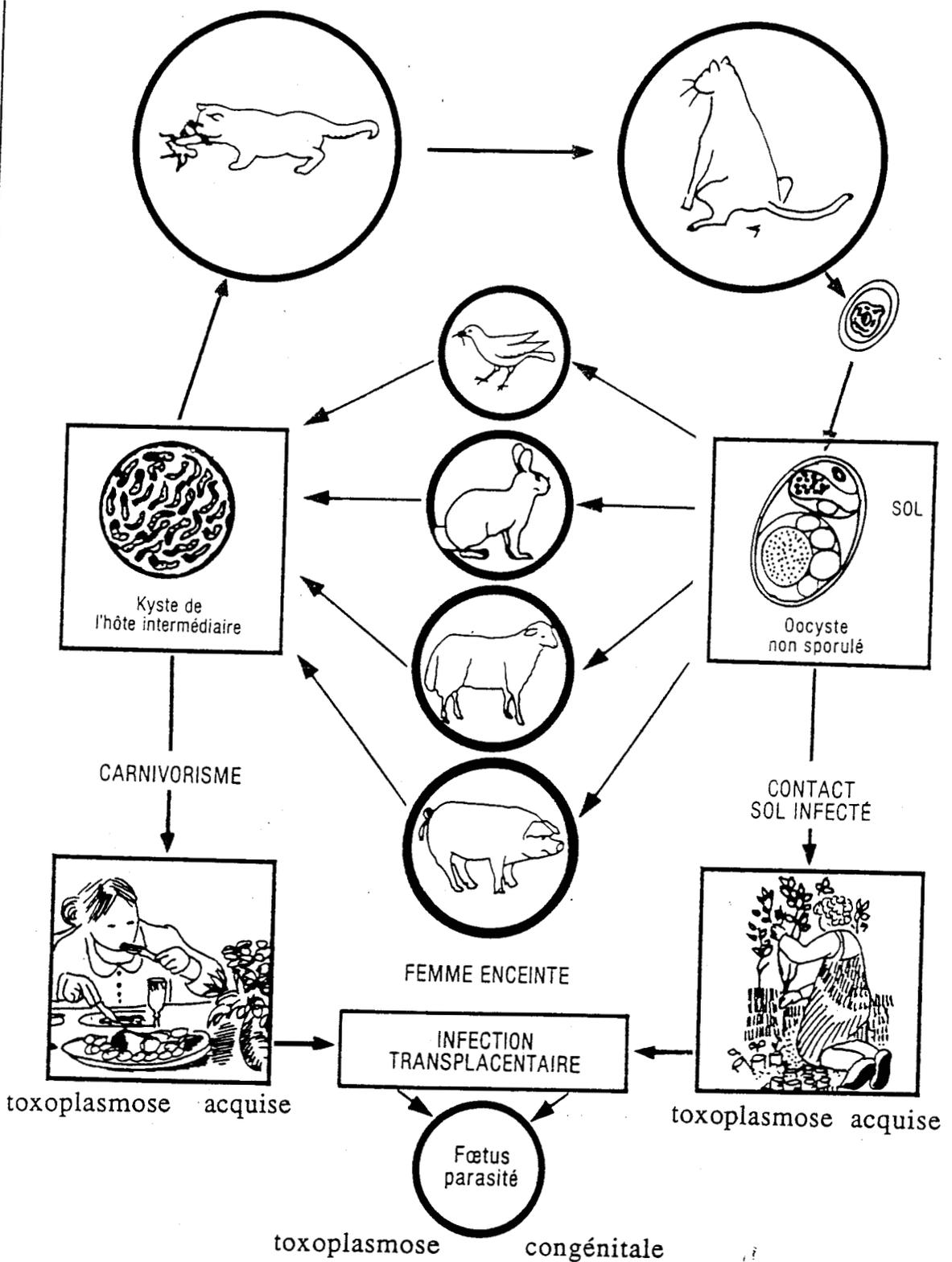


FIGURE 3

(d'après Mollaret H.H. et Affre P., 1980, Le bestiaire Médical. Ed. Med. Fournier Frères. p.37)

CYCLE DE *TOXOPLASMA GONDII* CHEZ LE CHAT

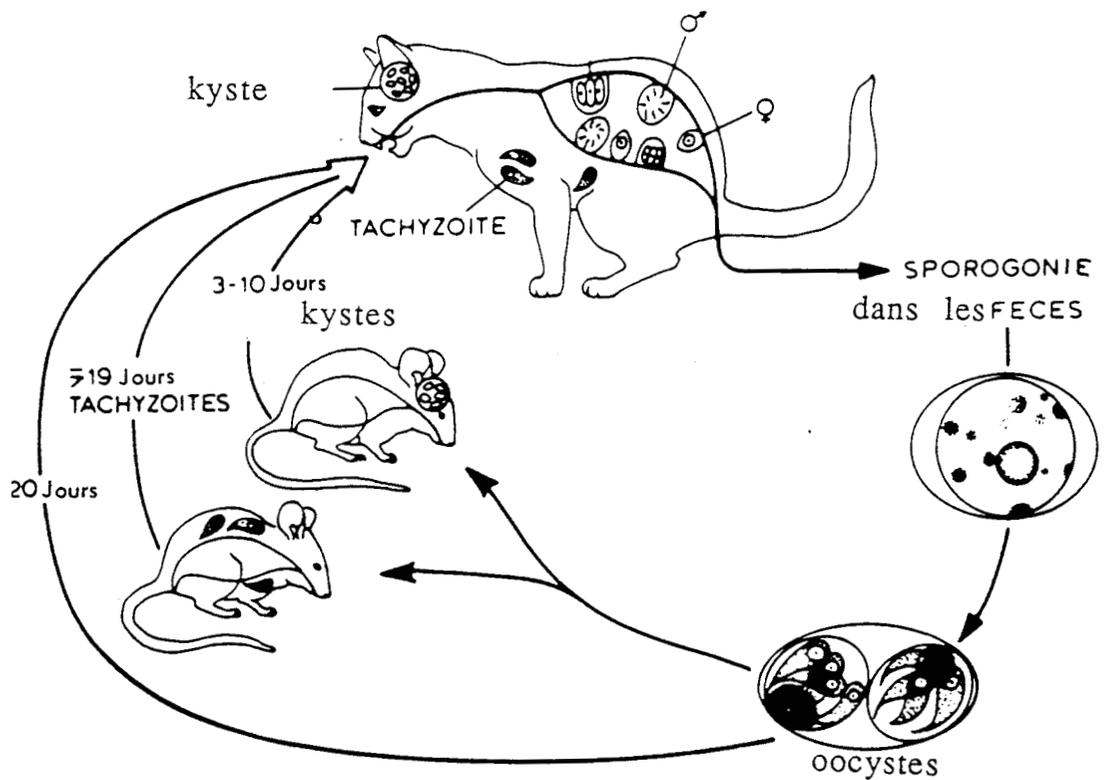


FIGURE 4

(d'après Dubey, J.P. and Beattie, C.P., 1988, in *Toxoplasmosis of animals and man*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p.10)

2-2- Evolution chez l'hôte intermédiaire

L'hôte intermédiaire (homme, mammifères, oiseaux) se contamine essentiellement par la voie digestive en ingérant des kystes toxoplasmiques (contenu dans la chair parasitée) ou des oocystes (dans des aliments souillés). Cependant une autre voie de contamination est la voie transplacentaire que nous préciserons plus loin.

Après digestion de la membrane du kyste ou de celle de l'oocyste, les formes infestantes (bradyzoïte, sporozoïte) sont libérées dans l'intestin. Elles pénètrent dans les cellules du système "réticulo-endothélial" et s'y multiplient activement (forme tachyzoïte) : c'est l'endodyogénie (Goldman et al., 1958). L'endodyogénie constitue le mode de division particulier par lequel deux cellules-filles se forment à l'intérieur d'une cellule-mère (Dubey et al., 1970).

Cette multiplication des tachyzoïtes est un phénomène très bref. En effet, au bout de quelques jours, l'apparition des anticorps circulants empêche le passage des tachyzoïtes d'une cellule à une autre. Les tachyzoïtes échappant aux anticorps vont s'enkyster ce qui correspond à la phase chronique de la maladie.

B- La toxoplasmose

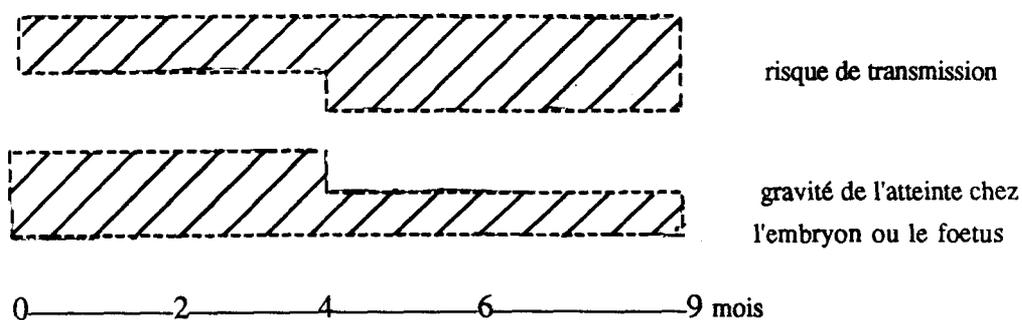
Il est d'usage de distinguer la "toxoplasmose acquise" pour laquelle la contamination s'est faite après la naissance, de la "toxoplasmose congénitale" pour laquelle l'infection du fœtus a lieu au cours de la grossesse.

1- La toxoplasmose acquise

Comme il a été dit précédemment, l'homme se contamine généralement en ingérant soit des kystes (viandes parasitées), soit des oocystes (aliments souillés). La toxoplasmose est souvent asymptomatique et a une traduction uniquement sérologique. Parmi les formes apparentes, la plus fréquente est la forme lymphatique ressemblant à la "mononucléose infectieuse". La guérison est en général spontanée.

2- La toxoplasmose congénitale (Remington et Desmonts, 1976)

La toxoplasmose congénitale résulte du passage de toxoplasmes à travers le placenta. Une toxoplasmose contractée en cours de grossesse n'entraîne pas forcément une toxoplasmose chez le fœtus. En fait, la gravité de l'atteinte du fœtus va dépendre du moment où la mère est contaminée pendant la grossesse (Figure 5, d'après Ambroise-Thomas et Garin, 1984).



Lorsque la mère contracte la maladie en début de grossesse, il peut y avoir avortement spontané. Le risque de contamination est plus grand après le quatrième mois de grossesse, le placenta devenant plus perméable et parfois fissuré. A l'inverse, la gravité de la toxoplasmose congénitale est plus grande si la transmission se produit pendant les quatre premiers mois. La contamination du fœtus peut conduire à des lésions neurologiques et oculaires graves.

3- La toxoplasmose des sujets immunodéprimés

La toxoplasmose acquise, maladie généralement bénigne pour l'homme immunocompétent, peut devenir grave et même mortelle chez les patients présentant un déficit immunitaire sévère. C'est le cas des sujets immunodéprimés subissant une greffe et des sujets atteints du SIDA.

En effet, l'immunité cellulaire et humorale semblent assurer le contrôle de l'infection qui reste latente au stade chronique. Un déséquilibre ou une altération des fonctions immunitaires peuvent avoir des conséquences graves, en facilitant une dissémination du parasite lors de la primo-infection ou en permettant une réactivation d'une infection latente. On observe alors des formes cliniques sévères avec des atteintes principalement cérébrales, cardiaques, pulmonaires et oculaires.

Dans le cas de greffés de moëlle, tous les cas de toxoplasmose grave observés sont survenus chez des malades séropositifs avant la greffe avec une incidence particulièrement élevée lorsque le donneur est séronégatif (Derouin et al., 1986).

Contrairement à la greffe de moëlle, lors d'une transplantation cardiaque le risque majeur est celui de la transmission de la toxoplasmose par le transplant d'un donneur séropositif chez un receveur séronégatif (Luft et al., 1983). Le risque est plus important que dans les autres transplantations, car les toxoplasmes s'enkystent

préférentiellement dans les muscles striés et dans le coeur.

En ce qui concerne les sujets atteints de SIDA, l'encéphalite par toxoplasme est présente chez environ 25 % des patients à Berlin, Bruxelles et Paris, et chez environ 5 à 10% au Etats-Unis (Mc Cabe et Remington, 1988). En général elle semble correspondre à une réactivation d'infection chronique plutôt qu'à une primo-infection. Chez la plupart de ces patients, il n'y a pas de corrélation entre le taux en anticorps IgG anti-toxoplasme et les atteintes toxoplasmiques. Quant aux anticorps IgM, ils ne sont en général pas détectable. Le diagnostic est souvent difficile car les arguments sérologiques font généralement défaut (Luft et al., 1984-1, Israelski et Remington, 1988).

C- L'immunité

La réponse immunitaire induite par *Toxoplasma gondii* est complexe et implique des mécanismes humoraux aussi bien que cellulaires. L'importance relative de ces deux composantes dépend essentiellement de l'hôte infecté. Plusieurs modèles expérimentaux sont utilisés afin de mieux appréhender l'immunité développée au cours de la toxoplasmose. Ces modèles (souris, hamster, cobaye, rat) se comportent différemment vis-à-vis d'une infection par *Toxoplasma gondii*.

1- L'immunité à médiation humorale

Le diagnostic de la toxoplasmose est basé sur la présence d'anticorps anti-toxoplasme, donc sur la réponse humorale dirigée contre *Toxoplasma gondii*.

Sabin et Felman en 1948 montrent les premiers que des

Sabin et Felman en 1948 montrent les premiers que des sérums de patients infectés sont capables de lyser les toxoplasmes en présence de complément. Cette réaction appelée "DYE-TEST" a longtemps été utilisée en diagnostic et est encore appliquée dans certains laboratoires de référence.

De plus, les tachyzoïtes recouverts de ces anticorps sont encore capables de pénétrer dans les cellules mais il y a alors fusion du phagosome (ou vacuole parasitophore) avec les lysosomes, entraînant ainsi la destruction du parasite (Anderson et al., 1976-1; Hauser et Remington, 1981). En absence d'anticorps, il y a inhibition de cette fusion, permettant ainsi la multiplication du parasite dans le phagosome.

De nombreuses équipes ont étudié le rôle des anticorps dans l'immunité contre la toxoplasmose. Le modèle expérimental le plus utilisé est le modèle murin. Il a ainsi pu être démontré que malgré une action très efficace *in vitro* des anticorps sur les tachyzoïtes, *in vivo* le transfert passif des sérums immuns ne confère qu'une légère résistance voire pas de résistance du tout contre une infection avec une souche virulente de toxoplasmes (Foster et Mc Culloch, 1968; Gill et Prakash, 1970; Johnson et al., 1983). Cependant chez la souris le transfert passif d'anticorps monoclonaux dirigés contre certains antigènes du toxoplasme (Johnson et al., 1983; Sharma et al., 1984) a pu aboutir à une protection contre une souche de virulence modérée

Chez le rat, le rôle protecteur des anticorps a pu être mis en évidence par transfert passif en utilisant le modèle du rat "Nude", susceptible à l'infection (Darcy et al., 1988). Cette approche concerne non plus les antigènes de surface mais les antigènes excrétés-sécrétés par le parasite: antigènes ES. Le transfert passif de sérums de rats Fischer euthymiques immunisés par ces antigènes aux rats "Nude" induit un retard significatif de la mortalité.

Le rôle des anticorps d'isotypes IgE dans cette protection a été démontré: en effet, les rats "Nude" présentent une survie moins prolongée après transfert passif de sérums de rats immunisés par les antigènes ES, lorsque ces sérums sont épuisés en IgE (Ridel et al., 1988). Ces différentes expériences suggèrent que le rôle des anticorps dans la résistance semble important mais qu'ils ne suffisent pas à eux seuls à engendrer une immunité protectrice totale contre la toxoplasmose.

2- L'immunité à médiation cellulaire

L'immunité à médiation cellulaire joue un rôle important dans la majorité des infections parasitaires, en particulier contre la réinfection (Cohen et Warren, 1982).

2-1- Phénomène d'hypersensibilité retardée

L'existence d'une réponse cellulaire dans la toxoplasmose a été montrée la première fois par la présence d'un état d'hypersensibilité retardée (HSR) (Frenkel, 1948) consécutif à l'infection par *Toxoplasma gondii*. La mise en évidence *in vivo* et *in vitro* d'une HSR chez le cobaye infecté peut se faire une semaine après l'infection (Tremonti et Walton, 1970; Krahenbuhl et al., 1971).

Au contraire, la capacité chez l'homme à éliciter une HSR contre les antigènes de *Toxoplasma gondii* apparaît des mois, voire des années après le développement de l'infection initiale (Frenkel, 1949; Jacob, 1956; Remington et al., 1960; 1962). C'est la raison pour laquelle chez l'homme l'utilisation d'un test cutané basé sur l'HSR ne peut permettre la détection d'une toxoplasmose que lors de la phase chronique de la maladie. De nombreuses équipes se sont donc focalisées sur le type de cellules impliquées et sur les mécanismes aboutissant à cette réaction.

2-2- Le rôle des lymphocytes

L'évidence d'une réponse immunitaire faisant intervenir les lymphocytes et plus particulièrement les lymphocytes T s'est largement vérifiée par de nombreuses études en particulier chez l'homme, la souris, le cobaye et le hamster. Le modèle expérimental néanmoins le plus utilisé est, là aussi, le modèle murin. Alors que la

toxoplasmose chez la souris athymique ("Nude") entraîne fatalement la mort de l'animal, le transfert passif de cellules thymiques permet à six souris "Nude" sur huit de survivre à l'infection (Lindberg et Frenkel, 1977).

Le rôle de la réponse cellulaire chez la souris a été longtemps controversé. En effet, certains auteurs montrent que l'infection entraîne une diminution de la réponse anticorps thymodépendante (Strickland et al., 1973). D'autres travaux concernant l'étude de la réponse lymphocytaire au cours de la toxoplasmose sont contradictoires. En effet, Strickland et al. en 1975 et McLeod et al. en 1982 montrent, soit une diminution de la réactivité cellulaire, soit un maintien de cette réactivité vis-à-vis de mitogènes T. Goyal et al. (1986) démontre que la réponse lymphocytaire spécifique de l'antigène est augmentée dans l'infection chronique par rapport à l'infection aiguë.

Des études plus fines montrent que la sous-population T $L_3T_4^+$ (marqueur des lymphocytes T "helper" chez la souris) est responsable de la prolifération observée vis-à-vis de l'antigène et que cette sous-population serait régulée par les lymphocytes B (Brinkmann et al., 1986). La même équipe a pu montrer que le transfert passif de lymphocytes T provenant de souris "immunisées" par une souche mutante Ts4 de *Toxoplasma gondii* est capable de protéger des souris receveuses contre l'infection par une souche plus virulente de

Toxoplasma gondii. De plus, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes sous-populations T, le rôle des lymphocytes T lyt 2⁺ (type cytotoxique/suppresseur) et des lymphocytes T L3T4⁺ (type "helper") a pu être mis en évidence (Suzuki et Remington, 1988).

Le rôle des lymphocytes T dans la protection contre la toxoplasmose murine semble être applicable à d'autres modèles comme le cobaye ou le hamster (Frenkel, 1967; Pavia, 1986-1;1986-2; Reyes et Frenkel, 1987).

Chez l'homme, l'étude de la réactivité lymphocytaire montre que :

- * chez certains sujets, une réponse est détectée un à trois mois après l'infection, mais est présente chez l'ensemble des sujets à partir de neuf à douze mois (Maddison et al., 1979; Anderson et al., 1979).

- * les cellules de patients en phase chronique répondent mieux à l'antigène que celle des personnes séronégatives. De plus, il n'y a pas de corrélation possible entre le taux de prolifération et celui des anticorps titré par Dye-test (Krahenbuhl et al., 1972).

- * il existe une suppression de la réponse cellulaire vis-à-vis de certains antigènes de *Toxoplasma gondii* chez la plupart des patients atteints d'une toxoplasmose aiguë (Anderson et al., 1977; Luft et al., 1984). Cette absence de réponse lymphocytaire a été observée

lors d'un cas de toxoplasmose congénitale. Cette anergie lymphocytaire est antigène spécifique et disparaît lorsque l'enfant atteint l'âge de un an (McLeod et al., 1985). Le rôle suppresseur des cellules adhérentes, type macrophages (Luft et al., 1988; Suzuki et al., 1984) et des cellules T (Chan et al., 1986; Luft et al., 1988) a pu être démontré dans la réponse lymphocytaire.

Parmi les études faites sur la réponse cellulaire, Khan et al. (1988) montrent qu'il pouvait y avoir induction de cellules T cytotoxiques spécifiques d'antigène. Dans ce cas présent, il s'agit de l'antigène de surface P30, ces cellules sont directement cytotoxiques, sans activation préalable par des anticorps ou lymphokines.

2-3- Le rôle des macrophages

Comme dans toutes les infections intracellulaires, le macrophage apparaît être la cellule majeure de l'immunité cellulaire. En effet, elle intervient en fin de réaction après avoir été activée soit par les anticorps, soit par les lymphokines (Remington et al., 1972). Les anticorps sont capables de rendre les macrophages actifs dans leur fonction de cytolysse (Anderson et al., 1976-1). De nombreux travaux ont montré le rôle des lymphokines dans l'activation du macrophage (Borgues et Johnson, 1975; Anderson et al., 1976-2; Sibley et al., 1985; Hugues et al., 1987). Parmi les lymphokines, l'interféron γ peut inhiber la croissance intracellulaire de *Toxoplasma in vitro*

(Pfefferkorn, 1984; Black et al., 1987; Murray et al., 1985; Suzuki et al. 1988) et induire une protection partielle *in vivo* (Mc Cabe et al. 1984; Suzuki et al. 1988).

2-4- Les autres cellules activées lors de l'infection

Parmi les autres cellules intervenant dans l'immunité contre la toxoplasmose, les cellules dites Natural Killer (NK) semblent contrôler le parasitisme. En effet, des cellules NK provenant de rates de souris infectées par *Toxoplasma gondii* (au 3ème jour: infection aiguë) ont une plus grande cytotoxicité vis-à-vis de toxoplasmes extracellulaires que les cellules NK provenant d'animaux contrôles non infectés (Hauser et Van Tsai, 1986; Goyal et al., 1988).

Très récemment, l'étude des cellules NK et LAK (lymphokine activated killer) chez l'homme, par la méthode de marquage et relarguage du ^{51}Cr a montré que (Dannemann et al., 1989):

- le fait d'activer les cellules NK soit par de l'IL₂ recombinante (rIL₂), soit par de l'interféron γ recombinant (rIFN γ) n'augmente pas la lyse des tachyzoïtes. Les cellules LAK ont quant à elles, une fonction lytique augmentée quand elles sont mises en présence de tachyzoïtes préincubés avec des anticorps spécifiques.
- des cellules NK fraîchement récoltées ou activées *in vitro* par rIL₂ ou rIFN γ n'augmentent pas la lyse des tachyzoïtes, que ceux-ci soient

préincubés ou non avec des anticorps spécifiques. Par contre les cellules LAK, en présence de sérum humain, sont cytotoxiques pour des tachyzoïtes non opsonisés.

De plus, ni les cellules NK, fraîchement recoltées ou activées (rIL-2, rIFN γ) ni les cellules LAK ne présentent d'activité cytotoxique vis-à-vis d'une préparation de kystes toxoplasmiques.

Ce chapitre montre que les anticorps ne peuvent suffire à enrayer l'évolution de la maladie et que la composante cellulaire apparaît être un facteur crucial mais aussi très complexe dans l'immunité développée contre la toxoplasmose.

D-Les antigènes

L'isolement puis la caractérisation des antigènes toxoplasmiques sont très importants pour l'étude de la réponse immune vis-à-vis du parasite (c'est-à-dire l'étude des antigènes cibles), la mise au point de nouveaux tests de diagnostic, ainsi que dans la perspective de l'élaboration d'un vaccin. La plupart des études faites sur les antigènes de *Toxoplasma gondii* se sont surtout focalisées sur les antigènes somatiques (cytoplasmiques ou membranaires) (Hugues et al., 1985) et plus récemment sur les antigènes présents dans les rhoptries (Sadak et al., 1988) et les antigènes excrétés-sécrétés activement par le parasite.

1- Les antigènes somatiques

Plus de 1000 protéines parasitaires ont pu être identifiées en électrophorèse bidimensionnelle après marquage des toxoplasmes à la méthionine ^{35}S . Environ 70 protéines sont précipitables par des

électrophorèse bidimensionnelle après marquage des toxoplasmes à la méthionine ^{35}S . Environ 70 protéines sont précipitables par des sérums provenant de souris infectées (Handman et al., 1980). La première analyse biochimique des antigènes de surface de *Toxoplasma gondii* a été réalisée à l'aide d'un immun sérum et d'anticorps monoclonaux (Handman et al., 1980) par immunoprécipitation des antigènes radioiodés. Quatre antigènes majeurs ont été caractérisés dont les masses moléculaires apparentes sont de 43, 35, 27, 14 kDa. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface, a également permis de confirmer la présence d'antigènes (Couvreur et al., 1988) majeurs de 43, 35, 30 et 22 kDa, et de caractériser un nouvel antigène de poids moléculaire 23 kDa.

