



L'ensemble de ce travail a été réalisé au centre d'Immunologie et de Biologie parasitaire (Unité mixte INSERM U167-CNRS 624) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Professeur A. CAPRON.

Je dédie cette Thèse :

A mes parents,

A ma famille,

A mes amis,

en témoignage de mon affection et de ma profonde  
reconnaissance

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements,

A mon directeur de recherches,

Monsieur le Professeur A. CAPRON, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Que ce travail soit le témoignage de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

A mon président de Thèse,

Monsieur le Professeur A. VERBERT pour avoir accepté de juger ce travail.  
Soyez assuré de ma profonde gratitude.

A Madame le Docteur Françoise DARCY,

Vous m'avez accueillie très chaleureusement dans le groupe de recherches que vous animiez, et avez suivi avec attention toute l'évolution de ce travail. Votre enthousiasme, votre gentillesse, et votre grande disponibilité ont permis de nombreux échanges particulièrement motivants. La confiance et le soutien que vous m'avez apportés malgré les difficultés rencontrées ont permis la réalisation de ces travaux. Soyez assurée de ma profonde estime et de toute mon amitié.

A Monsieur le Docteur Jean-Marie GRZYCH,

Vous m'avez apporté votre précieux concours au cours de cette dernière année et permis d'accomplir ce travail dans une ambiance particulièrement chaleureuse. C'est avec le plus grand plaisir que je vous compte aujourd'hui parmi les membres de ce jury. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Michel PINON,

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour avoir accepté de juger cette thèse. Soyez assurés de toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean-Paul DESSAINT,

Vous m'avez honorée de votre confiance dès les premiers instants et aidée lors de la réalisation de ce travail. Soyez assuré de ma profonde estime et de ma plus sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Claude AURIAULT,

Vous avez suivi la réalisation d'une partie de ces travaux et m'avez soutenue tout au long de cette thèse. Par votre enthousiasme et votre disponibilité nous avons pu avoir de nombreux échanges enrichissants. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Béatrice TOURVIEILLE,

Vous m'avez apporté votre aide pour la lecture critique et l'amélioration de ce mémoire. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

Je tiens également à exprimer mes plus vifs remerciements à ceux qui m'ont toujours apporté leur soutien, particulièrement:

Mmes Anita CARON, Sylvie VERMERSCH, Sophia LAFITTE, Josette FONTAINE, Anne-Marie SCHACHT, et Mr Didier DESLEE pour leur grande gentillesse et leurs compétences techniques.

Les Docteurs Delphine GREZEL, Lionel ZENNER et Haleh CHARIF, pour leur amitié et tous nos échanges sympathiques.

Les Docteurs Anne DECOSTER et Claudie VERWAERDE pour nos nombreux échanges pendant ces quelques années.

Je remercie également:

Le Docteur Marie-France CESBRON et les autres membres du groupe Toxoplasmose pour leur collaboration.

L'équipe du Pr. TARTAR pour la synthèse des peptides P30 et nos nombreux échanges.

Mme Françoise AUDIBERT pour l'obtention du MDP et ses nombreux conseils lors de la conception de protocoles utilisant cette molécule.

Mr Hubert CARON, Mme Suzanne VANWINGENE, Mr Jean-Pierre GAZET, et le Dr Jean-Pierre KUSNIERZ, pour leurs compétences techniques et leur dévouement.

Mr Christian DROLEZ et Mme Jacqueline DERICK pour leur dévouement dans l'obtention des supports photographiques et bibliographiques.

Le personnel de l'animalerie et des secrétariats pour leur aide et leur disponibilité.

Nos travaux ont donné lieu aux publications (\*) et aux communications suivantes (\*\*):

- \* **F.Darcy, G.Torpier, M.F.Cesbron-Delauw, P.R.Ridel, V.Duquesne, H.Charif, I.Godard, R.J.Pierce, C.Auriault, A.Capron.** (1989) Antigènes de *Toxoplasma gondii* d'intérêt diagnostique et prophylactique potentiel: nouvelles stratégies d'identification. *Ann. Biol. Clin.* **47**: 451
  
- \* **I.Godard, F.Darcy, D.Deslée, J.P.Dessaint, et A.Capron.** (1990). Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. *Infect.Immun.* **58**: 2446
  
- \* **F.Darcy, P.Maes, H.Gras-Masse, C.Auriault, M.Bossus, D.Deslée, I.Godard, M.F.Cesbron, A.Tartar, et A.Capron.** (1992) Protection of mice and "Nude" rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction (MAP) derived from *T. gondii* P30 antigen. *J.Immunol.* Soumis pour publication.
  
- \*\***I.Godard, A.Decoster, F.Darcy, D.Deslée, A.Caron, et A.Capron.** (1989) IgA antibody response in human and experimental toxoplasmosis. Poster présenté au "Joint Spring Meeting of the British, Netherlands, and Belgian Societies for Parasitology with the Belgian Society of Protozoology" à Southampton, Grande-Bretagne.
  