La caractérisation et l'identification de l'antigène majeur de surface de *Toxoplasma gondii* ont été décrites. Cet antigène, de masse moléculaire d'environ 30 kDa, est une protéine de surface reconnue par des sérums humains antitoxoplasme (Kasper et al., 1983). Cet antigène a été purifié et ses capacités à induire une immunité protectrice étudiées (Kasper et al., 1985). Des souris immunisées avec l'antigène purifié, puis infectées, montrent une augmentation significative de la mortalité corrélée avec une augmentation du nombre de kystes cérébraux. Vu son intérêt diagnostique, cet antigène de surface a pourtant fait l'objet de nombreux travaux (Rodriguez et al., 1985; Dubremetz et al., 1985; Santoro et al., 1986) et a été cloné récemment

D'autres études montrent que des antigènes de poids moléculaire apparent 58 et 28 kDa (Sharma et al., 1984; Sibley et Sharma, 1987) ou les anticorps monoclonaux dirigés contre ces mêmes antigènes (Sharma et al., 1984) ainsi que des molécules de 35 et 14 kDa (Johnson et al., 1983) peuvent protéger la souris contre une infection avec une souche de virulence atténuée de *Toxoplasma gondii*.

2- Les antigènes Excrétés-Sécrétés (ES)

Dans la schistosomiase, les antigènes excrétés-sécrétés ont été étudiés (Damonville et al., 1986) et ils présenteraient un intérêt immunoprophylactique (Capron et Dessaint, 1988). Le rôle d'antigènes excrétés-sécrétés par le parasite dans la toxoplasmose n'a été suggéré que très récemment. Ces antigènes, encore peu explorés, semblent néanmoins jouer un rôle fondamental dans l'immunité développée. En effet, ces molécules constituent la majeure partie des antigènes circulants présents en début d'infection et sont donc par ce fait les premiers à être exposés au système immunitaire (Hugues et Van Knapen, 1982). D'autre part, la stimulation lymphocytaire vis-à-vis de tels antigènes est plus importante que celle induite par des antigènes somatiques de tachyzoïtes (Hugues et al., 1985).

En fait il faut distinguer deux sortes d'antigènes excrétés-sécrétés :

- * les exoantigènes qui sont récoltés dans le surnageant de cultures cellulaires infectées (Desgeorges et al., 1980; Chumpitazi et al., 1983; 1987; Roques et al., 1986);

- * les antigènes excrétés-sécrétés par le parasite dans un milieu acellulaire (que nous appellerons antigènes ES ou ESA). Dans cette technique, les tachyzoïtes mis en présence de sérum décomplémenté relarguent des molécules dans le milieu extérieur (Darcy et al., 1988). Ces travaux ont conduit à la mise au point des conditions "standard" d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes (Figure 6), ainsi qu'à la première caractérisation des antigènes ES (Figure 7). Parallèlement, des anticorps monoclonaux ont été produits dans notre laboratoire. Trois anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes ES de 28.5, 27 et 21 kDa montrent leur localisation dans la matrice des granules denses des tachyzoïtes ainsi que leur association au réseau présent dans la vacuole parasitophore (Charif et al., 1990), ce qui implique que ces trois antigènes sont réellement sécrétés et permet d'établir le mécanisme de sécrétion des tachyzoïtes.

Le rôle de ces antigènes dans l'immunité a été démontré chez le rat "Nude", comme nous l'avons vu dans le chapitre "Immunité à médiation humorale", par le transfert d'anticorps dirigés contre ces

**BILAN DES ANTIGENES ES (MARQUES A LA METHIONINE
³⁵S) RECONNUS PAR DIFFERENTS SERUMS
(DARCY et al. 1988, DECOSTER et al. 1988)**

HUMAIN chronique	SOURIS chronique	SOURIS anti-ES	RAT infecté	RAT anti-ES	RAT "NUDE" infecté
(185 000)		185 000			
(170 000)	(170 000)	170 000			
(155 000)	(155 000)	155 000			
108 000	108 000	108 000	108 000	108 000	108 000
97 000	97 000	97 000	97 000	97 000	97 000
86 000	86 000				
69 000	69 000	69 000			69 000
60 000	60 000	60 000			
57 000	57 000	57 000	57 000		57 000
(49 000)					
(46 000)	46 000		46 000	46 000	
42 000	42 000	42 000	42 000	42 000	42 000
39 000	39 000	39 000	39 000	39 000	39 000
(34 000)					
28 500	28 500	28 500	28 500	28 500	28 500
27 000 (P24)	27 000				
26 000					
(21 000)	(21 000)	21 000	21 000		

Anticorps Monoclonaux (Charif H. et al., sous presse):

1) TG 17-179	28 500
2) TG 17-42	27 000 (P24)
3) TG 17-113	21 000

FIGURE 7

virulente RH de *Toxoplasma gondii*. Le rôle protecteur des antigènes ES a été également démontré chez la souris par immunisation directe avant l'infection par voie orale par 1200 kystes de la souche 76K. Deux cent jours après l'infection, 70% des souris immunisées survivaient, alors que les souris non immunisées étaient mortes entre 9 et 13 jours après l'infection (Darcy, comm. personnelle). Leur intérêt dans le diagnostic de la toxoplasmose humaine a par ailleurs été récemment démontré (Decoster et al., 1988).

Une troisième catégorie d'antigènes "sécétés" : les antigènes de rhoptries sont étudiés depuis peu. Ces molécules issues des rhoptries semblent être impliquées dans l'invasion de la cellule-hôte (Nichols et al., 1983; Sadak et al., 1988). Des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de rhoptries de 60 et 43 kDa ont été décrits par Schwartzman et Krug en 1989. Deux autres antigènes de 60 et 55 kDa présent au niveau des rhoptries, ont été récemment localisés dans les trois stades du toxoplasme : tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte (Sadak et al., 1988).

E-L'antigène P24 et ses peptides

Les critères que nous avons utilisés pour la sélection d'antigènes potentiellement protecteurs sont les suivants:

- ➔ Présence dans les antigènes ES, en raison de leur pouvoir protecteur observé dans 2 modèles expérimentaux différents (souris et rat "Nude");
- ➔ Reconnaissance par des sérums humains de phase chronique, lorsque l'immunité protectrice est établie (Decoster et al., 1988);
- ➔ Antigènes présentant des épitopes exprimés à la fois au stade tachyzoïte, forme proliférative présente au cours de l'infection aiguë et responsable de l'induction de l'immunité, et au stade bradyzoïte, présent au cours de l'infection chronique et responsable du maintien de l'immunité protectrice (concept de l'immunité de prémunition, Capron et Dessaint, 1988).

Un antigène ES a donc été cloné en suivant une stratégie basée sur ces concepts: les produits de traduction des ARN messagers des tachyzoïtes ont été immunoprécipités par un sérum de lapin immunisé par les antigènes ES. Une bande majeure correspondant à un polypeptide de 24 kDa (P24) est observée. De plus, un extrait antigénique de bradyzoïtes est capable d'inhiber la fixation des anticorps anti-antigènes ES de ce produit de traduction. Cette molécule est reconnue également par des sérums humains recueillis en phase chronique et pas par ceux de phase aiguë ou subaiguë. Le clonage du gène codant pour la P24 a donc été réalisé (Cesbron-Delauw et al., 1989-1)(Figure 8).

Afin d'identifier la molécule native correspondant à la protéine clonée, des sérums de souris anti-P24 recombinante ont été produits. Ces sérums immunoprécipitent une molécule de 23 kDa parmi les antigènes ES marqués à la méthionine ^{35}S . Par contre, la molécule de 23 kDa n'induit pas la production d'anticorps chez le rat Fischer. D'autre part, la protéine recombinante est reconnue par un anticorps monoclonal TG 17-43 (Charif, comm. personnelle). Il a pu être démontré en microscopie électronique que cet antigène est présent au niveau des granules denses des tachyzoïtes et des bradyzoïtes, ainsi que dans la vacuole parasitophore après invasion des cellules hôtes (Figure 9).

**STRATEGIE DE CLONAGE
DE L'ANTIGENE DE 23 kDa**

**1)- CONSTRUCTION D'UNE BANQUE D' ADNc DANS LE VECTEUR
D'EXPRESSION LAMBDA gt 11**



2 MILLIONS DE RECOMBINANTS

**2)- PREMIER CRIBLAGE AVEC UN SERUM DE LAPIN IMMUNISE AVEC
LES ANTIGENES ES**



sur 100 000 RECOMBINANTS / 100 POSITIFS

3)- DEUXIEME CRIBLAGE DES CLONES POSITIFS AVEC :
* SERUMS HUMAINS DE PHASE CHRONIQUE P24+
* SERUMS HUMAINS DE PHASE SUBAIGUE P24-



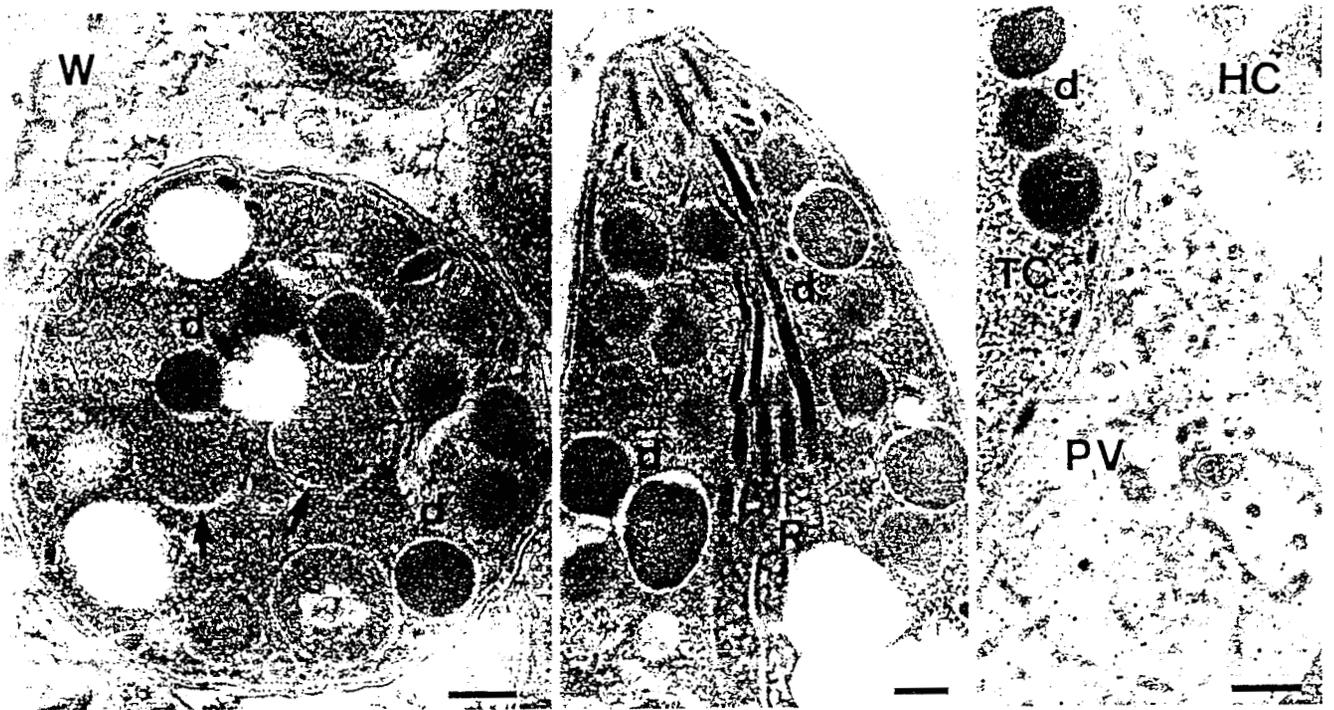
3 CLONES : TX 8 ; TX 10 ; TX 11

4)- SOUS-CLONAGE DANS LE PHAGE M13



SEQUENCAGE

FIGURE 8



(a)

(b)

(c)

Figure 9 : Localisation de l'antigène de 23 kDa dans les toxoplasmes par marquage "immunogold" et observé en microscopie électronique:

(a) Section d'un bradyzoïte à l'intérieur d'un kyste : l'antigène de 23 kDa est détecté dans les granules denses (d) et dans des granules moins condensés (flèches); (b) Dans le tachyzoïte, le marquage se trouve dans la matrice des granules denses (d), R, rhoptries; (c) Associée au marquage des granules denses (d), une réaction positive est aussi observée dans la vacuole parasitophore (PV), TC, toxoplasme intracellulaire; HC, cytoplasme de la cellule hôte. (échelle : 0,2 μm)

(d'après Cesbron-Delauw M.F. et al., 1989, P.N.A.S. USA, Vol.26, p. 7537-7541)

L'intérêt de cet antigène dans l'immunité s'amplifie par la présence d'une propriété particulière: la fixation du calcium. L'antigène P23 pourrait donc agir pour former et/ou stabiliser le réseau présent dans la vacuole parasitophore (Sibley 1987). Une des actions possibles de cette molécule serait donc la modulation de la concentration du

calcium dans la vacuole parasitophore, ce qui pourrait intervenir dans l'activité de différentes enzymes maintenant l'intégrité du parasite dans la cellule (Sibley et al. 1986, Sibley 1987).

Plusieurs essais d'expression de cette protéine recombinante ont été réalisés en utilisant le virus de la vaccine ou *Escherichia coli* mais aucun n'a permis la production de protéine recombinante en grande quantité.

Grâce à la détermination de la séquence nucléotidique (Cesbron-Delauw et al., 1989-1) et au séquençage peptidique de l'antigène natif de 23 kDa (isolé par immunoadsorption avec l'anticorps monoclonal TG 17-43) nous avons pu prédire les peptides les mieux exposés au système immunitaire. Pour cela, nous avons utilisé la méthode de Hopp et Woods (1981) basée sur l'hydrophobicité, la mobilité, et l'accessibilité (Gras-Masse et Tartar)(Figure 10). Cinq peptides ont été ainsi sélectionnés et synthétisés (Figure 11). Ces peptides ont été couplés à la Sérum Albumine Bovine (BSA).

Cette série de peptides nous a permis de déterminer les épitopes T immunodominants de la P24 (ou P23 pour la protéine native).

Figure 11 :

séquence en acides aminés

➔ 64-79

CSLKKSSKMVRVSAIV

➔ 88-109

CLSAGAYAAEGGDNQSSAVSDR

➔ 170-193

VEEVIDTMKSMQRDEDIFLRALNK

➔ 194-208

GETVEEAIEDVAQAE

➔ 231-250

DEMKVIDDVQQLEKDKQQLK

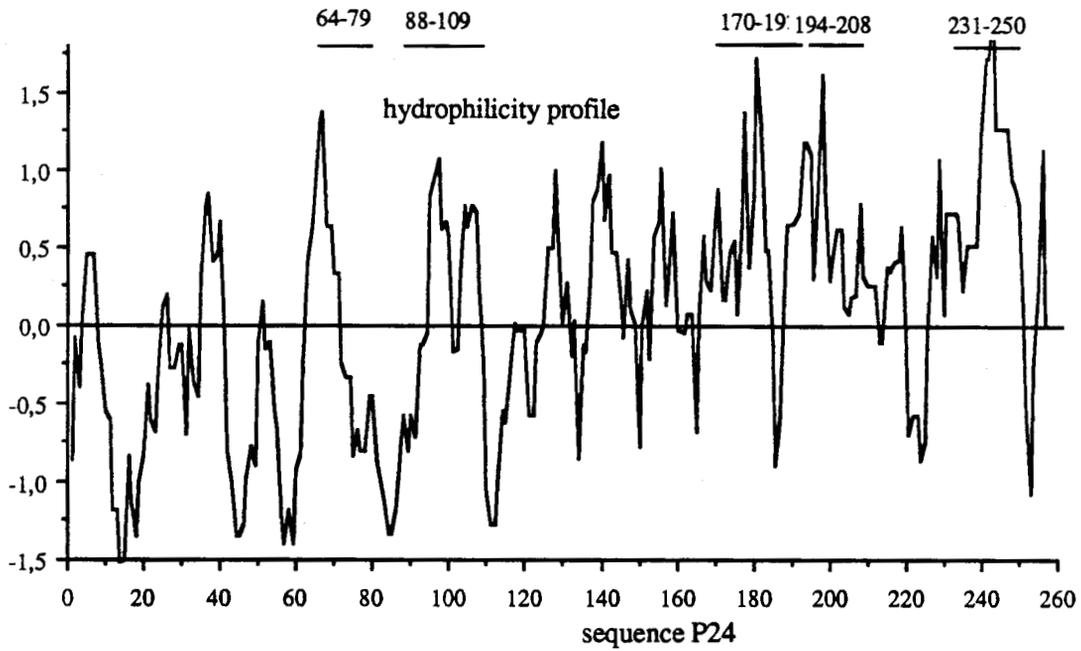
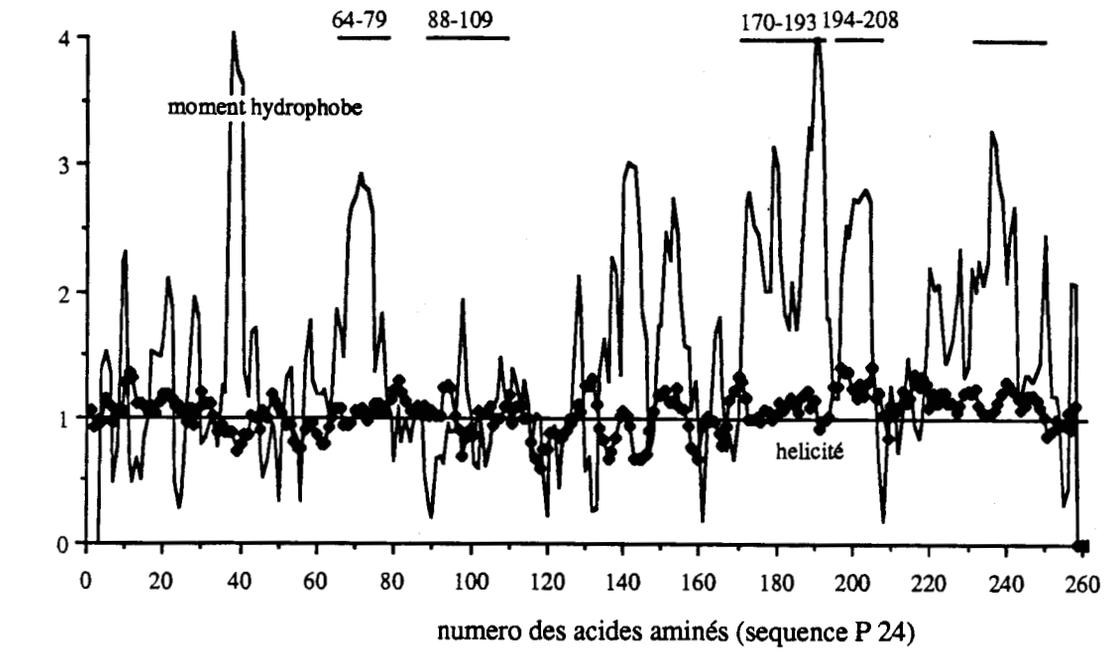


FIGURE 10

F-Mise au point du modèle expérimental : le rat athymique

Ne disposant pas au début de ce travail de souche de toxoplasme de virulence modérée permettant des études fiables de protection chez la souris, nous avons recherché un autre modèle expérimental : le rat.

Le rat Fischer étant naturellement résistant à une infection massive par la souche virulente RH de *Toxoplasma gondii* (10^7 parasites), ce modèle semble plus proche que la souris de l'infection observée chez l'homme. Par contre les rats Fischer génétiquement athymiques ou "Nude" (Figure 12) ne survivent pas à une infection beaucoup plus faible (10^3 tachyzoïtes)(Figure 13, Santoro et al., 1987) et ont donc été utilisés lors des expériences de protection.

Les rats Fischer athymiques ayant une profonde dépression du système immunitaire T-dépendant, ces premiers résultats ont

**MODELE EXPERIMENTAL : LE RAT GENETIQUEMENT
ATHYMIQUE OU NUDE**



FIGURE 12

suggéré que la résistance du rat à la toxoplasmose était en rapport avec la réponse cellulaire T. La première expérience (Figure 13) a donc consisté à reconstituer ces rats athymiques avec des cellules T provenant de rats Fischer sains. Les rats "Nude" ainsi transférés retrouvaient leur capacité à éliminer le parasite et résistaient à l'infection. Ce traitement a restauré de façon dose-dépendante leur résistance à l'infection.

Figure 13: d'après Santoro et al. (1987)

TABLEAU

Toxoplasmose chez le rat athymique reconstitué ou non avec des cellules lymphocytaires.

Groupe expérimental et (nombre d'animaux)	Survie à la première infection (nombre de jours)		Survie à la réinfection (*) (nombre de jours)	
	Étendue	Moyenne	Étendue	Moyenne
	Rats Nu/Nu (10).....	9-18	13,7 ± 2,35	-
Rats Nu/Nu + cellules lymphocytaires (a) 10 ⁶ (2).	65-113	89 ± 33,9	-	-
5. 10 ⁶ (2).....	> 120	> 120	> 90	> 90
15. 10 ⁶ (2).....	> 120	> 120	> 90	> 90
Rats contrôles (b) (6).....	> 120	> 120	> 90	> 90
Rats Nu/Nu contrôles de la deuxième infection (5).....	-	-	12-22	15,6 ± 4,1

(a) Les animaux ont reçu 24 h avant l'infection différentes doses de cellules lymphocytaires de rats Nu/+ non infectés.

(b) Rat normaux Nu/+ de la même portée.

(c) Les rats ayant survécu à la première infection ont été réinfectés 4 mois plus tard avec 10⁵ tachyzoïtes.

Plus important encore est le fait que les rats ayant survécu à la première infection (>120j) ont également résisté à une réinfection témoignant du rôle essentiel joué par les cellules T dans le développement d'une immunité à la réinfection au cours de la toxoplasmose du rat. D'autre part, alors que le rat athymique est incapable de développer une réponse humorale (Capron et al., 1983), les sérums des rats athymiques reconstitués et ayant survécu à l'infection ont un taux d'anticorps anti-toxoplasmes (détecté par immunofluorescence) semblable à ceux observés chez les rats Fischer infectés. Lorsque l'on examine cette réponse anticorps plus en détail par immunoprécipitation des antigènes de *Toxoplasma gondii* après marquage métabolique à la méthionine ^{35}S , le profil antigénique reconnu par les rats athymiques ayant été protégés est qualitativement similaire à celui des rats Fischer infectés.

Les résultats de cette étude confirment chez le rat le rôle protecteur des lymphocytes T dans la toxoplasmose, préalablement établi dans d'autres modèles animaux comme le hamster (Frenkel 1967) et les souris "Nude" (Lindberg et Frenkel, 1977).

La démarche de ce travail a été basée sur les faits suivants:

➔ nous possédons un modèle expérimental qui permet d'apprécier par transfert adoptif le rôle de la composante cellulaire ainsi que celui de la composante humorale dans l'immunité développée au cours de la toxoplasmose du rat, et ceci par un moyen simple : l'étude de la survie des animaux après infection par la souche virulente RH de *Toxoplasma gondii*.

➔ le rôle des lymphocytes T dans l'immunité lors de la toxoplasmose ayant été démontré depuis longtemps, il nous a semblé indispensable, étant donné l'intérêt des antigènes excrétés-sécrétés par le parasite, d'étudier le rôle de ces antigènes au sein de l'immunité à médiation cellulaire.

➔ enfin, un de ces antigènes excrétés-sécrétés montrant un intérêt immunoprophylactique (Cesbron-Delauw et al., 1989-1; 1989-2) et ayant fait l'objet d'un clonage moléculaire (P24), mes recherches se sont orientées vers cette molécule et vers la détermination des épitopes T immunodominants au cours de différentes situations expérimentales.

TRAVAUX PERSONNELS

Lorsque nous avons débuté ce travail, la question essentielle que nous nous sommes posée était la suivante : **Quels sont, parmi les antigènes de *Toxoplasma gondii*, les antigènes capables d'entraîner une réponse lymphocytaire T susceptible d'induire une immunité protectrice?**

Le modèle expérimental que nous avons utilisé pour apprécier le rôle protecteur de ces lymphocytes T a été le rat "Nude" génétiquement athymique. La spécificité des cellules transférées a été appréciée par le test de transformation lymphoblastique.

La première partie de ce travail a été consacrée à la mise en évidence de l'implication des **antigènes excrétés-sécrétés** par le parasite dans l'immunité à médiation cellulaire protectrice développée chez le rat. Dans une seconde partie, nous avons abordé l'étude à l'aide de peptides synthétiques de la réponse cellulaire d'un antigène sécrété particulier, la **P24**.

ARTICLE 1

(accepté dans Infection and Immunity)

Protection de rats "Nude" contre la toxoplasmose par des cellules T "helper" spécifiques d'antigènes excrétés-sécrétés (ESA).

Dans ce premier travail, nous avons étudié le rôle de lymphocytes T spécifiques de *Toxoplasma gondii* dans la résistance du rat.

Nous avons pu montrer, dans un premier temps, que des lymphocytes T provenant d'animaux infectés par *Toxoplasma gondii* sont capables de protéger des rats "Nude", normalement susceptibles, contre une infection mortelle. Cette protection est observée avec des doses de cellules beaucoup plus faibles que celle observée avec des cellules T non spécifiques.

Dans un deuxième temps, ce travail montre l'implication des antigènes excrétés-sécrétés dans l'immunité développée contre la toxoplasmose du rat. Le transfert adoptif de cellules T "helper" spécifiques d'antigènes ES peut induire, après culture *in vitro*, une protection

significative des rats génétiquement athymiques contre la toxoplasmose. Nous avons pu observer alors que les rats "Nude" qui ont reçu de tels lymphocytes T sont capables de développer une réponse anticorps spécifique (ce dont ne sont pas capables les rats "Nude" qui ont reçu des cellules non spécifiques du parasite mais anti-BSA). La spécificité des anticorps produits est dirigée vis-à-vis de différentes molécules dont certaines ont été décrites comme étant des antigènes ES.

En résumé, des antigènes excrétés-sécrétés par *Toxoplasma gondii* sont capables d'éliciter des lymphocytes T protecteurs dont un des rôles fonctionnels est l'implication dans la production d'anticorps.

Article 2 présenté page 92

TITLE

Protection of nude rats against Toxoplasma infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells.

RUNNING TITLE

Toxoplasma specific T cells protect nude rats

AUTHORS

Véronique Duquesne, Claude Auriault, Françoise Darcy, Jean-Pierre Decavel, and André Capron.

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

CORRESPONDENCE

Véronique Duquesne
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

SUMMARY

In the present work we demonstrate the implication of excreted-secreted antigens in the protective cell-mediated immunity developed by the rat toward *Toxoplasma gondii*. We have first shown that 10^4 specific T cells from *Toxoplasma gondii* infected rats conferred to nude rats the ability to resist an infection by the highly virulent RH strain of *Toxoplasma gondii*. In a second series of experiments, the role of excreted-secreted antigens in this protection was demonstrated. After the adoptive transfer to nude rats of various doses (10^3 , 10^4 , 10^5) of excreted-secreted antigens specific helper T cells (propagated *in vitro* during one month), a significant protection toward *Toxoplasma gondii* was induced. Moreover, these cells were responsible for a specific antibody response in nude rats that are normally unable to develop any specific humoral response. The specificity of these antibodies was directed toward different molecules with molecular weight of 104, 97, 57, 39, 30, 21 and 18 kDa. Among which some have been previously characterized as major excreted-secreted antigens.

INTRODUCTION

Toxoplasmosis is a widely spread infection, caused by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). All species of mammals, including man, can be infected by this pathogen agent. It is generally a mild or inapparent disease in human populations, except in the foetus (24) and in immunosuppressed patients (19). In children and adults, *Toxoplasma* infection induces a protective immunity against reinfection. This resistance to toxoplasmosis seems to be mediated at least in part by cell-dependent immunity (16) but the interactions between the different cell populations in parasite killing or in inhibition of growth *in vivo*, are not yet clearly defined.

Other works have shown that transfer of serum, spleen cells, and lymph node cells from *Toxoplasma gondii* infected guinea pigs can confer a partial protection against toxoplasmosis (22). Furthermore, by selective depletion experiments, it was found that T cells and not B cells were responsible for the expression of a protective immunity in recipients challenged with parasites.

Contrariwise to other rodent models such as mice and hamsters, rats are resistant to *Toxoplasma gondii* infection (4). Therefore this experimental model has been less used in spite of some analogies with human toxoplasmosis (3). However we have previously shown that genetically athymic rats (nude : Nu/Nu) did not survive an intraperitoneal infection with 10^3 tachyzoites of *T. gondii*. But when nude rats were transferred with lymph node cells they became resistant to the infection. This protection correlated with the level of *Toxoplasma* specific antibodies (26). This suggested that T cells played a major role in the resistance of euthymic rat against *Toxoplasma* infection and that they induced the production of antibodies which could be implied in this protection.

The excreted-secreted antigens (ESA) from the tachyzoites also seem to play a primordial role in the immunity against toxoplasmosis (8). Indeed, secretory antigens constitute the

major part of the circulating antigens present in the plasma 24h after the infection (13). T lymphocytes of patients are stimulated by these antigens (14) and genetically athymic Fischer rats are significantly protected by the passive transfer of sera from euthymic Fischer rats immunized with ESA (8). This strongly suggested that ESA induce a protective immunity and that antibodies could play a crucial role in the protection obtained in the rat model. Among the isotypes of immunoglobulins produced after immunization with ESA, the role of the IgE isotype has been evidenced. So the Fischer rats infected or immunized with ESA showed a specific IgE antibody response quantified by radioimmunoassay (23). The role of these IgE has been suggested in antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mechanisms involving platelets and eosinophils (23). Therefore, the nude rat seems to be a relevant model for the study of the mechanisms controlling *in vivo* *Toxoplasma* infection.

The present report underlines the preponderant role played by T cells recovered from infected or ESA-immunized rats in the immunity toward *Toxoplasma gondii*.

MATERIALS & METHODS

Parasites. *Toxoplasma gondii* (RH strain) tachyzoites were obtained from Swiss mouse peritoneal fluids 3 days after their infection. The toxoplasma suspension was purified from remaining murine cells by filtration through 3 μm polycarbonate membrane filters (Nuclepore, Pleasanton, CA, USA). For some experiments, the parasites harvested by this procedure were irradiated (100 Grey, 10 min) (PHILIPS RT; filter 1.7 AI, 100 Ku, 8 mA). Then they were stored in liquid nitrogen until use.

Animals. Inbred Fischer/Ico F344 rats (2 months old) and genetically athymic Fischer (nude or Nu/Nu) rats were maintained in the animal facilities of Pasteur Institute, Lille. For the passive transfer of ESA-specific T lymphocytes and the helper role of these cells, Nu/Nu Fischer rats were obtained from Harlan Olac (Oxon, England).

Antigen preparation. Soluble antigen (water lysed antigens : S₂) : Tachyzoites obtained from mice peritoneal washings were filtered on 3 μm polycarbonate membranes (Nuclepore). Two washings in 0.1M pH7.4 phosphate buffer saline (PBS) were performed and the parasite pellet was adjusted to a concentration of 6.10^8 tachyzoites/ml in water. For the preparation of membrane antigens, parasites harvested in RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) were sonicated four times for 1 min, then frozen and submitted to six passages in an X press (LKB, Uppsala, Sweden). After centrifugation at 32,000xg for 2hr at 4°C, the pellet containing the membrane antigens was solubilized by the addition of the detergent "CHAPS" (3 [(3-Cholamidopropyl)-dimethyl ammonio] - propansulfonat), (Fluka, Buchs, Switzerland). Excreted-secreted antigens (ESA) were prepared as described by Darcy et al (9). Briefly, the parasites (1.33×10^8 tachyzoites/ml) were incubated for 3hr at 37°C in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% heat inactivated rat serum. The tachyzoite suspension was centrifuged at 1000xg for 10 min and the supernatant was filtered, concentrated, and stored at -20°C until use.

Immunization procedure. The excreted-secreted antigens (equivalent of 10^8 tachyzoite excretory antigens) were mixed 1/1 with Complete Freund Adjuvant and injected to Fischer rats at the base of the tail according to the method of CORRADIN et al (7). After 3 weeks, the rats were reinjected with the same antigen without adjuvant. T lymphocytes were recovered 5 days after. The same procedure was used for the immunization by bovine serum albumin (BSA).

Infection procedure. Fischer rats were intraperitoneally infected by 10^5 tachyzoites and the T lymphocytes were recovered 30 days after the priming injection. For Nu/Nu rat infection 10^5 or 10^4 parasites were injected by the same way, this dose being sufficient to kill all the animals within 15 to 20 days (26).

Preparation of *T. gondii* and ESA specific T cells. Thirty days after the priming injection with 10^5 tachyzoites, inguinal and mesenteric lymph nodes were aseptically harvested and cell suspensions were prepared. *T. gondii*-specific T lymphocytes were separated by the passage through a nylon wool column (15). For the preparation of ESA-specific T cells, five days after the second injection of ESA without adjuvant, the T lymphocytes were isolated with the same method and maintained in culture at 37°C in 5% CO_2 atmosphere in RPMI 1640 (Gibco) with 10% foetal calf serum (FCS) (Gibco), interleukin 2 (IL2), 2×10^6 irradiated (30 Grey) thymic antigen-presenting cells (APC) (PHILIPS RT; filter 1.7 AI, 100 Ku, 8 mA) and 5×10^4 irradiated parasites supplemented with $40 \mu\text{g/ml}$ of S_2 antigen in 24-well plates (Falcon 3047, Becton Dickinson, Paramus, N.J.). After proliferation, T lymphocytes were used for the adoptive transfer in genetically athymic rats.

Source of IL2. IL2 containing medium was obtained by stimulation of murine EL4 tumor cells with phorbol myristate acetate. IL2 activity in the conditioned medium was tested by its ability to allow the growth of Concanavalin A stimulated splenic cells.

T cell proliferation assays. For T cell proliferation, 5×10^5 specific T cells and 10^6 APC were seeded in 96-well plates (Falcon 3072, Becton Dickinson, Paramus, N.J.) in triplicate in the presence of various dilutions of soluble antigens (S_2) or irradiated parasites. The plates were incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 atmosphere. Levels of DNA synthesis were determined by the 18.5 KBq ^3H -TdR (specific activity 37 GBq/mmol, TMM-79A CEA, Gif-sur-Yvette, France) uptake after a 18hr pulse on day 5. The amount of cell incorporated radioisotope was determined by filtered paper concentration (Skatron, Lierbyen, Norway) and radioisotope counted in a liquid scintillation counter (LKB, Wallac, Turku, Finland).

***In vivo* transfer of *T. gondii*- and ESA-specific T cells for protective assays.** Recipient Nu/Nu Fischer rats were injected intravenously with 10^4 to 10^7 specific T lymphocytes or non specific T lymphocytes (BSA). One day after, the rats were infected by 10^5 tachyzoites. The same protocol was used for studying the protective role of ESA-specific T cells propagated in *in vitro* cultures for three weeks. These T cells (10^3 , 10^4 , 10^5) were adoptively transferred to Fischer nude rats one day before infection with 10^5 tachyzoites per rat. Control rats were injected with BSA-specific T lymphocytes. Before passive transfer experiments, the surface phenotype of the cells was controlled by flow cytometry using monoclonal antibodies against T cells subsets: anti-W3/13, anti-W3/25, anti-OX8 and against B cells: anti-OX12 (Seralab, Ltd, Crawley Down, UK).

Dot blot immunoassay. Nu/Nu Fischer rats were used for studying the helper activity of ESA-specific T cells. 10^6 cells recovered from Fischer rats immunized with ESA and *in vitro* cultured for one month were transferred in nude rats before infection with 10^4 parasites or immunization with ESA. For the detection of anti-*T. gondii* immunoglobulin G, total antigens (6 μg) were spotted on strips of nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, BA 45, FRG). After 1hr saturation in 10mM PBS (pH 7.4) with 1.5% casein (MERCK, Darmstadt, F.R.G.), the sera diluted at 1/50 were

added during 2hr. Three washings were performed in PBS with 1.5% casein and the strips were incubated with an anti-rat IgG serum labeled with peroxidase (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL). The revelation was performed 2 hr after with the mixture of 30 mg HRP Color (Bio-Rad, Richmond, CA), 10 ml cold methanol, 40 ml PBS and 30 μ l 30% H₂O₂. The reaction was stopped with distilled water. The intensity of the spots was measured with a light reflecting densitometer (Gretag, Regensdorf, Switzerland) and expressed in OD units. The *T. gondii* specific IgE antibodies were measured by a double sandwich technique with a rabbit anti-rat IgE serum (dilution 1/2000)(MIAB, Uppsala, Sweden) revealed by a 1/200 diluted anti-rabbit peroxidase-labeled serum (Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France)

Electrophoresis and immunoblotting. Total toxoplasma antigens (S₂-CHAPS extract) were separated by electrophoresis in 13% polyacrylamide gels using the discontinuous buffer system of Laemmli (17) in unreduced conditions. Proteins were transferred from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to 0.45 μ m nitrocellulose paper (Schleicher & Schuell, BA 45, FRG) by electrophoresis at 200 mA for 3hr. Briefly, strips were then incubated with various serum samples (1/100 diluted) and the fixed antibodies were revealed with an anti-rat peroxidase-labeled serum (Miles Laboratories).

RESULTS

Reactivity and transfer of specific T cells from infected rats. Table 1 shows that the T cells from infected animals recovered 30 days after infection react against soluble antigens (S_2) in a dose dependent manner. Thus, the T lymphocytes are able to recognize the cytoplasmic antigens released after parasite lysis and to proliferate in *in vitro* experiments. In the S_2 antigen extract, surface proteins were not included. For this reason, another method of *in vitro* stimulation has been performed. The reactivity of parasite-specific T cells was tested against 2 different doses of irradiated parasites (10^3 and 10^4 per well) added with a constant concentration of soluble antigens (40 $\mu\text{g/ml}$) (Table 2). Despite the fact that the reactivity toward the S_2 antigens varied from an experiment to another, an additive effect of the S_2 antigens (cytoplasmic antigens) and of the irradiated tachyzoite presenting also the membrane antigens clearly appeared. Controls showed that neither S_2 nor irradiated parasites were able to induce a proliferative response of non-immune T cells.

The *in vivo* study of a protective role for T cells was carried out. Parasite-specific T cells (10^4 at 10^7 cells per rat) from infected Fischer rats were transferred to Nu/Nu Fischer rats before infection by 10^5 tachyzoites of the virulent RH strain of *T. gondii*. Previous experiments had shown (26) that the passive transfer of 10^6 or more non specific T cells to nude rats was sufficient to induce a significant increase of the survival. For this reason, in these experiments, we reduced to 10^4 per rat the amount of specific T cells transferred in order to evaluate their protective role in comparison with rats receiving 10^4 BSA-specific T cells. The survival of rats that did not receive T cells or having received BSA-specific T cells did not exceed 30 days after infection, while the transfer of T cells recovered from infected Fischer rats (the phenotype of which is 97% W3/13⁺, 68% W3/25⁺, 35% OX8⁺ and 5% OX12⁺) led to a significant increase of the survival from 30 to 50 days and more (Fig.1). These experiments

suggested that only 10^4 *T. gondii* specific T cells conferred to nude rats the ability to resist the infection for a longer time than did 10^4 T cells specific for an irrelevant antigen.

Reactivity and transfer of specific helper T lymphocytes from rats immunized with ESA. Due to the protective role previously demonstrated in the nude rat model for ESA-specific antibodies, ESA-specific T lymphocytes were produced. T lymphocyte enriched population was prepared ; the proliferative response of these cells to antigenic stimulation and their protective effect after adoptive transfer were tested. ESA-specific T cells proliferated in a dose dependent manner either with S₂ antigen (Table 3) or with irradiated tachyzoites associated with a constant dose of S₂ (40µg/ml)(Table 4). Nevertheless it clearly appeared that the reactivity of ESA-specific T lymphocytes was essentially if not totally due to the antigens present in the S₂ soluble antigenic fraction. Indeed the proliferative response of these cells with only irradiated tachyzoites was very low. After one month culture, T cell lines contained 90% W3/13⁺, 88% W3/25⁺, 13% OX8⁺ and undetectable OX12⁺ cells. This demonstrated that lymph node cells maintained in long term cultures were strongly enriched in T cells expressing the helper marker (W3/25) in the rat. Figure 2C shows that as few as 10^3 ESA-specific helper T cells were sufficient to extend the survival of nude rats compared with rats receiving BSA-specific T cells. Moreover rats having received 10^4 or 10^5 ESA-specific T cells (Fig. 2A,B) were for the majority of them completely protected against toxoplasma infection, since they were still alive 70 days after the initial infection. The rats transferred with 10^5 T cells were reinfected at day 60 with 10^5 parasites. All animals survived after the challenge suggesting that the transfer of ESA-specific T cells conferred to nude rats a protective immunity against reinfection.

Helper activity of T cells from donor Fischer rats immunized with ESA.

In order to analyse the helper activity of ESA-specific T cells, 10^6 cells recovered from Fischer rats immunized with ESA and *in vitro* cultured for one month were transferred into nude rats before infection with 10^4 tachyzoites or immunization with ESA. The sera of the rats having received BSA-specific T cells did not contain *T. gondii* -specific

IgG. In contrast, rats adoptively transferred with ESA-specific helper T lymphocytes and infected with tachyzoites produced an important amount of specific IgG (Fig.3A). A series of Fischer nude rats were immunized with ESA (corresponding to the excretion of 10^8 parasites) one day after the adoptive transfer with ESA-specific T helper cells. In this case, no difference in the tachyzoite specific IgG production was observed between the animals having received ESA- or BSA-specific T lymphocytes (Fig.3A). Previous experiments had shown that a significant amount of specific IgE are produced during rat toxoplasmosis (23) and suggested that these IgE were involved in the protective immunity. For this reason, the rate of IgE in nude rats adoptively transferred with T cells then infected with tachyzoites or immunized with ESA was appreciated in dot blot immunoassay. In both conditions, nude rats having received ESA-specific helper T cells produced a significant quantity of seric tachyzoite specific IgE (Fig.3B) while control rats did not. These results clearly showed that the T cells from Fischer rats immunized with ESA, maintained in *in vitro* culture for several weeks, remained functional *in vivo* and were able to help to the production of *T. gondii*- specific antibodies in nude rats normally unable by themselves to develop a specific humoral response.

Characterization of the antigens recognized by sera from Nu/Nu rats transferred with ESA specific T cells. The sera from nude rats infected after adoptive transfer of ESA-specific helper T cells recognized several antigens of the total tachyzoite extract (Fig. 4). These antibodies progressively appeared during the course of infection. Seven days after infection, these nude rats had antibodies to 30 kDa antigens (lane 3). This large band at 30 kDa likely corresponds to both P30, the major surface protein, and to the major 28.5 kDa ESA. Indeed, blots with anti-P30 and anti-28.5 monoclonal antibodies show the same migration for the corresponding antigens in non reduced condition. In addition, antibodies to a 39 kDa antigen (lane 4) and to 104, 97, 57, 21 and 18 kDa antigens (lane 5,6,7) were present in the sera of rats as soon as 21 days post infection. In contrast, sera from rats reconstituted with BSA-specific T lymphocytes (lane 8) or normal rat sera (lane 1) did not recognize any *T. gondii* antigens. The majority of these antigens were recognized by sera from ESA-

immunized Fischer rats (lane 2) except the 104 and 97 kDa antigens but the immunized rats were bled before 21 days of infection. These results confirmed those mentioned above and demonstrated that the adoptive transfer of ESA-specific helper T lymphocytes to the nude rats was able to induce the production of antibodies toward the major excreted-secreted tachyzoite antigens such as the 97, 57, 39, 28.5 and 21 kDa antigens already described (8).

DISCUSSION

The data reported here show that a T cell line specific for tachyzoite ES antigens can adoptively protect susceptible nude rats against a challenge infection with *T. gondii*. Moreover, the reconstituted infected nude rats developed an antibody response able to recognize toxoplasma antigens. In our laboratory, we had previously shown that the intravenous injection of lymph node cells from uninfected rats induced the resistance of athymic Fischer rats against toxoplasma infection. In addition, this protection correlated with a specific antibody production. These preliminary results suggested that the T cell participation was essential for the resistance to acute *T. gondii* infection *in vivo* (26). In these experiments, at least 10^6 T cells injected to rats were necessary to confer such a protection. In this report, we demonstrate that the transfer of T cells from infected Fischer rats can confer to athymic rats resistance against lethal infection. With only 10^4 *T. gondii* -specific T lymphocytes, we obtained a significant delay of survival in comparison with the rats transferred with T cells specific for an irrelevant antigen (BSA). These data can be related to Pavia's work (22) in guinea pigs but the protective effect of transferred T cells in his experiments was determined by the reduction of dissemination of *T. gondii* parasites.

In our experiments, the nude rats could be partially or totally protected and their survival was proportional to the number of *T. gondii* -specific T cells transferred. In healthy individuals, toxoplasma infection induces a life-long protective immunity against reinfection (10,11). This suggests that during the first infection an efficient stimulation of the immune response occurs. The same situation was observed in our experimental model. The infected nude rats having received *T. gondii* antigen -specific T cells were protected against a second infection with the lethal strain of *T. gondii*.

Numerous work attributed a preponderant role for cytoplasmic and surface antigens of tachyzoites, the proliferative forms present during acute toxoplasmosis. The present study is based upon a different approach (2) by postulating the primordial role played by

tachyzoite excreted-secreted antigens in the immune response. On this basis, Darcy and al. (8) have clearly demonstrated that the passive transfer of sera from ESA-immunized euthymic Fischer rats to genetically athymic rats infected by lethal doses of the highly virulent RH strain of *T. gondii* conferred a significant level of protection. Thus the humoral immune response appeared to play an important role in the rat protective immunity against *Toxoplasma gondii*.

The adoptive transfer of T cells led to the production of specific antibodies. It is now established that in rat toxoplasmosis, antibodies induced mechanisms of ADCC involving eosinophils or platelets as effector cells (23). Moreover antibodies would lyse extracellular toxoplasma in the presence of complement like accessory factors (25, 27). The seric antibodies from nude rats having received ESA -specific T cells and being protected against infection were analyzed. It appeared that those antibodies had the same antigenic specificity as antibodies from ESA -immunized Fischer rat sera which induced a significant protection by passive transfer to nude rats (8). It would be hazardous to attribute the protection to the antibody production alone. Indeed, numerous data demonstrate that cell-mediated immunity is considered as a major component of the host defence mechanisms against toxoplasmosis (9,18). Among them, immune lymphocyte products were involved. When the lymphocytes from animals chronically infected with *T. gondii* were incubated in the presence of specific antigen, they produced and released into the culture medium a variety of biologically active substances, such as macrophage migration inhibitory factor (12), interleukine 2 (1), gamma interferon (IFN γ) (28) and toxoplasma mediator (5). For this reason, we supposed that the ESA -specific helper T cells transferred could interfere by the means of a production of lymphokines in the elimination of parasites by activating macrophage oxidative metabolisms and anti-protozoal activity (20). Lymphokines like IFN γ can activate macrophages for the elimination of intracellular parasites (21). IFN γ appeared to be the major mediator of resistance against *T. gondii*. Indeed, mice treated with a monoclonal antibody to IFN γ did survive and develop chronic *T. gondii* infection contrary to mice which did not receive antibodies (29). The lymphokine production by ESA -specific T cells and their role in the protective immunity of nude rats is presently underway.

A recent work demonstrated in the murine model that T lymphocytes from mice immunized with a temperature-sensitive mutant (Ts4) strain of *T. gondii* protect normal recipient mice against death due to the moderately virulent C56 strain (30). The phenotypes $\text{lyt } 2^+$ and $\text{lyt } 1^+$, L3T4^+ T cells were responsible for resistance against toxoplasmosis but the $\text{lyt } 2^+$ T lymphocytes could be likewise involved. In our system, only the helper T cell population has been studied.

Since we show that ESA -specific antibodies and T cells induce protection, it is now of first importance to find out among the panel of excreted-secreted antigens, which ones induce the major T cell response and which ones are the main targets of the protective antibodies. The cloning of an excreted-secreted antigen has been recently carried out in our laboratory (6) and their vaccinal potentialities as well as the characterization of the major T and B cell epitopes using synthetic peptides is in progress.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank H. Caron for the production of parasites and I. Wolowczuk for useful advice and discussions.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U167-Centre National de la Recherche Scientifique 624.