- \*\***I.Godard, F.Darcy, D.Deslée, J.P.Dessaint et A.Capron.** (1989) Réponse isotypique vis-à-vis de *Toxoplasma gondii* dans les modèles expérimentaux du rat et de la souris. Communication orale au congrès de la Société Française de Parasitologie à Tours, France.
  
- \*\***I.Godard, F.Darcy, D.Deslée, J.P.Dessaint, et A.Capron.** (1990) *Toxoplasma gondii*: antibody isotypes responses in experimental infections. Poster et communication orale au Congrès International de Parasitologie ICOPA VII, à Paris.

**SOMMAIRE**

<i>RESUME</i>	p. 11
<i>INTRODUCTION</i>	p.13
<i>GENERALITES</i>	p.16
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	p.67
<i>RESULTATS</i>	p.92
<i>DISCUSSION ET CONCLUSION</i>	p.144
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	p.171
<i>TABLE DES MATIERES</i>	p.193

## ABREVIATIONS

**Ag:** Antigène

**Antigènes ES:** Antigènes excrétés-sécrétés

**Ig:** Immunoglobuline

**BSA:** sérum albumine bovine

**P.M. :** Poids moléculaire

**kDa:** kiloDalton

**PBS:** Tampon Phosphate 0,01M, NaCl 0,9%

**E.L.I.S.A. :** Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

**cpm:** coups par minute

**AIF:** Adjuvant incomplet de Freund

**IFN:** Interféron

**IL:** Interleukine

**Ly:** Lymphocyte

**ADCC:** Antibody-Dependent-Cell-Mediated-Cytotoxicity

**HGPRT:** Hypoxanthine-Guanine-Phosphoribosyl-Transférase

**BALT:** Bronchus-Associated-Lymphoid-Tissues

**GALT:** Gut-Associated-Lymphoid-Tissues

**RPMI:** Roosevelt Park Memorial Institute

**HEPES:** Acide N-2-Hydroxyéthyl pipérazine N'-2 éthane sulfonique

## RESUME

L'étude de la réponse anticorps d'isotype IgA au cours de la toxoplasmose humaine et expérimentale est d'un intérêt majeur puisque l'ingestion de kystes ou d'oocystes de *T. gondii* constitue la voie courante d'infection. Après avoir démontré la présence d'une réponse anticorps IgA humaine intense dans les sérums d'infection aiguë, réponse dirigée essentiellement contre l'antigène de surface du parasite, P30, nous nous sommes intéressés à l'induction de cette réponse isotypique dans les modèles expérimentaux du rat et de la souris pour lesquels la date précise de l'infection est connue. Nous avons pu montrer chez les rats infectés par voie orale, l'induction d'une réponse anticorps IgA sérique, d'apparition précoce, et simultanée à la réponse anticorps IgM. Chez des rats immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés, dont le rôle protecteur au cours de l'infection a été démontré, nous avons également pu souligner l'induction d'une réponse anticorps IgA sérique.

L'étude des sérums de ces animaux infectés par voie orale, nous a permis de mettre en évidence les cibles majeures de ces anticorps qui sont constituées par des antigènes membranaires et solubles de poids moléculaires apparents de 28,5, 29, 30, 35, et 38 kDa chez le rat et par un antigène majeur de 29 kDa chez la souris. Chez le rat immunisé par les antigènes ES, on observe la reconnaissance d'antigènes majeurs de 28,5 et 29 et 30 kDa bien que d'autres antigènes de poids moléculaires plus élevés soient également reconnus.

Parmi les antigènes excrétés-sécrétés par le parasite, nous avons pu montrer que les sérums de rats infectés reconnaissent particulièrement des antigènes de 28,5, 34 et 39 kDa, tandis que chez les souris infectées par voie orale, une réponse majeure contre l'antigène de 34 kDa est observée. Enfin, les sérums de rats immunisés par ces mêmes antigènes reconnaissent également dans cet extrait deux antigènes de 28,5 et 34 kDa.

Le rôle de ces anticorps au cours de l'infection a été abordé par une approche monoclonale. Des anticorps monoclonaux d'isotype IgA dirigés contre le parasite ont ainsi

été produits. La cible parasitaire de l'un des anticorps monoclonaux a été identifiée après immunoempreinte et immunotransfert. Il s'agit d'une molécule de 60 kDa présente dans l'extrait membranaire du parasite et visiblement identique à l'antigène de surface P30. L'identité avec l'antigène de surface P30 a été confirmée par un test d'immunocapture dirigé contre P30. Dans des modèles expérimentaux *in vivo*, ces anticorps ne se sont pas révélés protecteurs et ont même conduit à une augmentation de la susceptibilité des animaux à l'infection. Une purification des formes dimériques des IgA monoclonales a été réalisée afin de permettre dans l'avenir des études sur des IgA purifiées, mais aussi l'obtention d'IgA sécrétoires à l'aide de systèmes *in vitro*.