LITERATURE CITED

1. Baker, D.E., A. Hagimo, K. Knoblock, and J.P. Dubey. 1983. *Toxoplasma gondii* : microassay to differentiate toxoplasma inhibiting factor and interleukin 2. Exp. Parasitol. **55**:320-330
2. Capron, A., and J.P. Dessaint. 1988. Vaccination against parasitic diseases: Some alternative concepts for the definition of protective antigens. Ann. Inst. Pasteur / Immunol. **139**:109-117
3. Catterall, J.R., S.D. Sharma, and J. S. Remington. 1986. Oxygen-independent killing by alveolar macrophages. J. Exp. Med. **163**:1113-1131
4. Chinchilla, M., O.M. Guerrero, and E. Solano. 1982. Lack of multiplication of *Toxoplasma* in macrophages of rats *in vitro*. J. Parasitol. **68**:952-955
5. Chinchilla, M., and J.K. Frenkel. 1984. Specific mediation of cellular immunity to *T. Gondii* in somatic cells of mice. Infect. Immun. **46**:862-866
6. Cesbron-Delauw M.F., B. Guy, G. Torpier, R.J. Pierce, G. Lenzen, J.Y. Cesbron, H. Charif, P. Lepage, F. Darcy, J.P. Lecocq, and A. Capron. 1989. Molecular characterization of a 23 k major antigen secreted by *Toxoplasma gondii* . Proc.Nat.Acad.Sci. (in press).
7. Corradin, G., H.M. Etlinger, and J.M. Chiller. 1977. Lymphocyte specificity to protein antigen induced *in vitro* T cell dependent proliferative response with lymph nodes from primed mice. J. Immunol. **119**: 1048-1053
8. Darcy, F., D. Deslée, F. Santoro, H. Charif, C. Auriault, A. Decoster, V. Duquesne, and A. Capron. 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. **10**:553-567
9. Frenkel J.K. 1967. Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol. **98**:1309-1319

10. **Frenkel, J.K.** 1973. Toxoplasmosis: Parasite life cycle, pathology, and immunology, in: *The Coccidia* (D.M. Hammond, ed.), pp. 343, University Park Press, Baltimore.
11. **Frenkel, J.K.** 1988. Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today.* 4:273-278
12. **Gemsa, D., K.M. Debatin, W. Kramer, C. Kubelka, W. Dumiann, U. Kees, and P.H. Krammer.** 1983. Macrophage-activating factor from different T cell clones induce distinct macrophages functions. *J. Immunol.* 131:833-843
13. **Hugues, H.P.A., and F. Van Knapen.** 1982. Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int. J. of Parasitol.* 12:433-437
14. **Hugues, H.P.A., C.A. Cornelly, J.E.M. Strangeways, and L. Hudson.** 1984. Antigen specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* 58:539-547
15. **Julius, M.H., E. Simpson, L.A. Herzenberg.** 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3: 645-649
16. **Krahenbuhl, J.L., and J.S. Remington.** 1982. The immunology of *Toxoplasma* and Toxoplasmosis, p.356-421. *In* S. Cohen and K.S. Warren (ed.), *Immunology of parasitic infections*, 2nd ed. Blackwell scientific publications, Oxford.
17. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227:680-685
18. **Lindberg R.E., and J.K. Frenkel.** 1977. Toxoplasmosis in nude mice. *J. Parasitol.* 63:219-221
19. **Luft B.J. and J.S. Remington.** 1988. AIDS Commentary : Toxoplasmic encephalites. *N.Engl.J.Med.* 313.
20. **Murray, H.W., C.W. Juangbhanich, C.F. Nathan, and Z.A. Cohn.** 1979. Macrophage oxygen-dependent anti-microbial activity. II . The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* 150:950-964

21. **Nathan, C.F., H.W. Murray, M.E. Weibe, and B.Y. Rubin.** 1983. Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophages oxidative metabolism and anti-microbial activity. *J. Exp. Med.* **158:670-689**
22. **Pavia, C.S.** 1986. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* **137:2985-2990**
23. **Ridel, P.R., C. Auriault, F. Darcy, R.J. Pierce, P. Leite, F. Santoro, J.L. Neyrinck, J.P. Kusnierz, and A. Capron.** 1988. Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* **141:978-983**
24. **Remington, J.S.** 1968. Toxoplasmosis and congenital infection, in: *Intrauterine Infections. Birth Defects Orig. Art. Ser.* **4:47-56**
25. **Sabin, A.B., and H.A. Feldman.** 1948. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science.* **108:660-663**
26. **Santoro, F., C. Auriault, P. Leite, F. Darcy, and A. Capron.** 1987. Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. *Comptes Rendus de l' Académie des Sciences, Paris* 304, serie III, 297-300
27. **Schreiber, R.D., and H.A. Feldman.** 1980. Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.* **141:366-369**
28. **Shirahata, T., and K. Shimizu.** 1980. Production and properties of immune interferon from spleen cell cultures of *Toxoplasma* infected mice. *Microbiol. Immunol.* **24:1109-1120**
29. **Suzuki Y., M.A. Orellana, R.D. Schreiber, and J.S. Remington.** 1988. Interferon : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* **240:516-518**
30. **Suzuki Y., and J.S. Remington.** 1988. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by $Lyt-2^+$ and $Lyt-1^+$, $L3T4^+$ Tcells in mice. *J. Immunol.* **140:3943-3946**

LEGENDS

- Figure 1:** Transfer of T lymphocytes from infected Fischer rats (▲), from BSA immunized Fischer rats (◆) in nude rats. Control rats (.) were not transferred. All animals were infected with 10^5 tachyzoites of the RH strain.
- Figure 2:** Adoptive transfer of ESA (■) and BSA (◆) specific helper T lymphocytes. The nude rats were received 10^5 (A) or 10^4 (B) or 10^3 (C) T cells and were challenged by 10^5 tachyzoites. Control nude rats (.) were only infected with the same number of parasites.
- Figure 3:** *T. gondii* antigen specific IgG (A) and IgE (B) were measured by dot blot immunoassay. Nude rats were transferred with BSA (◆) or ESA (■) specific T cells before infection (1). In an other group, nude rats were transferred with BSA (■) or ESA (□) specific T cells before immunization with ESA (2).
- Figure 4:** Western blot analysis of Toxoplasma antigens. SDS-PAGE analysis (13% acrylamide) in unreduced conditions and blotting developed by sera from:
- uninfected Nu/Nu Fischer rat (lane 1)
 - ESA immunized Fischer rat (lane 2)
 - reconstituted by 10^6 ESA specific T cells and infected Nu/Nu Fischer rat, days 7,14,21,28,35 (lanes 3,4,5,6,7)
 - reconstituted by 10^6 BSA specific T cells and infected Nu/Nu

Table 1 : *In vitro* proliferation of infected Fischer rat lymph node cells restimulated by various concentration of S₂ antigen.

Antigen source	Concn($\mu\text{g/ml}$)	[³ H]Thymidine incorporation cpm \pm SD ^a
S2	80	56.212 \pm 8.820
	40	55.277 \pm 2.708
	20	37.714 \pm 3.458
	10	21.466 \pm 2.231
Medium	-	1.104 \pm 456

^a Each value represents the mean \pm standard deviation of triplicate samples from one representative experiment.

Table 2: *In vitro* proliferation of infected Fischer rat lymph node cells restimulated by S₂ antigen and irradiated tachyzoite preparations.

Antigen source	Concn(μ g/ml) or no of irradiated parasites/well	³ H Thymidine incorporation cpm \pm SD ^a
S ₂	40	8.000 \pm 1.000
Irradiated parasites	10 ³	5.250 \pm 3.000
	10 ⁴	9.500 \pm 1.250
Irradiated parasites + S ₂ (40 μ g/ml)	10 ³	21.500 \pm 1.500
	10 ⁴	18.000 \pm 5.000
Medium	—	1.250 \pm 400

^a Each value represents the mean \pm standard deviation of triplicate samples from one representative experiment.

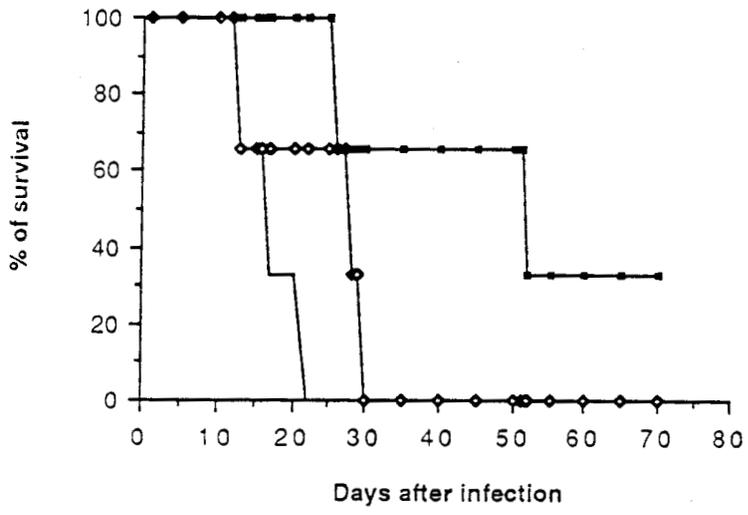


FIGURE 1

Table 3 : *In vitro* proliferative response of ESA-immunized Fischer rat inguinal lymph node T cells restimulated by various concentration of S₂ antigen.

Antigen source	Concn(μ g/ml)	[³ H]Thymidine incorporation cpm \pm SD ^a
S ₂	80	35.480 \pm 2.813
	40	19.621 \pm 1.604
	20	12.985 \pm 2.148
	10	9.390 \pm 3.357
Medium	–	4.873 \pm 997

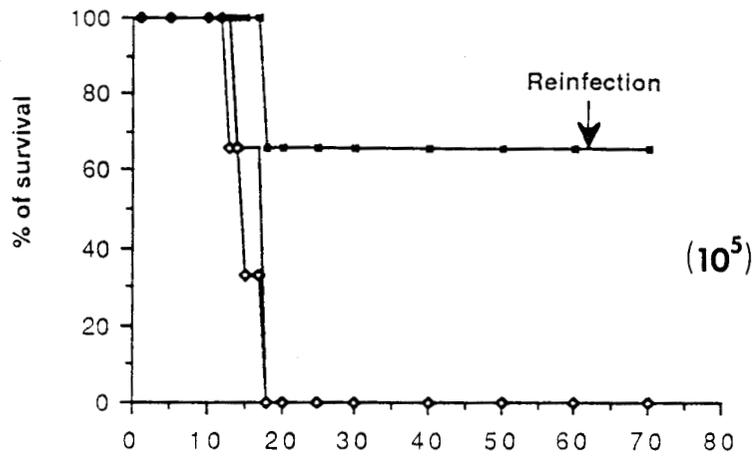
^a Each value represents the mean \pm standard deviation of triplicate samples from one representative experiment

Table 4: *In vitro* proliferative response of ESA-immunized Fischer rat inguinal lymph node T cells restimulated by S2 antigen and irradiated tachyzoite preparation.

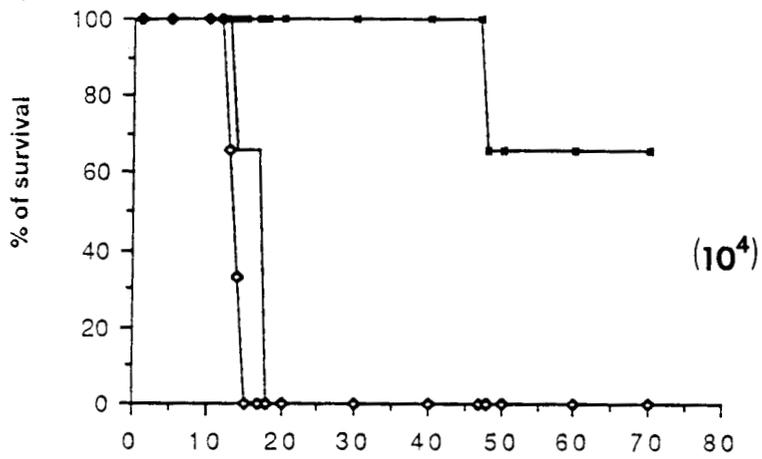
Antigen source	Concn ($\mu\text{g/ml}$) or no of irradiated parasites/well	[^3H]Thymidine incorporation cpm \pm SD ^a
S ₂	40	13.080 \pm 2.443
Irradiated parasites	10 ⁵	6.680 \pm 160
	10 ⁴	5.025 \pm 100
	10 ³	3.150 \pm 500
Irradiated parasites+ S ₂ (40 $\mu\text{g/ml}$)	10 ⁵	15.800 \pm 3.400
	10 ⁴	21.300 \pm 1.500
	5.10 ³	17.800 \pm 660
	10 ³	13.750 \pm 2.700
Medium	-	4.800 \pm 1.160

^a Each value represents the mean \pm standard deviation of triplicate samples from one representative experiment.

A



B)



C

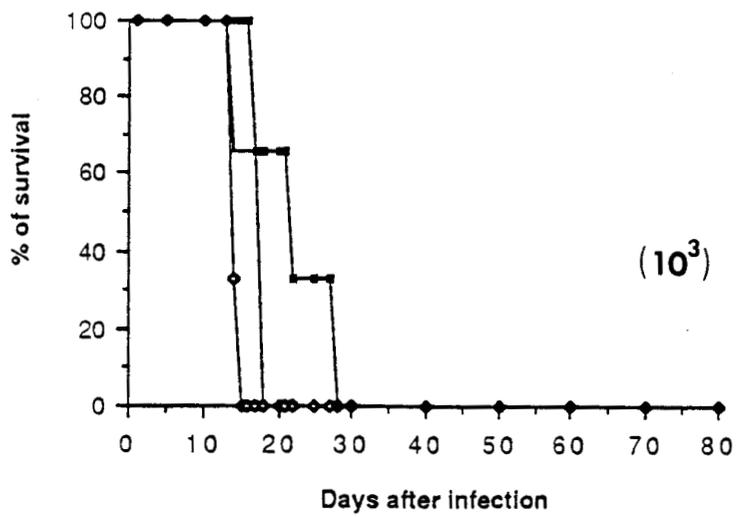


FIGURE 2

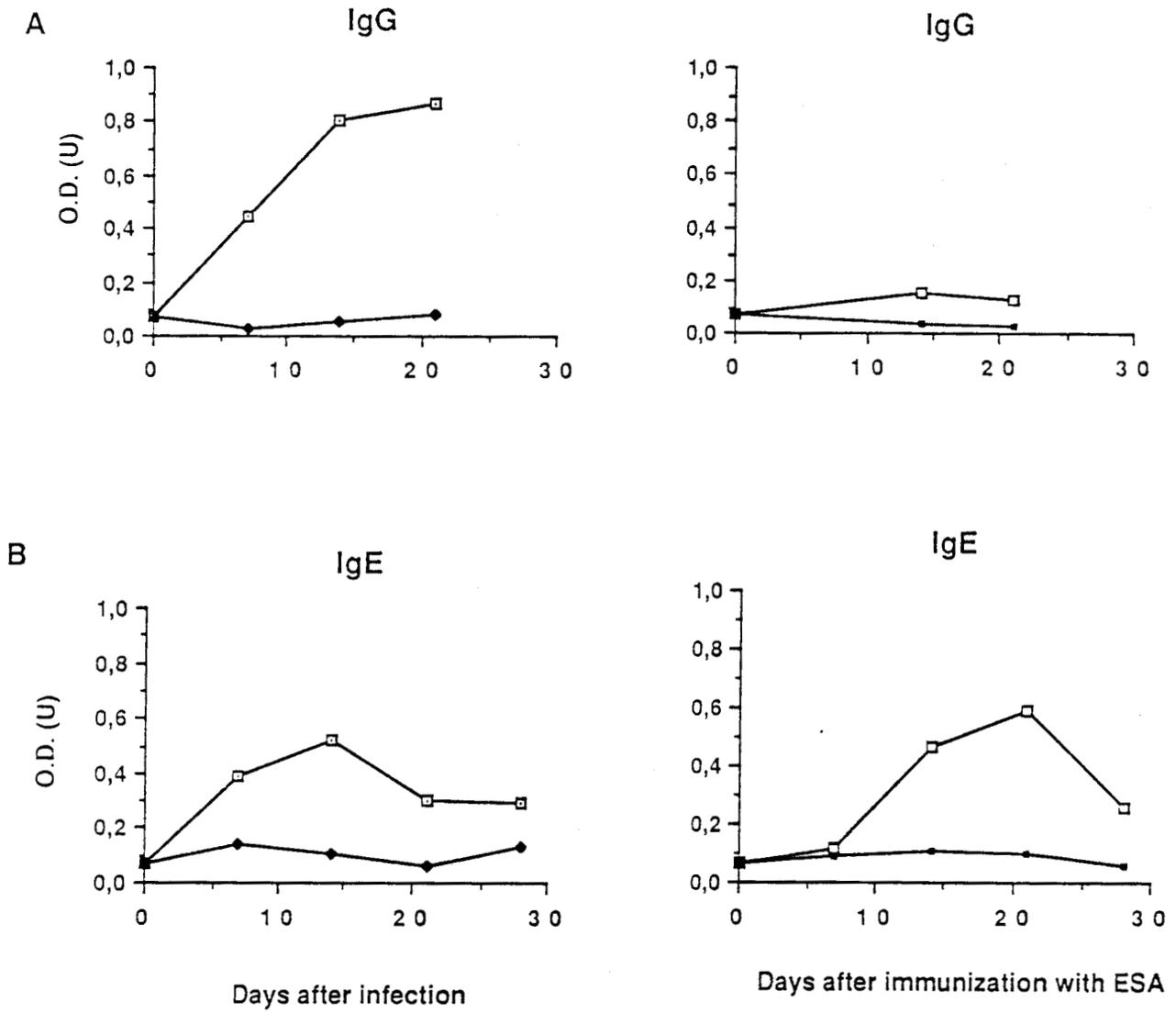


FIGURE 3

kDa

104 →

68 →

46,5 →

30 →

18,1 →

15,1 →

1

2

3

4

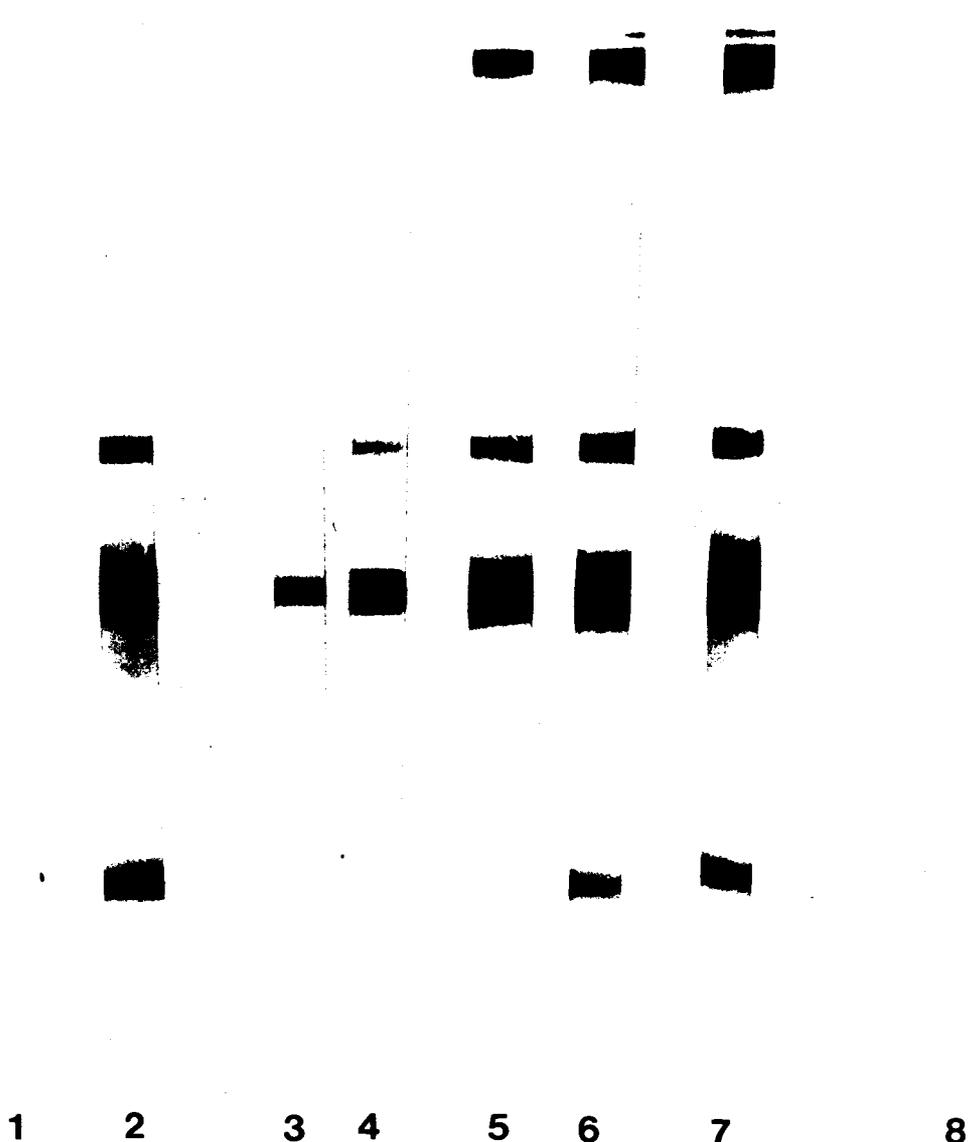
5

6

7

8

FIGURE 4



ARTICLE 2

Identification d'épitopes T immunodominants au sein d'un antigène de 23 kDa de *Toxoplasma gondii*.

Parmi les antigènes potentiellement vaccinnants, nous avons pu montrer, dans le premier article, que les molécules excrétées-sécrétées par le parasite étaient d'excellents candidats.

Dans ce deuxième travail, nous avons étudié la réponse cellulaire T vis-à-vis d'un antigène de 23 kDa cloné dans notre laboratoire. Cet antigène est excrété-sécrété par les tachyzoïtes et est présent au stade bradyzoïte. Cette étude a pu être réalisée grâce à des peptides de synthèse.

Dans un premier temps, nous avons étudié la réponse cellulaire T vis-à-vis des différents peptides synthétiques de la P24 dans différentes situations immunologiques : infection par la souche RH de *Toxoplasma gondii*, immunisation par les antigènes ES, immunisation par une construction particulière P24-Virus de la Vaccine. Nous avons donc identifié par test de prolifération les épitopes T immunodominants dans ces trois situations.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes plus particulièrement intéressé à un peptide : le peptide 170-193. En effet, ce dernier est bien reconnu au cours de l'infection et lors de l'immunisation avec les antigènes ES. Nous avons pu montrer que des lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 sont capables d'induire la survie de rats "Nude" après l'infection par *Toxoplasma gondii*. Ces lymphocytes T de spécificité anti-peptide 170-193 maintenus *in vitro* sont incapables d'induire une réponse humorale chez le rat "Nude", contrairement à ce qui avait été observé lors du transfert des lymphocytes T spécifiques des antigènes ES.

L'étude des épitopes T immunodominants de la P24 chez le rat a permis de montrer la reconnaissance des peptides 88-109, 170-193 et 194-208 dans trois situations immunologiques différentes. De plus, le peptide 170-193 est capable d'éliciter des lymphocytes T pouvant induire la protection de rats "Nude".

Discussion présentée page 123

TITLE

Identification of T cell epitopes within a 23 kDa antigen from *Toxoplasma gondii*.

RUNNING TITLE

P23 T cell epitopes

AUTHORS

Véronique Duquesne,* Claude Auriault,* Hélène Gras-Masse,°
Christophe Boutillon,° Françoise Darcy,* Marie-France
Cesbron-Delauw,* André Tartar° and André Capron*

*Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

°Laboratoire de chimie des Biomolécules
Institut Pasteur, 59019 LILLE cédex (FRANCE)

CORRESPONDANCE

Véronique Duquesne

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
Unité mixte INSERM 167-CNRS 624
INSTITUT PASTEUR, 59019 LILLE Cédex (FRANCE)

SUMMARY

Among the potentially vaccinating antigens, the products excreted-secreted (ES) by the parasite *Toxoplasma gondii* have been demonstrated to be excellent candidates. The molecular cloning of one of these antigens (P24) present in ESA has recently been carried out in our laboratory. The recombinant antigen P24 corresponds to a native molecule of 23 kDa. In the present work, we were interested in determining the main epitopes of the P24 antigen eliciting a T lymphocyte response using synthetic peptides derived from the primary structure of P24. Five peptides namely the 64-79, 88-109, 170-193, 194-208 and 231-250 peptides were synthesized according to their hydrophobicity, mobility and accessibility profiles.

The presence of T lymphocyte epitopes in these peptides has been examined in the rat model. The determination of T cell epitopes was carried out using T lymphocytes from infected rats, ESA and P24 vaccine immunized rats. The results showed that the stimulation of T cells with these peptides varied according to the day of *Toxoplasma* infection. The main T cell stimulation was obtained with the 88-109, 170-193 and 194-208 peptides. When the Fischer rats were immunized with ESA, a most significant stimulation was achieved with the 170-193 and 194-208 peptides. In addition, T lymphocytes primed with P24 vaccine immunization were more stimulated with the 88-109 and the 194-208 peptides. This study showed that P24 derived peptides specific T cells were elicited in the three experimental situations, although no antibody-response against the 23 kDa native antigen was evidenced in the Fischer rat model.

On the other hand, the native antigen (presented in the form of irradiated parasites) can induce a proliferative response of 170-193 peptide-specific T lymphocytes confirming that this peptide contains an important T cell epitope. The adoptive transfer into athymic rats of T helper cells recovered from 170-193 peptide-immunized Fischer rat conferred a significant protection of infected Nude rats whereas no antibody production was observed.

INTRODUCTION

In attempts to understand how the host responds to *Toxoplasma gondii* infection, a number of experiments indicate that T cell subsets must play an important role in cell-mediated immunity in toxoplasmosis. This is observed in different experimental model : mice, hamsters, guinea pigs (1,2,3,4).

With the athymic rat model, we have also shown that T cells were essential for the rat resistance against infection by this parasite (5,6).

The coccidian protozoa *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite of humans and other animals. Because this parasite can cause important lesions of foetus and toxoplasmic encephalitis in immunocompromized individuals, including transplant recipients (7) and patients with an acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (8), a vaccine against *Toxoplasma gondii* would be highly desirable for these populations at risk.

Among the potential vaccinating antigens, the molecules excreted-secreted by the parasite seem to be excellent candidates. Indeed, we have shown that sera (9) and T cells (6) from Fischer rats immunized with excreted-secreted antigens (ESA) can protect athymic rats which are otherwise susceptible to *Toxoplasma gondii* infection.

Recently, in our laboratory, a molecule of 23 kDa has been cloned (10). This secreted antigen is recognized by a serum of rabbit immunized with ESA and by sera from chronically infected humans. The recombinant proteins were immunogenic in mice, producing antibodies against the native P23. Immunocytochemical analysis located the native antigen in the dense granules of both tachyzoite and bradyzoite forms and showed that it is secreted into the parasitophorous vacuole.

In a the strategy of vaccination, it is interesting to produce a vaccine of a defined molecular composition. This molecular vaccine needs to include all the components capable of eliciting a protective immune response, notably the B cell as well as T cell epitopes. In this regard, the determination of the primary structure of P23 (10) has allowed the synthesis of peptides.

In the present study, the identification of the T cell epitopes of the 23 kDa antigen has been undertaken by using five synthetic peptides selected according to their probable epitopic structure. Among the five peptides, several show a certain importance in the T cell-mediated-immunity.

MATERIALS & METHODS

Culture medium. RPMI 1640 (Gibco, Courbevoie, France) containing 20 mM HEPES, 100U penicillin / ml, and 100 µg streptomycin / ml was supplemented with 2 mM L-glutamine, 5×10^{-5} M mercaptoethanol and 1 mM sodium pyruvate and inactivated fetal calf serum (FCS) (Boehringer Mannheim, Meylan, France).

Parasites. Tachyzoites were obtained in cell cultures according to the method of Betz (11). Briefly, the tachyzoites recovered from mice were inoculated into a cellular monolayer of HEP 2 cells after 48-72h of culture. The infection was performed in Dubelcco medium without FCS. The supernatant containing the parasites was generally recovered on day 6 or 7 (after day 4 after infection, the culture medium was changed every day).

Rats. Male inbred Fischer / ICO F 344 rats were used throughout the experiment. The animals were obtained from the animal production of Harlan Olac (Oxon, England). For protection experiments, female athymic Fischer rats also issued from the animal production of Olac.

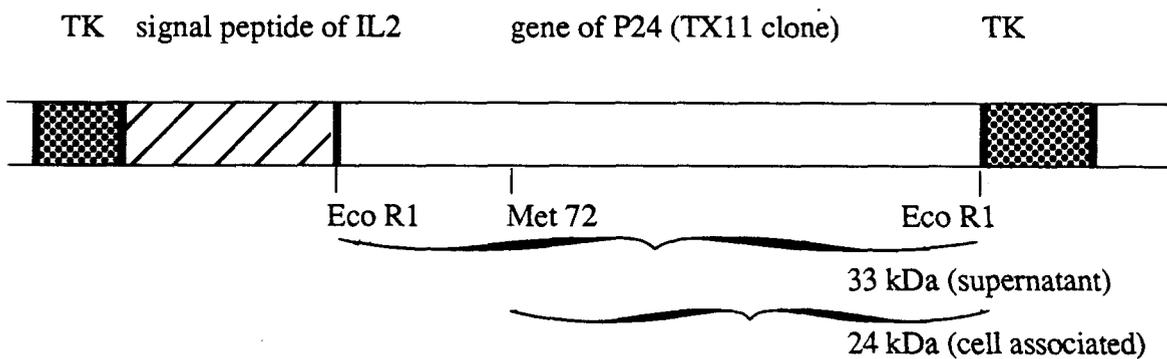


Antigen preparation.

-Soluble antigens (S2) and membrane antigens (CHAPS) were prepared as described by Duquesne et al. (6). Briefly, the tachyzoites were lysed in water. The supernatant contained the soluble antigens (S2) and the parasite pellet containing the membrane antigens was solubilized by the addition of detergent.

-Tachyzoite excreted-secreted products prepared as described (5) were used for the immunization of Fischer rats.

-The P24 recombinant vaccinia virus : The Eco R1 insert of TX11 cDNA (10) was cloned in frame with the sequences coding for the signal peptide and the first 8 amino acids of human IL2, flanked by region of the vaccinia virus TK gene. Transfer into vaccinia virus was performed as described (12), generating VVTG 2170 clone.



Infection and immunization.

-Inbred Fischer rats were infected with 10^6 parasites from culture cells in intraperitoneal route and the inguinal and mesenteric lymph nodes were harvested aseptically every week. The T cells were tested against the different synthetic peptides.

-In the same objective, Fischer rats were immunized at the base of the tail according to the method of Corradin et al (13) with ESA (equivalent of 10^8 tachyzoite excretory antigens) mixed 1/1 with Complete Freund Adjuvant (CFA). The second injection was performed without adjuvant after two weeks. T lymphocytes were recovered 5 days after. The same procedure was used for the immunization by bovine serum albumine (BSA).

-For the preparation of peptide-specific T cells, Fischer rats were immunized at the base of the tail by the 170-193 peptide coupled to BSA as a carrier (50 µg) with CFA for the first injection and without carrier and with Incomplete Freund Adjuvant (IFA) for the second and third injection at one week intervals.

-The preparation of recombinant P24-specific T lymphocytes was performed by the injection of the P24 vaccinia virus construction (described in the Antigen chapter) according to 2 protocols: The first is the injection of two doses of 10^8 pfu of vaccinia virus at the base of the tail. With this procedure, only inguinal and periaortic lymph nodes were recovered. The second consisted in the injection of the same dose by intraperitoneal route. The mesenteric and periaortic lymph nodes and the spleen were recovered.

Selection of peptides. The determination of the primary structure of P24 by sequencing the gene (10) allowed the prediction of exposed sequences according to accessibility criteria (14) (Figure 1). Prediction of α -amphipathic structures, presumably correlated to determinants recognized by T cells (15), was achieved by examining both helical propensity (16) and hydrophobic moment (17), calculated along the sequence for seven residue-blocks, considering a periodicity of an α -helix (i.e. 3.6 residue per turn, 100° per residue). The occurrence of the linear pattern proposed by Rothbard and Taylor (18) was also examined. Sequence numbering was according to the longest cDNA clone sequence described by Cesbron-Delauw (10). The open reading frame is likely to be initiated by Met-72, and a potential cleavage site is situated between residues 95 and 96. Thus, the 64-79 peptide was not likely to be present on the mature sequence, and was selected as control, while the 88-109 peptide contained the potential cleavage site and the putative 14 N-terminal residues of the mature protein. The four peptides (sequences 64-79, 170-193, 194-208 and 231-250) contained potential α -amphipathic structures, and at least one linear Rothbard' linear pattern.

peptides sequence (Rothbard patterns are underlined)

64-79	CysSerLeuLysLysSerSerLysMetValArgValSerAlaIleVal
88-109	CysLeuSerAlaGlyAlaTyrAlaAlaGluGlyGlyAspAsnGlnSerSerAlaValSerAspArg
170-193	ValGluGluValIleAspThrMetLysSerMetGlnArgAspGluAspIlePheLeuArgAlaLeuAsnLys
194-208	GlyGluThrValGluGluAlaIleGluAspValAlaGlnAlaGlu
231-250	AspGluMetLysValIleAspAspValGlnGlnLeuGluLysAspLysGlnGlnLeuLys

Peptide synthesis. Peptides were synthesized by solid-phase method, according to the Boc-TFA scheme (19), on chloromethyl-resins; side chain protection was as follows : Arg(tos), Cys(p-MeBzl), Asp(cHex), Glu(cHex), Ser and Thr(Bzl), Lys(ClBzl), Tyr(2,6-diClBzl). At the end of the synthesis, the peptide-resins were cleaved and deprotected by high HF procedure. The crude peptides were purified by preparative HPLC on a 5m-300Å C18 RP column, eluted with a 0-50% isopropanol, 0.1% TFA gradient. Peptides were checked for homogeneity by thin layer chromatography and analytical RP-HPLC, and for identity by amino-acid analysis after total acid hydrolysis.

Conjugation of peptides to the carrier protein. Peptides were conjugated to bovine serum albumin (BSA) with glutaraldehyde. The peptides (5 mmole) were dissolved in dimethyl formamide (500ml) and 0.1M sodium phosphate pH 8 (1ml), and introduced in a solution of BSA (4mg) in 0.1M sodium phosphate pH 8 (2ml). A 2.5% glutaraldehyde solution (60ml) was progressively added with continuous stirring. After two days, the resulting mixture was exhaustively dialyzed against 0.1M sodium phosphate pH 7, NaCl 0.9%. The conjugates were sterilized by filtration on 0.22µm filters (Sartorius, Göttingen, Germany). Mass ratio of peptide to carrier protein was determined from amino-acid composition (20), and were between 0.18 mg to 1 mg peptide per mg carrier.

Proliferation assay. T lymphocytes isolated by passage through a nylon wool column (21) were tested for their ability to proliferate to antigen (synthetic peptides, irradiated tachyzoites and BSA) by the measurement of thymidine incorporation. Assays were done in flat-bottomed 96-well tissue culture plates (Falcon 3072) in triplicate. The cells were cultured at 37°C with 5% CO₂ in humidified air. On day 5, the cultures were pulsed with [³H] thymidine (0.5 μCi /well) 18h before harvesting by using a cell harvester (Skatron, Norway). [³H] thymidine incorporation was measured by using liquid scintillation counter.

***In vivo* transfer of 170-193 peptide-specific T cells.** On day before infection with 10³ tachyzoites collected from infected culture cells, 10⁴ 170-193 peptide-specific T lymphocytes were injected i.v (just after recovering). into each athymic rat. Control nude rats were injected intravenously with 10⁴ BSA-specific T lymphocytes. Control rats were only i.p. infected.

For the determination of the helper role of these T cells, the same protocol was used but this time, 10⁶ 170-193 peptide-specific T lymphocytes (propagated in *in vitro* for 4 weeks) were injected before infection and the athymic rats were bled every week.

Western blotting of SDS-PAGE. SDS-PAGE was carried out on slab gels according to the Laemmli method (22). Gels were composed of a 5% acrylamide stacking gel and a homogeneous 13% acrylamide separating gel. Total toxoplasma antigen (S2-CHAPS extract) was separated by electrophoresis and transferred from the separating gel to a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schüll, BA 45, FRG) by using procedures based on those of Towbin et al. (23).

Fixed IgG from athymic rats was revealed by incubation with peroxidase labeled anti-rat IgG (Miles Laboratories, Inc., Naperville, IL) and stained by addition of the enzyme substrate.

RESULTS

Determination of P24 antigen T cell epitopes in infected rats. To investigate the dynamic sight of the fine cellular specificities during the course of *Toxoplasma gondii* infection, the T cell response towards P24 antigen derived synthetic peptides has been carried out in rat. Evidence of P24 peptides specific response of lymphocytes was determined by incubating nylon wool-separated inguinal and mesenteric T lymphocytes of infected Fischer rats. These lymph nodes were harvested on day 0, 7, 21, 35, 42, 49 after infection with 10^6 tachyzoites by intraperitoneal route (Figure 2). For this study, the peptides were coupled to BSA. Indeed, not coupled P24-peptides did not induce proliferative response of T lymphocytes in our experimental conditions (data not shown). Figure 2 shows the stimulation of T cells from infected rats at a concentration of 10 μ g/ml.

The kinetic of P24 peptides specific response show that peptides recognized by T lymphocytes varied during the course of infection. At day 0, T lymphocytes were not stimulated by the different peptides or BSA as a control. The main T cell stimulating peptides were the 88-109 peptide (J21), 170-193 peptide (J21 ; J35), and the 194-208 peptide (J35 ; J42). BSA alone never stimulated the T lymphocytes of infected rats. These first results showed that the native form of P24 can prime specific T lymphocytes during the infection of rats.

Stimulation of ESA-specific T lymphocytes with P24 antigen-derived peptides. As the P23 antigen is present in excreted-secreted products, the response of ESA specific T cells against the P24 synthetic peptides was studied. ESA-specific T cells were recovered from ESA-immunized Fischer rats five days after the second injection. Our results indicate (Figure 3 representative of three experiments) that most of the P24 peptides were able to induce the *in vitro* proliferation of ESA specific T cells. Nevertheless among the five

peptides, the 170-193 and 194-208 allowed a higher response. On the contrary, a weaker proliferation was obtained with the other peptides of the P24 molecule (64-79, 88-109 and 231-250). In addition, no proliferation was observed with the carrier protein (BSA).

Determination of T cell epitopes of P24 molecule in Fischer rats immunized with P24 recombinant vaccinia virus (VVTG 2170). The immunization of Fischer rats with the VVTG 2170 construction had been undertaken to determine the T cell epitopes of this molecule with the help of the five synthetic peptides. With the two immunization procedures (at the base of the tail : Fig.4 and in intraperitoneal way : Fig.5), a greater *in vitro* proliferation was obtained with the 88-109 and 194-208 peptides. In addition, when VVTG 2170 was injected in intraperitoneal route, spleen cells and lymph node cells were stimulated with the same peptides.

Preparation of 170-193 peptide-specific T cells and *in vivo* transfer of these cells into nude rats. The choice of the preparation of 170-193 peptide-specific T cells has been envisaged for two reasons : (1) this peptide contains T cell epitopes in view of the results presented in the previous chapter either when T cells were recovered from infected rats or from rats immunized with ESA; (2) the monoclonal anti-P24 antibody prepared in our laboratory (TG17-43)(24) recognized only the peptide 170-193 demonstrating that a B cell epitope is also present. In the rat model, no antibody response against the P23 antigen during infection or after ESA or 170-193 peptide-immunizations has been shown. However, the immunization with this peptide can prime T lymphocytes (Figure 6). Indeed these T cells proliferated with either the 170-193 peptide coupled to BSA (Figure 6a,b) or irradiated tachyzoites (representing the native antigen, Figure 6c) but neither in the presence of the same peptide when not coupled, nor by the carrier protein (BSA). The 170-193 peptide-specific T cells are not restimulated by other P24 peptides as the 64-79 and 231-250 peptides (Figure 6a).

In order to analyse the potential protective effect of 170-193 peptide-specific T lymphocytes, a passive transfer of 10^4 T cells (just after recovering) into athymic rats was performed one day before their infection with 10^3 tachyzoites. Fifty percent of the rats receiving 170-193 specific T cells were totally protected even after a challenge infection with 10^3 tachyzoites (Figure 7). The athymic rats protected by the 170-193 peptide-specific T cells were bled and the IgG response of the sera was analyzed in immunoblotting (Figure 8). One of the rats showed an antibody-response against the P30 antigen(s) complex demonstrating that the T cell epitope present in the 170-193 peptide elicits T cells functional *in vivo*. In contrast the other rats did not present any IgG response suggesting that these antibodies were not totally necessary for the conferred protection.

Helper role of 170-193 peptide-specific T cell lines maintained in *in vitro* culture. T cells from 170-193 peptide or from BSA immunized rats were cultured *in vitro* for one month in the presence of irradiated tachyzoites or BSA and of irradiated antigen presenting cells. In order to analyse the possibility of these 170-193 peptide-specific T lymphocytes to induce an antibody-response, athymic rats were adoptively transferred with 10^6 T cells from BSA or 170-193 peptide-immunized Fischer rats one day before their infection with 10^3 tachyzoites. Every week, the animals were bled and their sera were tested by dot-immunoassay, immunoblotting with total extract antigen and immunoprecipitation with Methionine ^{35}S labelled ESA. No one of these three methods allowed the demonstration of an antibody-response against *Toxoplasma* antigen either in the sera of rats having received 170-193 peptide-specific T cells or BSA-specific T cells. These results suggest that the T lymphocytes induced by the immunization with this peptide are not able to help an IgG-response in the nude rat model.

DISCUSSION

The role of tachyzoite excreted-secreted antigens (ESA) in the immunity developed against the *Toxoplasma* infection has been clearly demonstrated in our laboratory. Indeed, Darcy et al. (9) have shown that the passive transfer of sera from ESA-immunized euthymic Fischer rats to genetically athymic rats, infected by lethal doses of the highly virulent RH strain of *Toxoplasma gondii*, conferred a significant level of protection. In addition, T cell line specific for excreted-secreted products can adoptively protect susceptible nude rats against a challenge infection with *Toxoplasma gondii*. The reconstituted infected nude rats developed an antibody response able to recognize *Toxoplasma* antigens (6).

In the strategy for cloning protective vaccine antigens of *Toxoplasma gondii*, based on the hypothesis that definitive protection observed in the natural infection is due to the presence of encysted bradyzoite forms in host tissue, a 24 kDa molecule has been cloned (10). In view of the results indicating the crucial role of ESA in immunity against toxoplasmosis (9, 6, 25), investigations concerning immunogenicity of this protein have been undertaken.

The purpose of our study, was to consider the recognition of synthetic peptides, derived from the primary structure of P24, by T lymphocytes educated against the native P23 molecule, either after immunization with ESA and P24 recombinant vaccinia virus, or during *Toxoplasma gondii* infection.

Analyzing this series of results, it appeared that T lymphocytes from infected rats or rats immunized with ESA can be stimulated by the synthetic peptides. During the rat infection, the T cell response dependent upon the different synthetic peptides varied. Indeed, at the beginning of the infection, infected rat T cells recognized the 88-109 epitope containing peptide. On the contrary, at day 35 of infection, an optimal *in vitro* proliferation can be observed with the 170-193 peptide. From the day 42 after infection, the whole cellular response decreased.

When the cellular responsiveness generated against ESA-immunization was examined, the 170-193 and 194-208 epitope containing peptides allowed a better proliferative response than the other synthetic peptides. When the P24 antigen is presented with the vaccinia virus to the immune system, T lymphocytes elicited after the subcutaneous or intraperitoneal immunization recognized mainly the 88-109 and 194-208 peptides.

In these experimental conditions, lymph node or spleen cells are not able to be stimulated by the synthetic peptides not linked to a carrier protein (BSA). One of the possible explanations of this observation could be that the binding could stabilize the peptide conformation or reduce their processing by the antigen presenting cells. In addition, we can observe that the cellular responsiveness generated against the P24 molecule is different during the course of infection and after immunization with ESA or P24 recombinant vaccinia virus. Different routes of injection and modes of antigen presentation to the immune system can induce various T cell-responses. The roles of antigen-presenting-cells and the molecular environment of the presented antigen seem to be two crucial parameters in the induction of the immune responses.

After the infection with *Toxoplasma gondii* or ESA-immunization, the proliferative response lymph node cells was the highest when stimulated with the 170-193 epitope containing peptide. The immunization of rats with this peptide has showed that the elicited T cells were restimulated *in vitro* with the 170-193 peptide linked to BSA but interestingly also with irradiated parasites. A T cell line specific for this peptide has been established *in vitro* and its functional role *in vivo* has been studied after its adoptive transfer into recipient nude rats, one day before the infection. This transfer of 10^4 T lymphocytes (just after recovering) induced a significant protection of the rats. Fifty percent of the rats receiving 170-193 specific T lymphocytes were totally protected even after a second challenge infection. These T cells can thus induce effector mechanisms suggesting that the 170-193 peptide contains an epitope involved in the protective immunity toward the parasite. Among these mechanisms, antibodies seem not to be essential in the conferred protection since only one of the rats showed an significant IgG antibody-response against the P30 antigen(s) complex. When the helper role of these cells was studied by adoptive transfer of 10^6 T lymphocytes cultured *in vitro* one month

with irradiated tachyzoites, no antibody-response can be observed after the infection of athymic rats. These data confirmed the previous observations showing that in Fischer rats no antibody-response against the native form of antigen or the P24 traduction product can be obtained after infection, immunization with ESA or with the 170-193 peptide. These T lymphocytes specific for the 170-193 epitope containing peptide are probably not directly involved in the antibody production. The question asked by these results is by which mechanism the T lymphocytes interfere in the protection of athymic rats against toxoplasmosis? Our experiments show that IgG antibodies did not seem to play an important role. This suggested that the main activity of these cells would be their involvement in cellular effector mechanisms. The 170-193 peptide specific T lymphocytes could act through the production of lymphokines notably interferon γ (INF γ) for the activation of macrophages as described by several other laboratories (26, 27). Another hypothesis is the induction of cytotoxic lymphocytes (CTL). Recently, Khan et al.(28) have described T lymphocytes exhibiting the Thy 1,2⁺, lyt 2,3⁺ phenotype directly cytotoxic against extracellular parasites. Therefore, the T lymphocytes elicited after the immunization with the 170-193 peptide could either be directly cytotoxic for the parasites or, that is most likely, could help for the generation of CTL through the production of interleukin 2 (IL2). The exact role of the T lymphocytes specific for the peptide 170-193 in the resistance of athymic rats infected with *Toxoplasma gondii* still remain to be defined.

This study is the first determination of T immunodominant epitopes of an excreted-secreted antigen in toxoplasmosis. The ability to predict peptidic sequences most likely eliciting T cell reactivity allows a potential application of synthetic immunogens as vaccine. Indeed, T cell immunity is necessary not only for a cellular immune defence against pathogens, but also for help for an antibody-response and cytotoxic T cell activity. Therefore, any vaccine should have not only sites which elicit antibodies, but also sites which elicit T cells. In this present work, we reported the presence in the P24 antigen of T immunodominant epitopes which probably preferentially induced a cellular mediated immunity. Interestingly the 170-193 peptide also contained a B cell epitope. A monoclonal anti-P24 prepared in our laboratory (TG 17-43) recognized this peptide (Charif H, pers. comm.). The study of other protective antigens in toxoplasmosis is

currently carried out in our laboratory. The characterization of T and B immunodominant epitopes in these molecules could favour the development of a synthetic vaccine that would optimize an effective immune-response.

LITERATURE CITED

1. **Frenkel, J.K.** 1967. Adoptive immunity to intracellular infection . J. Immunol. 98:1309-1319
2. **Pavia, C.S.** 1986. Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. J. Immunol. 137:2985-2990
3. **Lindberg, R.E., and J.K. Frenkel.** 1977. Toxoplasmosis in nude mice . J. Parasitol. 63:219-221
4. **Pavia, C.S.** 1986. Enhanced primary resistance to *Treponema pallidum* infection and increased susceptibility to toxoplasmosis in T cell depleted guinea pigs. Inf. Imm. 53:305-
5. **Santoro, F., C. Auriault, P. Leite, F. Darcy, and A. Capron.** 1987. Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris 304, serie III, 297-300
6. **Duquesne, V., C. Auriault, F. Darcy, J.P. Decavel, and A. Capron.** 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells. Inf. Imm. In press.
7. **Luft, B.J., Y. Naot, F.G. Araujo, B. Stinson, and J.S. Remington.** 1983. Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplantation. Ann. Int. Med. 99:27-31
8. **Mc Cabe, R., and J.S. Remington.** 1988. Toxoplasmosis : the time has come. N. Engl. J. Med. 318:313
9. **Darcy, F., D. Deslée, F. Santoro, H. Charif, C. Auriault, A. decoster, V. Duquesne, and A. Capron.** 1988. Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 10:553-567

10. **Cesbron-delaunay, M.F., B. Guy, G. Torpier, R.J. Pierce, G. Lenzen, J.Y. Cesbron, H. Charif, P. Lepage, F. Darcy, J.P. Lecocq, and A. Capron.** 1989. Molecular characterization of a 23 kDa major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**:7537-7541
11. **Betz, A.** 1968. Diagnostic sérologique de la toxoplasmose au moyen d'antigènes préparés sur cultures cellulaires. *Bull. Org. Mond. Santé.* **39**:367-374
12. **Kieny, M.P., R. Lathe, R. Drillien, D. Spehner, S. Skory, . Schmit, T. Wiktor, H. Koprowski, and J.P. Lecocq.** 1984. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature.* **312**:163-166
13. **Corradin, G., H.M. Etlinger, and J.M. Chiller.** 1977. Lymphocyte specificity to protein antigen induced in vitro T cell dependent proliferative response with lymph nodes from primed mice. *J. Immunol.* **119**:1048-1053
14. **Hopp, T.P., and K.R. Woods.** 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:3824-3828
15. **Delisi, C., and J.A. Berzofsky.** 1985. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:7048-7052
16. **Chou, Y., and G. Fasman.** 1974. Prediction of protein conformation. *Biochemistry.* **13**:222-244
17. **Eisenberg, D., R.M. Weiss, and T.C. Terwilliger.** 1984. The helical hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:140-144
18. **Rothbard, J.B., and W.R. Taylor.** 1988. A sequence pattern common to T-cell epitopes. *EMBO J.* **7**:93-100
19. **Merrifield, R.B.** 1963. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**:2149-2154
20. **Antoni, G., and R. Presentini.** 1989. A least squares computer method for determination of the molecular ratio of conjugates between two different proteins from the results of the amino acid analysis. *Analytical Biochem.* **179**:158-161

21. **Julius, M.H., E. Simpson, and L.A. Herzenberg.** 1973. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 3:645-649
22. **Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London).* 227:680-685
23. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:4350-4354
24. **Charif, H., F. Darcy, G. Torpier, M.F. Cesbron-Delauw, and A. Capron.** 1990. *Toxoplasma gondii* : Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* In press
25. **Ridel, P.R., C. Auriault, F. Darcy, R.J. Pierce, P. Leite, J.L. Neyrinck, J.P. Kusnierz, and A. Capron.** 1988. Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* 141:978-983
26. **Black, C.M., J.R. Catteral, and J.S. Remington.** 1987. *In vivo* and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon γ . *J. Immunol.* 138:491-49
27. **Murray, H.W., D. Scavuzzo, J.L. Jacobs, M.H. Kaplan, D.M. Libby, J. Schindler, and R.B. Roberts.** 1987. *In vitro* and *in vivo* activation of human mononuclear phagocytes by interferon γ . *J. Immunol.* 138:2457-2462
28. **Khan, I.A., K.A. Smith, and L.H. Kasper.** 1988. Induction of antigen specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 141:3600-3605

LEGENDS

Figure 1: Analysis of the P24 antigen sequence according to the accessibility criteria (14).

Figure 2: Proliferation of T lymphocytes from infected Fischer rats after *in vitro* stimulation with the five P24-derived synthetic peptides coupled to BSA, at days 0 (D0), 7 (D7), 21 (D21), 35 (D35), 42 (D42) and 49 (D49).

Figure 3: *In vitro* proliferation of ESA-immunized Fischer rat lymph node cells restimulated by various concentrations of the five P24-derived synthetic peptides (64-79, 88-109, 170-193, 194-208, 231-250) linked to a carrier protein (BSA).

Figure 4: Activation of lymph node cells from Fischer rats immunized with the P24 recombinant vaccinia virus after incubation with the synthetic peptides coupled (C) on BSA. The irrelevant antigen used in these experiments was BSA.

Figure 5: *In vitro* proliferative response of spleen cells (5a) and lymph node cells (5b) from Fischer rats immunized with the P24 recombinant vaccinia virus after stimulation with the synthetic peptides. Proliferations were obtained with the dose of 50 µg of antigen per ml.

Figure 6: Activation of lymph node T cells from Fischer rats immunized with the peptide 170-193 after incubation with the 170-193, 231-250 and 64-79 synthetic peptides coupled to BSA, with 170-193 peptide no coupled (**6a**). In another experiment, T lymphocytes were restimulated with either irradiated parasites (**6c**) or with the 170-193 peptide coupled or no coupled on BSA (**6b**).

Figure 7: Adoptive transfer of 10^4 T lymphocytes from 170-193 peptide (■) and BSA-immunized Fischer rats (×) into athymic rats. Control rats (.) were not transferred. All animals were infected with 10^3 tachyzoites of the RH strain.

Figure 8: Western blot analysis of Toxoplasma antigens. SDS-PAGE analysis (13 % acrylamide) in unreduced conditions and blotting developed by sera from:

- uninfected Fischer rat (lane 1)
 - uninfected Nu/Nu Fischer rat (lane 2)
 - ESA-immunized Fischer rats (lane 3, 4)
 - 170-193 peptide-immunized Fischer rats (lane 5, 6)
 - reconstituted by 10^4 170-193 peptide-specific T cells and infected athymic Fischer rats (lane 7, 8)
 - reconstituted by 10^4 BSA-specific T cells and infected athymic Fischer rat (lane 9)
- and by the monoclonal antibody TG 17-43.

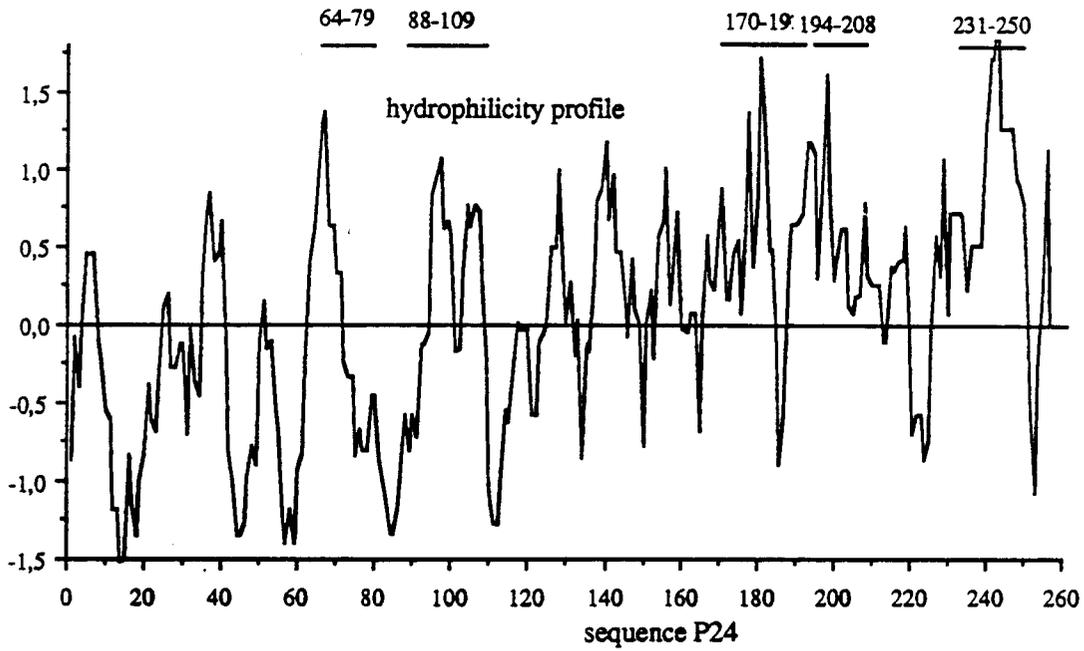
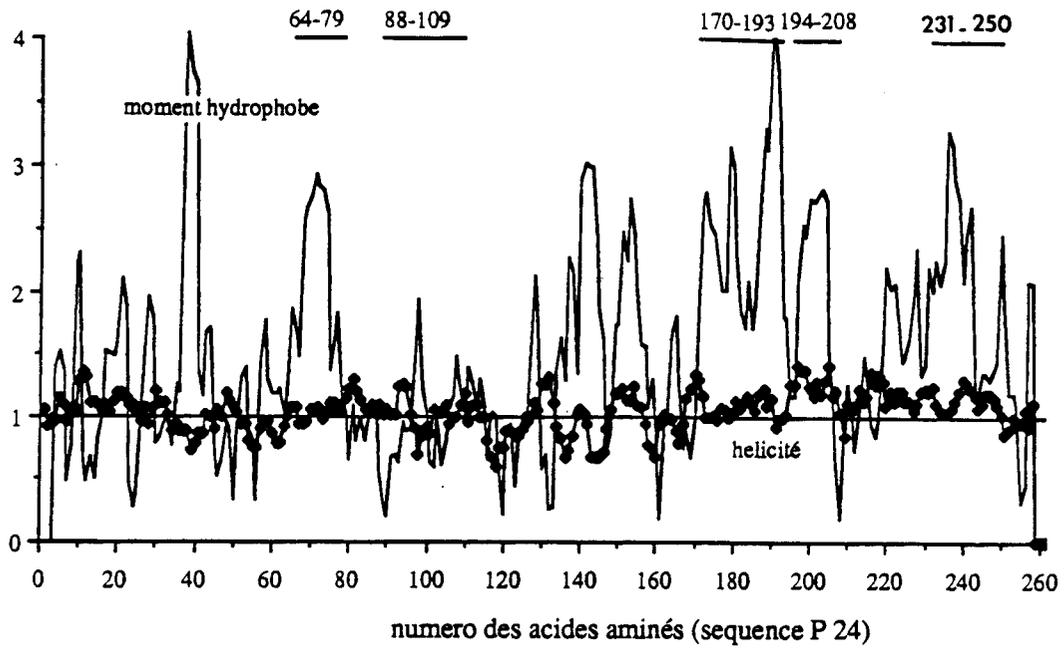


FIGURE 1

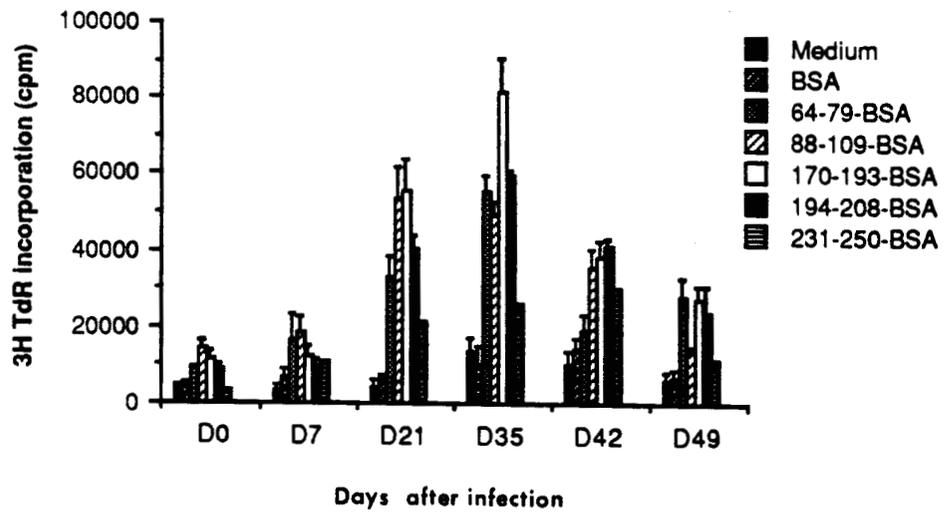


FIGURE 2

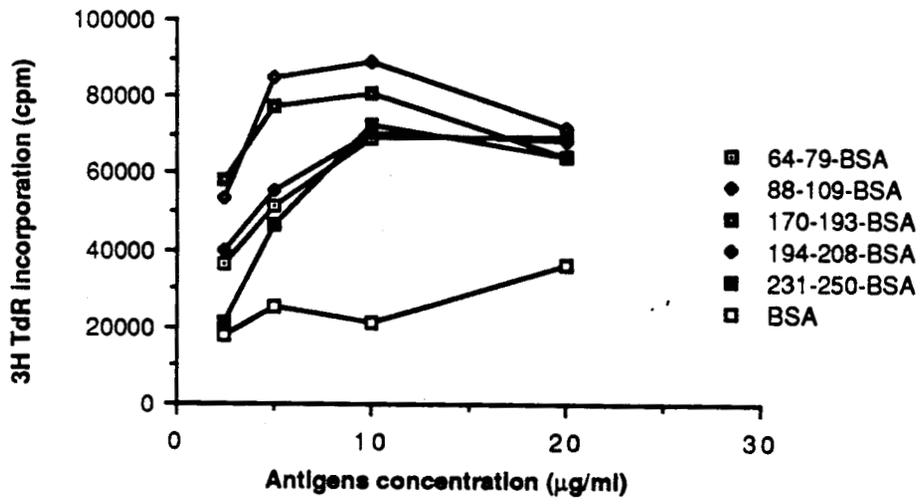
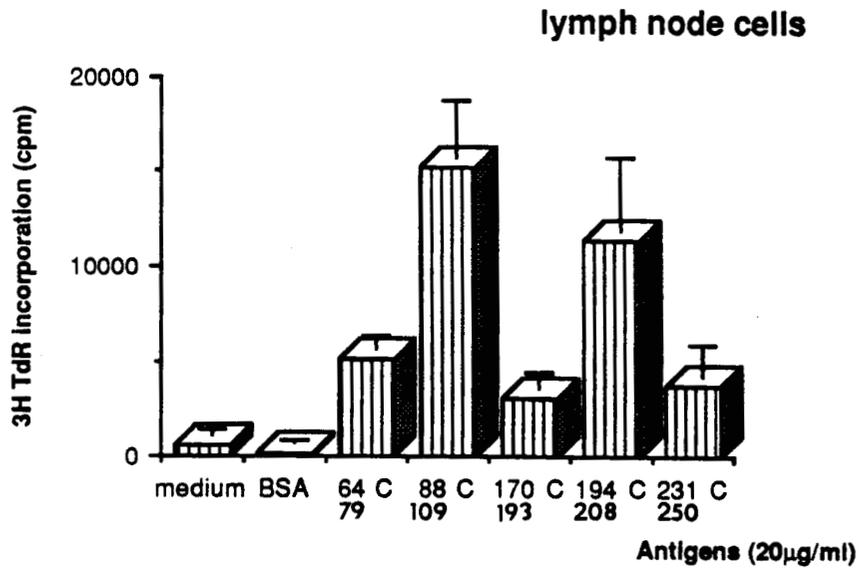


FIGURE 3

**FIGURE 4**

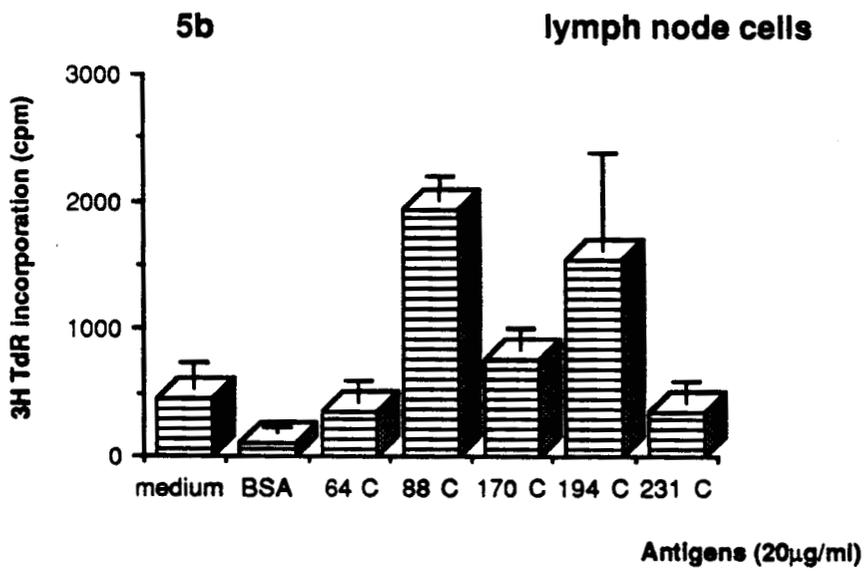
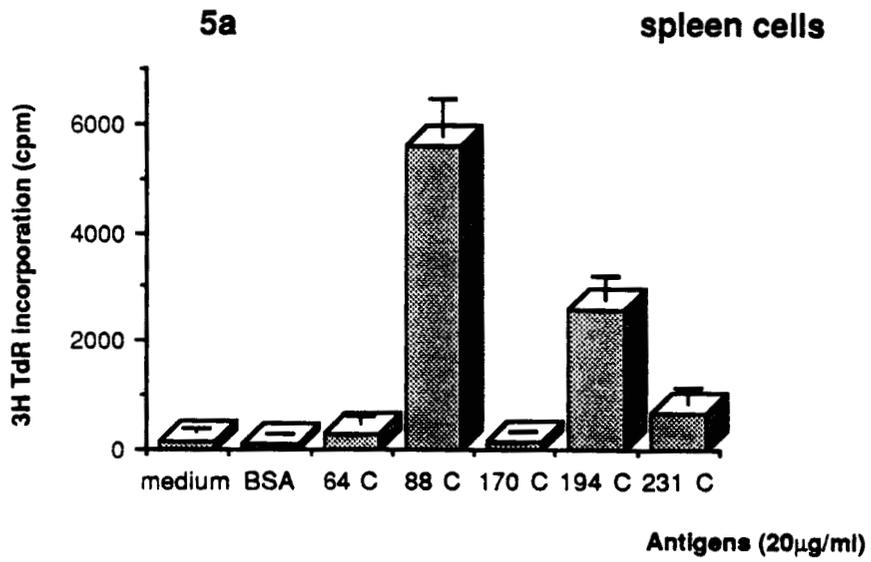


FIGURE 5

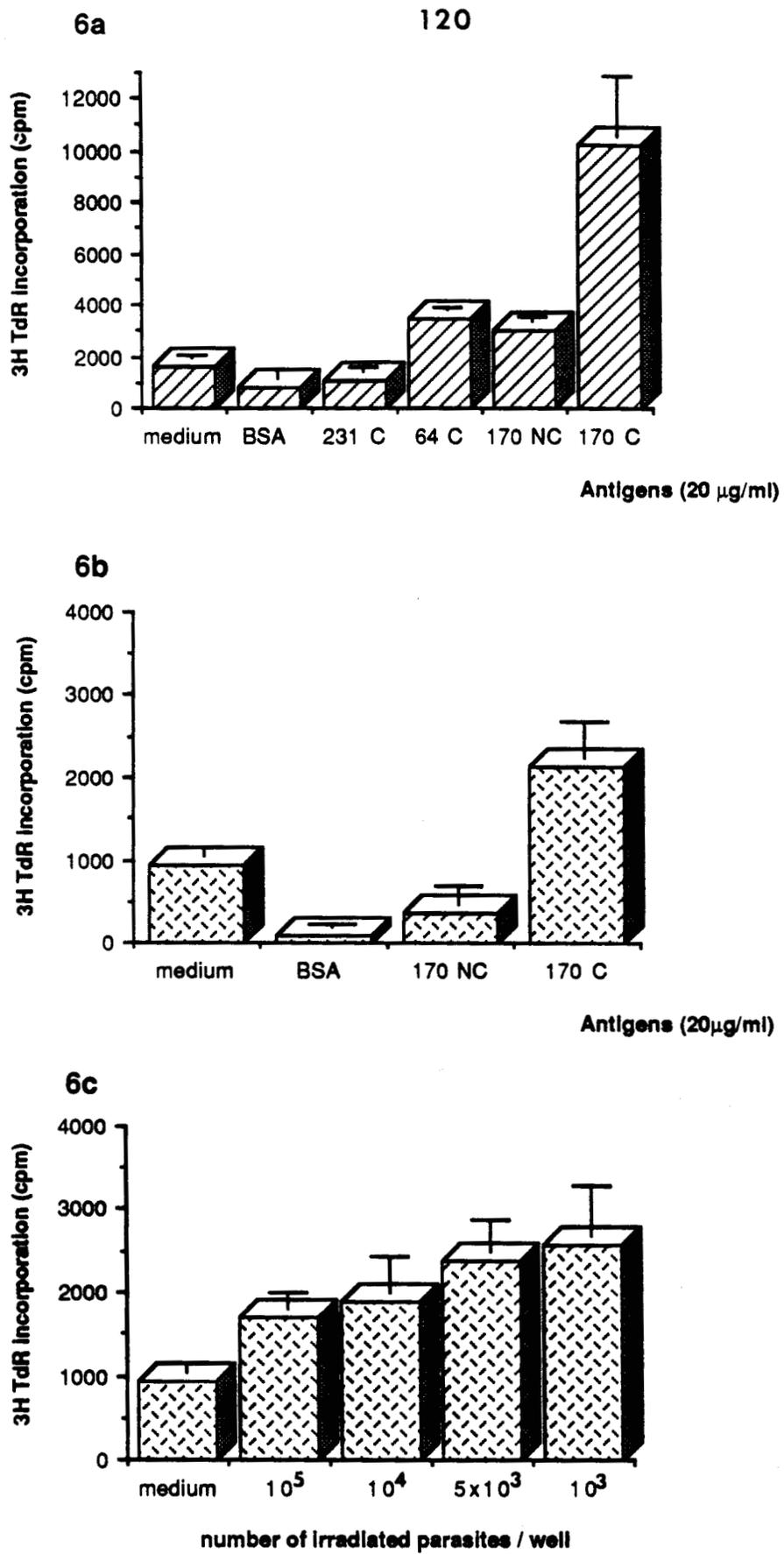
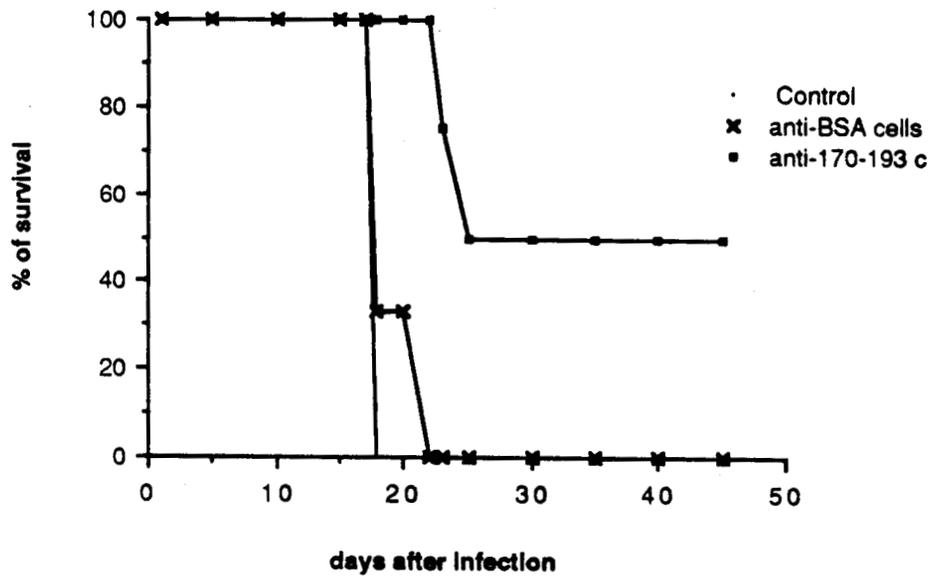


FIGURE 6

TRANSFER OF 170-193 PEPT. SPECIFIC T CELLS IN NUDE RAT**FIGURE 7**

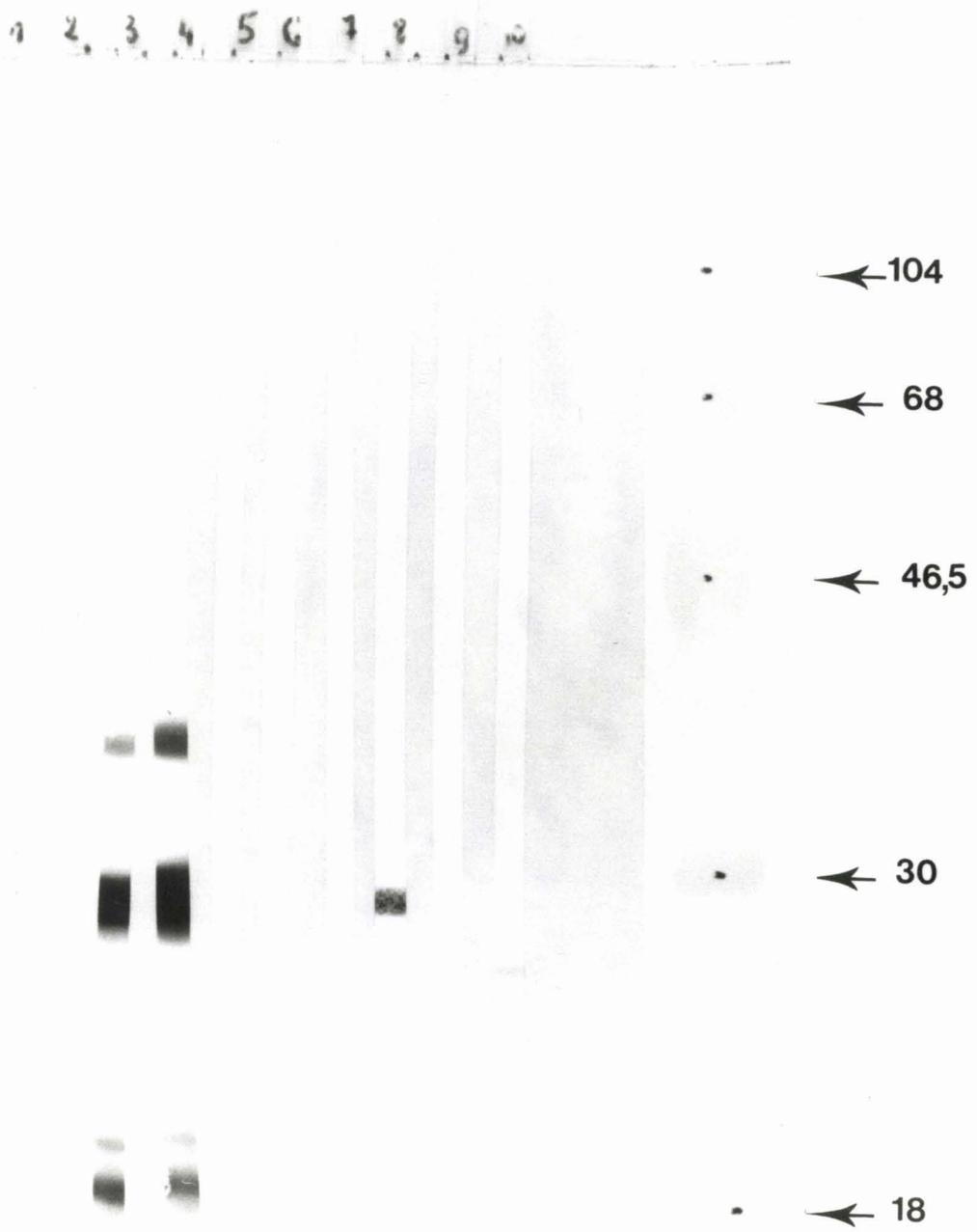


FIGURE 8

DISCUSSION - CONCLUSION

La réponse cellulaire au cours de la toxoplasmose est un paramètre important de l'immunité développée par l'hôte intermédiaire infecté par *Toxoplasma gondii*. L'utilisation d'un modèle expérimental original : le rat Fischer génétiquement athymique ("Nude"), a permis dans ce travail de confirmer très clairement l'implication des lymphocytes T. En effet, chez ces rats déficients en lymphocytes T, la toxoplasmose conduit à une issue fatale contrairement aux rats Fischer euthymiques, naturellement résistants. Ceci suggérait que la résistance du rat à la toxoplasmose était en étroite relation avec la réponse cellulaire T. Ce modèle expérimental permet donc d'étudier *in vivo* non seulement la composante cellulaire (par transfert adoptif de cellules T) mais aussi la composante humorale (par transfert passif de sérums ou d'anticorps monoclonaux) de l'immunité au cours de l'infection par *Toxoplasma gondii*. L'intérêt de ce modèle est intensifié par le fait que des patients atteints de SIDA (infection rétrovirale se traduisant par une diminution d'une sous-population lymphocytaire T) montrent une grande fréquence d'encéphalites toxoplasmiques qui leur sont souvent fatales. De plus, presque tous les cas se

produisent chez des individus ayant une évidence sérologique de toxoplasmose chronique. Ces observations marquent l'importance de l'immunité T-dépendante dans le maintien d'une immunité protectrice.

Les premières approches réalisées dans notre laboratoire ont concerné tout d'abord le transfert de lymphocytes T provenant de ganglions mésentériques de rats Fischer sains 24h avant l'infection par la souche virulente RH de *Toxoplasma gondii* (Santoro et al., 1987). Ce traitement a restauré de façon dose-dépendante leur résistance à l'infection. De plus, les rats "Nude" résistants à une primo-infection, résistent également lors d'une deuxième injection de toxoplasmes. Ces résultats indiquent bien le rôle essentiel joué par les cellules T dans le développement des mécanismes contrôlant de manière durable la toxoplasmose du rat. Parmi les mécanismes effecteurs jouant un rôle dans la destruction du parasite, la cytotoxicité dépendante d'anticorps pourrait être envisagée. En effet, les animaux protégés montrent une réponse anticorps spécifique du parasite.

Nous nous sommes attachés à identifier les antigènes qui pourraient intervenir efficacement dans l'immunité développée lors de la toxoplasmose. Notre stratégie s'est donc basée sur les concepts suivants :

1) le caractère chronique de l'infection implique que l'antigène doit être présent à différents stades du développement du parasite. En effet, dans les infections caractérisées par une immunité non stérilisante, comme la toxoplasmose en raison de la persistance de parasites enkystés, une réponse protectrice efficace ne peut être maintenue que si des épitopes communs sont exprimés à la fois dans les stades parasitaires présents au cours de l'infection aiguë (tachyzoïte) et de l'infection chronique (bradyzoïte) (Capron et Dessaint, 1988).

2) le système immunitaire doit être stimulé par des antigènes autres que ceux continuellement présents à la surface du parasite: comme les antigènes excrétés-sécrétés (antigènes ES), permettant ainsi une stimulation efficace du système immunitaire. De plus, dans notre laboratoire, le rôle et l'implication de ces antigènes ES lors d'une infection par *Schistosoma mansoni* ont pu être démontré; ces antigènes présentent également en plus une activité enzymatique (GST) qui maintiendrait la survie du parasite

chez son hôte (Taylor et al., 1988,).

De ce fait, ces antigènes ES pourraient constituer de meilleurs candidats à l'immunoprophylaxie que les antigènes somatiques.

Les travaux exposés dans la première partie de ce mémoire ont permis de confirmer le rôle essentiel de la composante cellulaire T dans la toxoplasmose du rat, ainsi que celui d'antigènes excrétés-sécrétés par le parasite grâce à des expériences de transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de ces antigènes à des rats "Nude".

Dans une deuxième partie, le clonage d'un antigène (Cesbron-Delauw et al. 1989-1) ayant les propriétés requises, à savoir étant excrété-sécrété mais aussi commun aux deux stades de développement chez l'hôte intermédiaire, le tachyzoïte et le bradyzoïte, a permis de définir les épitopes T immunodominants de cet antigène.

A- Rôle des antigènes ES dans l'immunité contre la toxoplasmose

Les résultats présentés dans ce travail montrent que des lymphocytes T éduqués vis-à-vis d'antigènes excrétés-sécrétés sont capables de prolonger la survie des rats "Nude" après l'infection. En effet, 60% des animaux transférés avec des lymphocytes T de spécificité anti-antigènes ES (à une dose de seulement 10^4 cellules par rat) survivent à l'infection alors que la totalité des animaux transférés avec des lymphocytes T spécifiques d'un antigène irrelevant (BSA) n'a pas résisté à la même infection. De plus, des rats ayant reçus 10^5 cellules T de spécificité anti-antigènes ES sont résistants à une seconde infection: ces cellules sont capables d'entraîner une immunité protectrice durable contre la réinfection. Parmi les cellules transférées existait donc une sous-population cellulaire à durée de vie longue, spécifique des antigènes ES puisqu'elle est restimulée lors d'un second contact avec l'antigène (lors de l'infection) et capable de déclencher des mécanismes effecteurs efficaces et protecteurs. Parmi les antigènes excrétés-sécrétés par *Toxoplasma gondii*, il existerait une ou plusieurs molécules qui génèreraient la stimulation de lymphocytes T impliqués dans ces mécanismes aboutissant à l'élimination du parasite.

Ces résultats montrent clairement qu'avec le transfert de 10^5 et 10^4 cellules T de spécificité anti-antigènes ES, la résistance des rats "Nude" apparaît équivalente à celle obtenue lors du transfert de 10^6 cellules T non spécifiques provenant d'animaux sains (Santoro et al., 1987). Grâce à la spécificité des cellules transférées, le nombre de lymphocytes nécessaire à l'induction d'une immunité protectrice est très fortement diminué.

Afin d'essayer de comprendre par quel mécanisme immunologique le transfert de lymphocytes T de spécificité anti-antigènes ES entraînait cette protection durable des rats "Nude", nous avons analysé la réponse humorale de ces animaux. En effet, plusieurs mécanismes faisant intervenir les anticorps dans la destruction du parasite ont été largement décrits. C'est le cas notamment de l'action des anticorps spécifiques en présence de complément relatée par Sabin et Feldman (1948). Les anticorps circulants peuvent également après s'être fixés sur les parasites, permettre leur destruction par des macrophages (Anderson et al., 1976-1 ; Hauser et Remington, 1981 ; Sethi et al., 1981) ou par des cellules agissant par ADCC. Toutes ces hypothèses impliquent l'accès direct des anticorps anti-antigènes ES aux parasites : la présence de certains antigènes ES à la surface des tachyzoïtes a été confortée par

l'observation d'une fluorescence après l'utilisation de sérum de rats ou de souris immunisées par les antigènes ES dans la technique d'immunofluorescence (Darcy, comm. personnelle).

Dans nos expériences, nous avons pu montrer que des rats "Nude", normalement incapables de développer une réponse humorale font une réponse anticorps anti-antigènes ES après transfert de lymphocytes T dirigés contre les antigènes ES. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Darcy et al. (1988) qui montrent *in vivo* dans le modèle rat "Nude" que des sérums d'animaux immunisés avec les antigènes ES protègent ces rats contre une infection fatale. Les lymphocytes T de spécificité anti-antigènes ES transférés ont donc une fonction "helper" d'une réponse anticorps protectrice de spécificité anti-antigènes ES par production de lymphokines. Afin de pouvoir affirmer que ces anticorps sont bien responsables de la protection observée, des sérums de rats "Nude" protégés par ces lymphocytes T spécifiques des antigènes ES devraient être transférés à leur tour à d'autres rats "Nude". Nous avons pu montrer dans le sérum de ces animaux reconstitués puis infectés la présence d'IgG et d'IgE spécifiques pour le parasite. Le rôle des IgE dans l'immunité protectrice anti-toxoplasme a été démontré récemment dans notre laboratoire par Ridet et al. 1988 qui ont décrits l'existence d'une cytotoxicité plaquettaire IgE dépendante vis-à-vis du tachyzoïte.

Il est intéressant de constater que l'immunisation par les antigènes ES en présence d'adjuvant complet de Freund après transfert de cellules T spécifiques de ces mêmes antigènes, entraîne préférentiellement la production d'IgE mais pas ou très peu d'IgG.

Ces résultats suggèrent qu'à partir d'une même population cellulaire T, l'orientation de la réponse immunitaire dépend fortement de la présentation de l'antigène. En effet, cette présentation n'est certainement pas la même puisque l'infection est faite par voie intrapéritonéale et l'immunisation par voie sous-cutanée. La possibilité d'une présentation par des cellules présentant l'antigène (CPA) différentes n'est pas à exclure. De plus, l'environnement de l'antigène lui-même est aussi un facteur important: en effet, les antigènes présentés par un parasite ne doivent pas être "reconnus" de la même manière par le système immunitaire que le sont des antigènes solubles provenant d'un extrait parasitaire.

Ces observations ont été décrites dans l'infection à *Leishmania* par la présence de deux sous-populations T "helper" sécrétant différentes lymphokines: LTh1 (Interféron γ : INF γ , Interleukine 2) et LTh2 (Interleukine 4, Interleukine 5) suivant le contexte immunologique (Liew F.Y. 1989). Ces deux sous-populations T (CD4⁺) peuvent être

induites par immunisation par des parasites morts ou avec des antigènes purifiés en utilisant différentes voies d'administration. Dans leur modèle, les voies intraveineuse ou intrapéritonéale induiront plutôt des cellules T protectrices de type Th1, alors qu'en sous-cutanée ou intramusculaire des cellules T de type Th2 favorisant la maladie seront induites. Les cellules T protectrices sécrètent de l'INF γ après une stimulation antigène-spécifique. L'INF γ est un activateur macrophagique induisant la destruction des parasites intracellulaires. Par contre, les cellules de type Th2 favorisant l'infection, peuvent produire de l'IL3 et de l'IL4 qui inhiberaient l'activation des macrophages par l'INF γ . Le mécanisme par lequel ces 2 lymphokines agiraient sur l'activité de l'INF γ n'est pas encore connu.

Pour ce qui concerne l'INF γ , un certain nombre de travaux ont montré le rôle qu'il peut jouer dans l'activation *in vitro* et *in vivo* des macrophages pour la destruction des toxoplasmes intracellulaires (Murray et al., 1985 ; Murray et al., 1987 ; Suzuki et al., 1988). De plus, Pfefferkorn et Guyre (1984) ont montré que l'INF γ humain pouvait également inhiber la croissance des parasites dans les fibroblastes. Cette activation se traduit par une augmentation de leur activité oxydative et antiparasitaire. Suzuki et al. (1988)

montrent chez la souris infectée que l'injection d'un anticorps monoclonal anti-INF γ entraîne la mort de l'animal alors que les souris n'ayant pas reçu ce traitement développent une toxoplasmose chronique. L'activation des macrophages *in vivo* est donc inhibée par l'administration de l'anticorps monoclonal. Cependant la production d'anticorps anti-*Toxoplasma gondii* n'est pas supprimée. L'INF γ endogène apparaît être l'un des médiateurs qui permet à la souris de survivre à cette infection.

Le rôle de l'INF γ dans l'infection par *Toxoplasma gondii* est actuellement étudié dans notre laboratoire dans des expériences de traitements préventifs et curatifs de rats "Nude" et de souris.

C'est pourquoi, dans notre modèle, l'étude des populations lymphocytaires produisant ces lymphokines est indispensable:

Quelle est la spécificité épitopique précise de ces cellules T anti-antigènes ES et quelle est leur fonctionnalité?

B- Etude d'un antigène ES majeur de 23 kDa

L'implication de cet antigène dans l'immunité développée contre l'infection par *Toxoplasma gondii* a été postulée sur les faits suivants:

1) C'est un antigène sécrété présent à différents stades de développement du parasite

2) Le produit de traduction de 24 kDa est reconnu par des sérums humains recueillis en phase chronique, lorsque l'immunité protectrice est établie, alors que des sérums de patients en phase aiguë ne reconnaissent pas cet antigène.

De plus, l'immunisation de souris avec la molécule recombinante (exprimée par le virus de la vaccine) entraîne une prolongation de la survie après l'infection (Cesbron-Delauw et al. 1989-2) et une réduction du nombre de kystes intracérébraux (50%) (Cesbron-delauw, comm. personnelle). Cet antigène apparaît donc comme un candidat protecteur potentiel. C'est pourquoi, des peptides synthétiques ont été construits et la détermination des épitopes T immunodominants chez le rat entreprise dans différentes situations immunologiques.

Nous avons pu montrer au cours de l'infection du rat Fischer par *Toxoplasma gondii* que des lymphocytes T peuvent être stimulés *in vitro* par les différents peptides. Ces expériences ont pu mettre en évidence le caractère dynamique de la reconnaissance des peptides de P24 par les cellules T au cours de l'infection. En effet, les peptides reconnus lors d'un test de lymphoprolifération ne sont pas les mêmes selon le jour de l'infection. Certains sont bien reconnus au début comme le 88-109, d'autres plus tardivement comme le 194-208, d'autres pas du tout ou très peu et c'est le cas du 231-250. La plus forte intensité de la réponse cellulaire T se situe environ à 35 jours d'infection avec un peptide: le 170-193 qui est reconnu tout au long de l'infection.

Lors de l'immunisation par les antigènes ES, comprenant l'antigène natif P23, deux peptides entraînent une stimulation plus importante des lymphocytes T: ce sont les peptides 170-193 et 194-208.

Malheureusement, ne disposant pas de P24 recombinante purifiée, nous n'avons jamais pu tester la molécule dans nos tests de lymphoprolifération.

D'autre part, l'immunisation par une construction P24-virus vaccine induit la stimulation de lymphocytes T reconnaissant deux peptides: le 88-109 et le 194-208. L'antigène P24 n'étant pas présenté de la même manière dans les différentes

situations, les lymphocytes T induits sont stimulés par différents peptides.

Néanmoins, parmi les cinq peptides synthétisés, le peptide 170-193 semblait particulièrement intéressant. En effet, nos différentes expériences montrent qu'il induit une stimulation des lymphocytes T d'animaux infectés ou immunisés avec les antigènes ES. De plus l'anticorps monoclonal TG 17-43 reconnaissant le clone P24 reconnaît uniquement ce peptide (Charif, comm. personnelle). Ce peptide contient donc au sein de sa séquence de 24 acides aminés au moins un épitope T et un épitope B. Sur ces bases de travail, une lignée T spécifique du peptide 170-193 a été établie. Ces lymphocytes T éduqués par le peptide 170-193 n'ont pu être testés vis-à-vis de la protéine recombinante, mais sont stimulés, à la sortie de l'animal, par l'antigène natif qui a été présenté dans notre test par des tachyzoïtes irradiés.

Afin d'apprécier la fonctionnalité *in vivo* de ces cellules, le transfert passif de 10^4 lymphocytes T (provenant de rats Fischer immunisés avec le peptide 170-193) aux rats "Nude" a été réalisé et a induit une survie de 50% des rats reconstitués. Ces lymphocytes de spécificité anti-peptide 170-193 pourraient donc induire des mécanismes effecteurs impliqués dans une immunité protectrice.

Un seul des rats protégés montre une réponse anticorps dirigée contre une molécule de 30 kDa environ. La protection ne semble pas due à la présence de ces anticorps. De plus, lors de l'étude du rôle helper de ces cellules, par transfert adoptif de 10^6 lymphocytes T mis en culture *in vitro* pendant un mois avec l'antigène natif (tachyzoïtes irradiés), aucune réponse anticorps n'a pu être mise en évidence après l'infection par *Toxoplasma gondii* des rats "Nude". Ces lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 sont semble t'il, incapables d'intervenir au cours d'une réponse anticorps. Il convient de noter que chez le rat Fischer, aucune réponse humorale n'a pu être observée, après infection, immunisation par les antigènes ES ou par le peptide 170-193, vis-à-vis de l'antigène natif ou du produit de traduction de 24 kDa. Le mécanisme par lequel ces lymphocytes T de spécificité anti-peptide 170-193 interviennent dans la protection des rats "Nude" contre la toxoplasmose, nous est encore inconnu. Ces expériences nous indiquent cependant que dans ce cas, les anticorps ne sembleraient pas jouer un rôle important. L'intervention d'un mécanisme de défense purement cellulaire serait donc en cause. Nous avons déjà décrit dans le chapitre précédent l'action des macrophages après activation par une lymphokine: l'INF γ . Les lymphocytes T spécifiques du peptide 170-193 pourraient agir de cette manière. De plus, s'ajoute à ces mécanismes bien décrits, la

possibilité d'une cytotoxicité par des lymphocytes T dits cytotoxiques (CTL). La présence de ces CTL spécifiques du parasite après l'immunisation par le peptide 170-193 peut être due soit à la production par les lymphocytes T "helper" de facteurs de croissances nécessaires à leur génération, soit à l'induction directe par le peptide de CTL de type CD8. En effet, récemment, Khan et al. (1988) ont montré la présence de lymphocytes T de phénotype Thy 1.2⁺, lyt 2,3⁺ (CD4⁻, CD8⁺) directement cytotoxiques sur des parasites extracellulaires. Ces lymphocytes T étaient de spécificité anti-P30 (P30: antigène majeur de surface des tachyzoïtes). Rappelons que les lymphocytes Tc reconnaissent les antigènes à la surface des cellules en association avec les molécules de classe I (parfois de classe II) du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De ce fait, d'après les auteurs, il serait possible que le parasite *Toxoplasma gondii* exprime des antigènes de surface qui mimeraient par leur séquence certains épitopes du CMH reconnus par le récepteur T des lymphocytes Tc. L'autre hypothèse serait l'acquisition par le parasite des antigènes du CMH lors de libération par les cellules infectées.

En conclusion, notre étude sur les différents peptides de cet antigène sécrété a permis de définir des épitopes T immunodominants au cours notamment de l'infection du rat, ce qui n'avait encore jamais été entrepris pour la toxoplasmose. Cette

détermination a également permis de montrer qu'un peptide de P24 pouvait induire la survie de rats "Nude" mais le rôle précis dans la résistance reste à définir. Il serait intéressant d'étudier *in vitro* les éventuelles propriétés cytotoxiques des lymphocytes T élicités après immunisation par le peptide 170-193.

Le modèle rat ne se comporte pas de la même manière que l'homme vis-à-vis de l'antigène P24. En effet, chez l'homme, parmi les sujets ayant eu une toxoplasmose, seuls ceux qui se trouvent en phase chronique possèdent des anticorps anti-P24 (qui est un marqueur de la chronicité). Comme nous l'avons vu dans les généralités, la phase chronique de la maladie est caractérisée par la présence de formes kystiques renfermant les bradyzoïtes. Il semblerait donc que seule la présence des bradyzoïtes soit capable d'induire la stimulation de lymphocytes T "helper" de la réponse anticorps anti-P24. Dans le cas de nos expérimentations chez le rat, la souche virulente RH de *Toxoplasma gondii* est incapable de former ces kystes. Les rats Fischer infectés ne peuvent avoir de parasites enkystés dans leurs tissus, ce qui expliquerait l'absence d'anticorps anti-P24. Chez le rat, l'infection par des tachyzoïtes induirait la stimulation de lymphocytes T de type inflammatoires, non "helper" de la réponse anticorps anti-P24.

Des expériences préliminaires sur des cellules de sujets en phase chronique n'ont pu montrer aucune stimulation des lymphocytes par les différents peptides de P24, alors que ces sérums sont positifs en anticorps anti-P24.

Deux hypothèses possibles pourraient expliquer l'absence de stimulation:

1) La population cellulaire à laquelle on s'adresse au cours du test (lymphocytes circulants) ne contient peut être pas de lymphocytes T spécifiques de P24;

2) Les peptides synthétisés ne recouvrent pas entièrement la molécule; il se pourrait donc que les épitopes T humains immunodominants ne soient pas présents parmi les peptides sélectionnés.

La production de la protéine recombinante permettra la mise en oeuvre d'expériences nécessaires à une étude plus approfondie du rôle de P24 :

1) Chez le rat "Nude", par des expériences de transferts de lymphocytes T spécifiques de P23 recombinante : rP23 (afin de pouvoir confirmer le rôle protecteur de cet antigène);

2) Chez la souris, par des expériences de protection par immunisation avec la rP23 puis infection. De plus, il serait intéressant d'étudier la cinétique de la réponse cellulaire T vis-à-vis des différents peptides au cours de l'infection comme cela a été fait

dans ce mémoire chez le rat. Des expériences préliminaires faites en parallèle de ce travail ont montré que seul le peptide 194-208 pouvait stimuler des lymphocytes T provenant de souris Balb/c 45 jours après l'infection par des kystes de la souche 76K de *Toxoplasma gondii*.

3) Pour ce qui concerne l'immunité développée chez l'homme, l'étude de la réponse cellulaire T vis-à-vis de la rP23 chez des sujets séropositifs (en phase aiguë ou chronique) devra être entreprise. De plus, les peptides sélectionnés n'induisant aucune prolifération des lymphocytes circulants, la synthèse d'autres peptides sera nécessaire.

L'étude de l'immunité développée chez le rat contre l'antigène de 23 kDa présentée dans ce mémoire constitue le départ d'une **recherche** vers la mise au point d'un **vaccin synthétique**.

C- La vaccination dans la toxoplasmose

Contrairement à un certain nombre d'infections transmissibles (bactériennes ou virales), aucun vaccin efficace n'a encore été développé contre les infections parasitaires.

Le premier objectif du vaccin contre la toxoplasmose serait tout d'abord de prévenir les complications néonatales chez l'homme et les animaux domestiques comme le mouton (dans les élevages ovins, la toxoplasmose entraîne des pertes considérables). Le deuxième objectif étant d'éviter la forme chronique de la maladie car chez les sujets immunodéprimés, le "réveil" des formes kystiques entraînant une réinvasion de l'organisme qui ne peut se défendre. En effet, à long terme, la population devenant de plus en plus séronégative, le risque de ce "réveil" devrait être de plus en plus rare.

Différentes études visant à établir une protection totale et durable chez l'animal ont été largement entreprises.

Les vaccins utilisant des parasites morts sont restés sans succès. Par exemple, l'inoculation de tachyzoïtes formolés de la souche RH à des cobayes entraîne une protection contre l'infection mais cependant, l'immunité développée n'est pas stérilisante

puisque des parasites sont présents dans les tissus (Cutchins et Warrens, 1956).

L'utilisation d'organismes atténués comme vaccin a été étudiée par de nombreuses équipes. Seah et Hucal en 1975, montrent que des doses de 10.000 à 20.000 rads suppriment la virulence de la souche RH de *Toxoplasma gondii*. L'immunisation par ces parasites irradiés induit bien une protection mais seulement pour une période limitée.

Pfefferkorn et Pfefferkorn (1976) quant à eux, ont mis en évidence une souche mutante de *Toxoplasma* sensible à la température: Ts4. Sa pathogénicité chez la souris est très réduite comparée à la souche RH. Des souris immunisées avec le mutant Ts4 sont capables de développer une résistance contre l'infection par une souche virulente et ceci 2 à 3 mois après l'immunisation (Waldeland et Frenkel, 1983; Suzuki et Remington, 1988). Aucun parasite n'est retrouvé dans les tissus des animaux après l'immunisation. Ce mutant combinerait donc les avantages des deux vaccins (mort et vivant) grâce à sa capacité de proliférer seulement au cours d'une période courte et de disparaître, élicitant néanmoins une immunité protectrice stérilisante. Suzuki et Remington (1988) confirment non seulement que l'immunisation de souris avec le mutant Ts4 entraîne une résistance à l'infection par une souche virulente mais aussi que le nombre de formes kystiques au niveau

du cerveau est énormément diminué par rapport aux témoins. Cette observation est très importante lorsque l'on sait que la majorité des toxoplasmoses rencontrées chez les sujets immunodéprimés sont dues à une rupture de ces kystes.

Les stratégies actuelles pour le développement d'un vaccin contre *Toxoplasma gondii* reposent sur la production d'anticorps monoclonaux protecteurs et surtout sur le clonage d'antigènes immunogènes et protecteurs.

Jusqu'à présent, les anticorps monoclonaux protecteurs produits étaient dirigés contre des antigènes cytoplasmiques et surtout membranaires (Sharma et al., 1984; Johnson et al., 1983). D'autre part, des antigènes de 58 et 28 kDa ont été décrits pour leur pouvoir protecteur chez la souris (Sharma et al., 1984; Sibley et Sharma, 1987). L'antigène de 28 kDa a été cloné récemment par Prince et al. (1989). Dans notre laboratoire, un antigène ayant les mêmes caractéristiques que la P24 a été cloné, nommé P28,5 (Cesbron-Delauw, comm. personnelle). Une partie de la séquence de cette molécule est commune avec le clone isolé par Prince et al. (1989). De plus, une molécule présente à la membrane du parasite et dans les antigènes ES de 43 kDa, et exprimée au stades tachyzoïte et bradyzoïte, est actuellement en cours de clonage (Cesbron-Delauw et Tomavo, comm. personnelle).

Grâce au clonage de ces antigènes potentiellement protecteurs, l'évolution vers des vaccins utilisant des molécules recombinantes ou synthétiques est possible. De plus, la possibilité de prédire les régions d'une protéine capables d'induire une réponse T ou de contenir des épitopes reconnus par des anticorps protecteurs suggère l'application pour le développement d'un tel vaccin. La réponse du système immunitaire pourrait être ainsi orientée vers des mécanismes effecteurs très efficaces. Des travaux récents ont été engagés dans cette voie contre *Plasmodium* (Rzepczyk et al., 1988) et dans notre laboratoire contre *Schistosoma mansoni*.

Dans le cas de la bilharziose (ou schistosomiase), un antigène d'excrétion-sécrétion P28 a montré un intérêt particulier. En effet, la molécule native comme la protéine recombinante sont capables d'induire une immunité protectrice chez le rat, la souris, le hamster (Balloul et al., 1987-1; Balloul et al., 1987-2) et le babouin (Balloul et al., 1987-3). Dans le modèle rat, les lymphocytes T "helper" induits par la P28 purifiée protègent les rats contre l'infection (Auriault et al., 1987). Afin de déterminer les régions de la molécule responsables de cette immunité protectrice, des peptides de synthèse ont été déduits de la séquence primaire de la P28.

Chez le rat, deux peptides synthétiques, nommés 24-43 et 140-153 apparaissent comme être des cibles majeures des lymphocytes T provenant de rats infectés ou immunisés avec la P28

recombinante (rP28). Le peptide 24-43 semblait particulièrement intéressant puisque non seulement il possède au moins un épitope T mais aussi il peut être la cible des IgG et notamment des IgG2a impliqués dans la cytotoxicité dépendante d'éosinophiles. De plus, le transfert passif de lymphocytes T de spécificité anti-peptide 24-43 augmente la production d'IgE anti-P28 chez des rats immunisés avec la rP28 (Auriault et al., 1988).

Quant au modèle murin, le peptide 24-43 est aussi reconnu par des lymphocytes T d'animaux immunisés par la rP28. Une étude immunogénétique préliminaire montre que certaines souches de souris sont de "bonnes répondeuses" (c'est à dire que leurs lymphocytes T sont stimulés par la P28 et le peptide 24-43), d'autres de "mauvaises répondeuses" et ceci après immunisation avec la rP28 (Wolowczuk et al., 1989). Par contre, lorsque des souris sont immunisées avec des antigènes de différents stades de développement de *Schistosoma mansoni* (comprenant la forme native de l'antigène P28), le maximum de prolifération T est obtenu avec le peptide 115-131 (Wolowczuk et al., soumis à publication). Actuellement différentes constructions synthétiques du peptide 115-131 sont à l'étude chez le rat et la souris.

Ces résultats obtenus dans le modèle parasitaire *Schistosoma mansoni* ont permis de définir des peptides intervenant chez le rat dans une immunité à médiation plutôt humorale et chez

la souris dans une immunité à médiation cellulaire. De plus, grâce aux différentes souches congéniques de souris, l'étude immunogénétique montre bien l'importance du contexte génétique dans le développement d'une immunité.

Ces différentes observations ont conduit à préciser les principales propriétés du vaccin synthétique:

1) ce dernier doit posséder une bonne immunogénicité et doit pouvoir induire des anticorps ou des cellules effectrices qui interagissent avec les antigènes natifs des différents stades de développement de l'agent pathogène (dans le cas des parasitoses);

2) certains individus sont incapables de développer une immunité vis-à-vis de certains antigènes. Cette incapacité est génétiquement contrôlée. Le but est donc de construire une molécule vaccinnante qui puisse stimuler le système immunitaire de tous les individus.

Nous avons pu montrer, par l'étude réalisée dans ce mémoire, l'implication d'antigènes excrétés-sécrétés par le parasite dans l'immunité cellulaire développée contre *Toxoplasma gondii*. De plus, la première étude épitopique dans ce modèle parasitaire d'un antigène sécrété de 23 kDa montre que certains épitopes de cette molécule sont bien reconnus par le système immunitaire et qu'un

peptide de cet antigène pourrait induire la stimulation, chez le rat, de lymphocytes T effecteurs de mécanismes cellulaires pouvant entraîner une survie de rats "Nude".

D'autres molécules excrétées-sécrétées sont donc actuellement en cours de clonage. L'étude de leurs propriétés protectrices tout d'abord puis l'identification d'épitopes T et B immunodominants dans différents modèles expérimentaux et chez l'homme, et leur rôle dans l'immunité devraient contribuer à la mise au point d'une construction vaccinale. En effet, grâce au clonage des molécules et à la synthèse peptidique, les épitopes de différents immunogènes particulièrement impliqués dans des mécanismes effecteurs conduisant à l'élimination du parasite, pourraient être rassemblés pour former une seule molécule vaccinnante. La réponse immunitaire pourrait être ainsi orientée vers l'induction à la fois de mécanismes effecteurs cellulaires et humoraux extrêmement ciblés et efficaces.

L'ensemble de ce travail s'est donc inscrit dans le cadre d'une stratégie à visée vaccinale contre la toxoplasmose. L'incidence très lourde de cette infection à la fois comme maladie congénitale et comme complication fatale chez les patients atteints de SIDA a justifié l'intensification des recherches à but immunoprophylactique mais aussi diagnostique dans notre laboratoire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ambroise-Thomas P., et Garin J.P.(1984). Toxoplasmose. *Encycl. Méd. Chir.*, Paris, Maladies infectieuses, 8098 A10, 4
- Anderson S.E., Bautista S.C., and Remington J.S. (1976-1). Specific antibody dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **26**:375
- Anderson S.E., Bautista S., and Remington J.S. (1976-2). Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocyte products. *J. Immunol.* **117**:381
- Anderson S.E., Krahenbuhl J.L., and Remington J.S. (1977). Depression of antigen-specific lymphocyte transformation in acute acquired toxoplasmosis. *Clin. Res.* **25**:371 A
- Anderson S.E., Krahenbuhl J.L., and Remington J.S. (1979). Longitudinal studies of lymphocyte response to toxoplasma antigen in humans infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Lab. Immunol.* **2**:293
- Auriault C., Balloul J.M., Pierce R.J., Damonville M., Sondermeyer P., and Capron A. (1987). Helper T cells induced by a purified 28 kilodalton antigen of *Schistosoma mansoni* protect rats against infection. *Infect. Immun.* **55**:1163

- Auriault C., Gras-Masse H., Wolowczuk I., Pierce R.J., Balloul J.M., Neyrinck J.L., Drobecq H., Tartar A., and Capron A. (1988). Analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* P28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *J. Immunol.* **141**:1687
- Awkawa M., Kamata V., Asai T., Midorikawa O. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Pathol.* **87**:285
- Balloul J.M., Grzych J.M., Pierce R.J., and Capron A. (1987-1). A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worm protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **138**:3448
- Balloul J.M., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvallo D., Lecocq J.P., and Capron A. (1987-2). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* **326**:149

- Balloul J.M., Boulanger D., Sondermeyer P., Dreyer D., Capron M., Grzych J.M., Pierce R.J., Carvallo D., Lecocq J.P., and Capron A. (1987-3). Vaccination of baboons with a P28 antigen of *Schistosoma mansoni* expressed in E. Coli. In : *Molecular Paradigms for Eradicating Helminthic Parasites*. Alan R. Liss, Inc, NY.p.77
- Black C.M., Catteral J.R., and Remington J.S. (1987). *In vivo* and *in vitro* activation of alveolar macrophages by recombinant interferon gamma. *J. Immunol.* **138**:491
- Borgues J.S., and Johnson W.D. (1975). Inhibition of multiplication of *Toxoplasma gondii* by human monocytes exposed to T lymphocyte products. *J. Exp. Med.* **141**:483
- Brinkmann V., Sharma S.D., and Remington J.S. (1986). Different regulation of the L3T4 T cell subset by B cells in different mouse strains bearing the H2k haplotype. *J. Immunol.* **137**:2991
- Burg J.L., Perelman D., Kasper L.H., Ware P.L., and Boothroyd J.C. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**:3584

- Capron M., Capron A., Abdel-Hafez S.K., Bazin H., Joseph M., and Phillips S.M. (1983). Immunologic response of athymic rats to *Schistosoma mansoni* infection. II. Antibody-dependent mechanisms of resistance. *J. Immunol.* **131**:1475
- Capron A., and Dessaint J.P. (1988). Vaccination against parasitic diseases : Some alternative concepts for the definition of protective antigens. *Ann. Inst. Pasteur / Immunol.* **139**:109
- 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., and Capron A. (1989-1). Molecular characterization of a 23 kDa major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:7537
- Cesbron-Delauw M.F., Pierce R., Torpier G., Cesbron J.Y., Leite P., Darcy F., and Capron A. ; Guy B., Lenzen G., and Lecocq J.P. (1989-2). A strategy for cloning potential protective antigens of *Toxoplasma gondii*. In : *Vaccines 89, Modern approaches to new vaccines including prevention of AIDS*, eds. Lerner R.A., Ginsberg H., Chanock R.M., and Brown F. (Cold Spring Harbor laboratory) p.301
- Chan J., and Luft B.J. (1986). Suppressor T cells in acute murine toxoplasmosis. *Clin. Res.* **34**:514 A

- Charif H., Darcy F., Torpier G., Cesbron-Delauw M.F., and Capron A. (1990). *Toxoplasma gondii* : Characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. *Exp. Parasitol.* in press
- Chumpitazi B., Ambroise-Thomas P., Cagnard M., and Colombet G. (1983). Exo-antigènes toxoplasmiques produits en culture *in vitro* : détermination des poids moléculaires. *Bull. Soc. Franç. Parasitol.* 1:89
- Chumpitazi B., Ambroise-Thomas P., Cagnard M., and Autheman J.M. (1987). Isolation and characterization of toxoplasma exo-antigens from *in vitro* culture in MRC5 and Vero cells. *Int. J. Parasitol.* 17:829
- Cohen S., and Warren K.S. (1982). Immunology to parasitic infection. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- Couvreur G., Sadak A., Fortier B., and Dubremetz J.F. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* 97:1
- Cutchins E.C., and Warren J. (1956). Immunity patterns in the guinea pig following *Toxoplasma* infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. *Am. J. Trop. Med.* 5:197

- Damonville M., Auriault C., Verwaerde C., Delanoye A., Pierce R.J., and Capron A. (1986). Protection against experimental *Schistosoma mansoni* schistosomiasis achieved by immunization with schistosomula released products antigens (SRP-A) : role of the IgE antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **65**:244
- Dannemann B.R., Morris V.A., Araujo F.G., and Remington J.S. (1989). Assesement of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cysts. *J. Immunol.* **143**:2684
- Darcy F., Deslée D., Santoro F., Charif H., Auriault C., Decoster A., Duquesne V., and 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
- Decoster A., Darcy F., and Capron A. (1988). 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., Gluckman E., Beauvais B., Devergie A., Melo R., and Larivière M. (1986). Toxoplasma infection after human allogenic bone marrow transplantation : clinical and serological study of 80 patients. *Bone Marrow Transpl.* 1:67
- Desgeorges P.T., Billault X., Amboise-Thomas P., and Bouttaz M. (1980). Mise en évidence et cinétique d'apparition d'exo-antigènes produits par *Toxoplasma gondii* en culture *in vitro*. *Lyon Médical.* 243:737
- Desmonts G., Couvreur J., Alison F., Baudelot J., Gerbeaux J., et Lelong M. (1965). Etude épidémiologique sur la toxoplasmose : de l'influence de la cuisson de la viande de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev. Franç. Et. Clin. Biol.* 10:652
- Dubey J.P., Miller N.L., and Frenkel J.K. (1970). The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.* 132: 636
- Dubremetz J.F., Rodriguez C., and Ferreira E. (1985). *Toxoplasma gondii* : redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. *Exp. Parasitol.* 59:24
- Foster B.G., and Mc Culloch W.F. (1968). Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. *Can. J. Microbiol.* 14:103

- Frenkel J.K. (1948). Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (Toxoplasmins). *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*. **68**:634
- Frenkel J.K. (1949). Uveitis and toxoplasmin sensitivity. *Am. J. Ophthalmol.* **32**:127
- Frenkel J.K. (1967). Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* **98**:1309
- Frenkel J.K., Dubey J.P., and Miller N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats : fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. **167**:893
- Frenkel J.K. (1973). Toxoplasmosis : Parasite life cycle, pathology and immunology, in : *The coccidia*, Hammond D.M. et Long P.L., Eds. University Park Press, Baltimore, Butterworth, London, p.343
- Gill H.S., and Prakash O. (1970). A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. *Indian J. Med. Res.* **58**:1157
- Goldman M., Carver R.K., and Sulzer A.J. (1958). Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasitol.* **44**:161
- Golvan Y.J. (1983). *Eléments de Parasitologie Médicale*. Flammarion, Paris, 4ème Ed. p.571

- Goyal M., Ganguly N.K., and Mahajan R.C. (1986). Lymphocyte functions in acute and chronic murine toxoplasmosis. *Ind. J. Med. Res.* **83**:487
- Goyal M., Ganguly N.K., and Mahajan R.C. (1988). Natural killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* in acute and chronic murine toxoplasmosis. *Med. Sci. Res.* **16**:375
- Handman E., Goding J.W., and Remington J.S. (1980). Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **48**:282
- Hauser W.E.Jr., and Remington J.S. (1981). Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Infect. Imm.* **32**:637
- Hauser W.E.Jr., Sharma S.D., and Remington J.S. (1982). Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma* infection. *Cell. Immunol.* **69**:330
- Hauser W.E.Jr., and Van Tsai. (1986). Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *Toxoplasma gondii* in vitro. *J. Immunol.* **136**:313

- Hopp T.P., and Woods K.R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:3824
- Hugues H.P.A., and Van Knapen F. (1982). Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int. J. Parasitol.* **12**:433
- Hugues H.P.A., Connelly C.A., Strangeways J.E.M., and Hudson L. (1984). Antigen specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. *Clin. Exp. Immunol.* **58**:539
- Hugues H. P. A. (1985). Toxoplasmosis : The need for improved diagnostic techniques and accurate risk assessment. *Current Trop. Microbiol. Immunol.* **120**:105
- Hugues H.P.A., Speer C.A., Kyle J.E., and Dubey J.P. (1987). Activation of murine macrophages and a bovine monocyte cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria Bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**:784
- Hutchinson W.M., Dunachie J.F., Siim J.C., and Work K. (1970). Coccidie an-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br. Med. J.* **1**:142

- Israelski D.M., and Remington J.S. (1988). Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Inf. Dis. Clin. North Am.* 2:429
- Jacobs L. (1956). Propagation, morphology and biology of *Toxoplasma*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 64:154
- Johnson A.M., Mc Donald P.J., and Neoh S.H. (1983). Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.* 30:351
- Jones T.C., Yeh S., and Hirsch J.G. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* 136:1157
- Kasper L.H., Crabb J.H., and 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., Currie K.M., and Bradley M.S. (1985). An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134:3436

- Khan I.A., Smith K.A., and Kasper L.H. (1988). Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**:3600
- Krahenbuhl J.L., Blackovec A.A., and 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., Gaines J.D. and Remington J.S. (1972). Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **125**:283
- Liew F.Y. (1989). Functional heterogeneity of CD4⁺ T cells in leishmaniasis. *Immunol. Today.* **10**:40
- Lindberg R.E., and Frenkel J.K. (1977). Toxoplasmosis in nude mice. *J. Parasitol.* **63**:219
- Luft B.J., Naot Y., Araujo F.G., Stinson B., Remington J.S. (1983). Primary and reactivated toxoplasma infection in patients with cardiac transplantation. *Ann. Int. Med.* **99**:27
- Luft B.J., Brooks R.G., Conley F.K., McCabe R.E., and Remington J.S. (1984-1). Toxoplasma encephalitis in patients with AIDS. *J.A.M.A.* **257**:913

- Luft B.J., Kansas G., Engleman E., and Remington J.S. (1984-2). Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **150**:761
- Luft B.J., Pedrotti P.W., and Remington J.S. (1988). *In vitro* generation of adherent mononuclear suppressor cells to *Toxoplasma* antigen. *Immunol.* **63**:643
- Lycke E., Carlberg K., and Norrby R. (1975). Interaction between *Toxoplasma gondii* and its host cells: Function of penetration-enhancing factor of *Toxoplasma*. *Infect. Imm.* **11**:853
- Maddison S.E., Slemenda S.B., and Teutsch S.M. (1979). Lymphocyte proliferative responsiveness in 31 patients after an outbreak of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **28**:955
- Mc. Cabe R.E., Luft B.J., and Remington J.S. (1984). Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **150**:961
- Mc. Cabe R.E., and Remington J.S. (1988). Toxoplasmosis : the time has come. *N. Engl. J. Med.* **318**:313

- McLeod R.R., Van Le L., and Remington J.S. (1982). *Toxoplasma gondii* : lymphocyte function during acute infection in mice. *Exp. Parasitol.* 54:55
- McLeod R., Beem M.O., and Estes R.G. (1985). Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Lab. Immunol.* 17:149
- Murray H.W., Spitalny G.L., and Nathan C.F. (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon gamma. *J. Immunol.* 134:1619
- Murray H.W., Scavuzzo D., Jacobs J.L., Kaplan M.H., Libby D.M., Schindler J., and Roberts R.B. (1987). *In vitro* and *in vivo* activation of human mononuclear phagocytes by interferon gamma. *J. Immunol.* 138:2457
- Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E., and Ruben B.Y. (1983). Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158:670
- Nichols B.A., Chiappino M.L., and O'Connor G.R. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* 83:85

- Nicolle C; et Manceaux L. (1908). Sur une infection à corps de Leischman (ou organismes voisins) du gondi. *C. R. Acad. Sci.* **147**:763
- Norrby R., and Lycke E. (1967). Factors enhancing the host cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *J. Bacteriol.* **93**:53
- Norrby R. (1971). Immunological study on the host cell penetration factor of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Imm.* **3**:278
- Pavia C.S. (1986-1). Enhanced primary resistance to *Treponema pallidum* infection and increased susceptibility to toxoplasmosis in T cell depleted guinea pigs. *Infect. Immun.* **53**:305
- Pavia C.S. (1986-2). Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* **137**:2985
- Pfefferkorn E.R., and Pfefferkorn L.C. (1976). *Toxoplasma gondii* : isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp. Parasitol.* **39**:365
- Pfefferkorn E.R. (1984). Interferon blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:908

- Pfefferkorn E.R., and Guyre P.M. (1984). Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultures fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect. Immun.* **44**:211
- Prince J.B., Araujo F.G., Remington J.S., Burg J.L., Boothroyd J.C., and Sharma S.D. (1989). Cloning of cDNAs encoding a 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Bioch. Parasitol.* **34**:3
- Remington J.S., Barnett C., Meikel M., and Lunde M.N. (1962). Toxoplasmosis and infectious mononucleosis. *Arch. Intern. Med.* **110**:744
- Remington J.S., and Cavanaugh E.N. (1965). Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. *N. Engl. J. Med.* **273**:1308
- Remington J. S., and Desmonts G. (1976). Toxoplasmosis : in *infections diseases of fetus and newborn infant*. W. B. Saunders Ed., Philadelphia. p.191
- Remington J.S., Jacobs L., and Kaufman H.E. (1960). Toxoplasmosis in the adult. *N. Engl. J. Med.* **262**:180, 237
- Reyes L., and Frenkel J.K. (1987). Specific and non specific mediation of protective immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Imm.* **55**:856

- Ridel P.R., Auriault C., Darcy F., Pierce R., Leite P., santoro F., Neyrinck J.L., Kusnierz J.P., and Capron A. (1988). Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* **141**:978
- Rodriguez C., Afchain D., Capron A., Dissous C., and Santoro F. (1985). Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an immunodominant region with repetitive epitopes. *Eur. J. Immunol.* **15**:747
- Roques C., Bessières M.H., and Seguela J.P. (1986). Caractérisation immuno-chimique des protéines des exo-antigènes provenant de différentes souches de *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Franç. Parasitol.* **4**:79
- Rzepczyk C.M., Ramasamy R., Ho P.C.L., Mutch D.A., Anderson K.L., Duggelby R.G., Doran T.J., Murray B.J., Irving D.O., Woodrow G.C., Parkinson D., Brabin B.J., and Alpers M.P. (1988). Identification of T epitopes within a potential *Plasmodium falciparum* vaccine. *J. Immunol.* **141**:3197
- Sabin A.B., and Feldman H.A. (1948). Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomom affecting a protozoan parasite (toxoplasma). *Science.* **108**:660

- Sadak A., Taghy Z., Fortier B., and Dubremetz J.F. (1988).
Characterization of a family of rhoptry proteins of
Toxoplasma gondii. *Mol. Bioch. Parasitol.* **203**:211
- Santoro F., Charif H, and Capron A. (1986). The immunodominant
epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of
Toxoplasma gondii. *Parasite Immunol.* **8**:631
- Santoro F., Auriault C., Leite P., Darcy F., and Capron A. (1987).
Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. *C. R. Acad.
Sci.* **304**, serie **III**:297
- 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., and Krug E.C. (1989). *Toxoplasma gondii* :
Characterization of monoclonal antibodies that recognize
rhoptries. *Exp. Parasitol.* **68**:74
- Seah S.K.K., and Hucal G. (1975). The used of irradiated vaccine in
immunization against experimental toxoplasmosis. *Can. J.
Microbiol.* **21**:1379

- Sethi K.K., Endo T., and Braudis H. (1981). *Toxoplasma gondii* trophozoites precoated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. *Immunol. Letters*. **2**:343
- Sharma S.D., Araujo F.G., and 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
- Sibley L.D., Krahenbuhl J.L., and Weidner E. (1985). 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.W., and Weider E. (1986). Toxoplasma modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* **103**:867
- Sibley L.D. (1987). Modification of host cell phagocytic compartments by intracellular *Toxoplasma gondii*. In : *Host-Parasite Cellular and Molecular Interactions in Protozoal Infections*, NATO ASI Series, eds. Chang K.P. and Snary D. (Springer, Berlin). **H11**:355

- Sibley L.D., and Sharma S.D. (1987). Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.* **55**:2137
- Steriu D., and Dunareanu G. (1976). *Toxoplasma gondii*-host cell interaction. Ultrastructural aspects of the parasite penetration mechanism. *Arch. Roum Path. Exp. Microbiol.* **35**:223
- Strickland G.T., Pettit L.E., and Voller A. (1973). Immune depression in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **22**:452
- Strickland G.T., Ahmed A., and Sell K.W. (1975). Blastogenic response of *Toxoplasma* infected mouse spleen cells to T and B cells mitogens. *Clin. Exp. Immunol.* **22**:167
- Suzuki Y., and Kobayashi A. (1984). Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma*-infected mice. I. Inhibition of proliferation of lymphocytes in primary antibody responses. *Cell. Immunol.* **85**:417
- Suzuki Y., and Kobayashi A. (1985). Macrophage-mediated suppression of immune responses in *Toxoplasma*-infected mice. II. Both H-2 linked and non linked control of induction of suppressor macrophages. *Cell. Immunol.* **91**:375

- Suzuki Y., and 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., and Remington J.S. (1988). Interferon gamma : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* **240**:516
- Taylor J.B., Vidal A., Torpier G., Meyer D.J., Roitsch C., Balloul J. M., Southan C., Sondermeyer P., Preamble S., Lecocq J.P., Capron A., and Ketterer B. (1988). The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28 K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* **7**:465
- Tremonti L.P., and Walton B.C. (1970). Blast transformation and migration inhibition in toxoplasmosis and leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **19**:49
- Waldeland H., and Frenkel J.K. (1983). Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. *J. Parasitol.* **69**:60
- Wolowczuk I., Auriault C., Gras-Masse H., Vendeville C., Balloul J.M., Tartar A., and Capron A. (1989). Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28-1 antigen. *J. Immunol.* **142**:1342

Wolowczuk I., Auriault C., Gras-Masse H., Mazingue C., Vendeville C., Tartar A., and Capron A. (1990). T cell responsiveness towards various synthetic peptides of the P28 antigen in rat and mouse models during *Schistosoma mansoni* infection. *J. Immunol.* Soumis à publication.

TABLE DES MATIERES

RESUME	9
INTRODUCTION	13
GENERALITES	17
A- Le parasite : <i>Toxoplasma gondii</i>	18
1- Morphologie du parasite	18
1-1- Le tachyzoïte (ou trophozoïte)	19
1-2- Les kystes	21
1-3- L'oocyste	22
2- Le cycle évolutif	24
2-1- Evolution chez l'hôte définitif : le chat	24
2-2- Evolution chez l'hôte intermédiaire	27
B- La toxoplasmose	28
1- La toxoplasmose acquise	28
2- La toxoplasmose congénitale	29
3- La toxoplasmose des sujets immunodéprimés	30

C- L'immunité	32
1- L'immunité à médiation humorale	32
2- L'immunité à médiation cellulaire	34
2-1- Phénomène d'hypersensibilité retardée	35
2-2- Le rôle des lymphocytes	35
2-3- Le rôle des macrophages	38
2-4- Les autres cellules activées lors de l'infection	39
D- Les antigènes	41
1- Les antigènes somatiques	41
2- Les antigènes Excrétés-Sécrétés (ES)	43
E- L'antigène P24 et ses peptides	48
F- Mise au point du modèle expérimental : le rat athymique	55
TRAVAUX PERSONNELS	60
ARTICLE 1: Protection de rats "Nude" contre la toxoplasmose par des cellules T "helper" spécifiques d'antigènes excrétés-sécrétés (ESA)	62

ARTICLE 2: Identification d'épitopes T immunodominants au sein d'un antigène de 23 kDa de <i>Toxoplasma gondii</i>	92
DISCUSSION CONCLUSION	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	150
TABLE DES MATIERES	173