Nous avons également suivi deux approches complémentaires nous permettant de définir certains épitopes de l'antigène P30 impliqués dans l'immunité contre la toxoplasmose. Après l'obtention de la séquence N-terminale 48-67 de la molécule P30, des constructions peptidiques du peptide 48-67 de la molécule ont été synthétisées et leur immunogénicité a été analysée dans les modèles expérimentaux. Ces études mettent en évidence, le rôle protecteur au cours de l'infection du rat d'anticorps et de lymphocytes T spécifiques de ce peptide 48-67 présenté sous forme octamérique. Dans un second temps, la synthèse d'autres peptides de cet antigène a permis de rechercher si certains d'entre-eux étaient capables d'induire l'activation de lymphocytes T spécifiques au cours d'une infection par voie orale, voie naturelle d'infection. Nos résultats ont permis de souligner l'importance d'un épitope particulier contenu dans le peptide 238-256, capable d'activer des lymphocytes T spléniques et ganglionnaires au cours de l'infection.

**INTRODUCTION**

Le monde des parasites est caractérisé par sa très grande diversité et par l'extrême complexité des cycles biologiques mis en jeu, nécessitant une adaptation particulière à l'hôte qui les héberge. Cette adaptation se traduit par le maintien pendant de nombreuses années d'un équilibre fragile qui permet la survie du parasite et de son hôte.

L'importance des maladies parasitaires qui affectent plusieurs centaines de millions d'individus constitue de nos jours un grave problème de santé publique. Parmi celles-ci, la toxoplasmose, causée par le protozoaire intracellulaire ubiquitaire *T. gondii*, suscite un intérêt tout particulier depuis l'émergence de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, puisqu'elle représente une des principales infections opportunistes chez ces patients. De plus, l'existence de cas graves de toxoplasmose congénitale humaine valorise l'intensification des recherches à visée immunoprophylactique. Enfin, cette parasitose reste un problème vétérinaire majeur dans de nombreux pays dont l'élevage constitue un pôle économique important, car la toxoplasmose congénitale entraîne des pertes importantes chez les ovins.

Pour ce parasite, le caractère intracellulaire obligatoire rend nécessaire l'élaboration de mécanismes de défense particuliers avant, pendant et après son entrée dans la cellule hôte. L'hôte, quant à lui, développe une immunité dont le rôle consiste à limiter et à contrôler l'infection sans toutefois éliminer le parasite: ceci constitue, chez les protozoaires, l'immunité de prémunition. Tous ces aspects rendent indispensable une étude immunologique approfondie afin de mieux appréhender les relations complexes existant entre l'hôte et le parasite, les mécanismes de défense mis en oeuvre par les deux protagonistes et l'importance des différents composants de l'immunité dirigée contre le toxoplasme. Parmi ces différents éléments, l'étude de la réponse anticorps d'isotype IgA qui constitue la première défense de l'hôte, lors de l'ingestion de parasites apparaît, dans ce contexte, d'un intérêt particulier.

Ces données justifient également le développement de nouveaux axes de recherche visant à l'élaboration de stratégies vaccinales. L'induction d'une immunité protectrice étant vraisemblablement liée à la reconnaissance de plusieurs antigènes parasitaires, la production d'un

vaccin de constitution définie, composé de plusieurs molécules recombinantes ou d'un mélange de peptides synthétiques représente une approche prometteuse.

Différents antigènes se sont révélés protecteurs dans plusieurs modèles expérimentaux. Ce sont tout d'abord les antigènes de 14 et 35 kDa (JOHNSON *et al.*, 1983b; ARAUJO et REMINGTON, 1984), puis récemment les antigènes excrétés-sécrétés par le parasite (DARCY *et al.*, 1988; DUQUESNE *et al.*, 1990). Enfin, bien que des études préliminaires par d'autres auteurs n'aient pas démontré le rôle protecteur de l'antigène majeur de surface P30 (KASPER *et al.*, 1985a), les études conduites dans notre laboratoire ont néanmoins montré que le transfert passif d'un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène protège des rats immunodéficients contre une infection léthale par le parasite (SANTORO *et al.*, 1987). Des travaux récents ont également permis d'établir le rôle protecteur de cet antigène. Cet antigène majeur est capable d'induire une forte réponse polyisotypique IgG, IgM, IgA, et IgE, et possède, par ailleurs, un intérêt majeur en diagnostic (DECOSTER *et al.*, 1988a, 1991, 1992).

Dans ce contexte, nos travaux se sont orientés selon 4 axes principaux concernant tout d'abord l'étude de la réponse anticorps IgA au cours de la toxoplasmose humaine. Dans un second temps, l'induction d'une telle réponse au cours de la toxoplasmose expérimentale a été abordée. La production d'un anticorps monoclonal murin d'isotype IgA nous a ensuite permis d'apporter un outil supplémentaire pour l'étude de la fonction de ce type d'anticorps. Enfin, l'intense réponse anticorps dirigée contre P30, nous a conduit à analyser le rôle particulier de certains épitopes de cette molécule au cours de l'immunité.

**GENERALITES**

## A. TOXOPLASMA GONDII : HISTORIQUE ET CLASSIFICATION

Ce parasite fut découvert en 1908 par NICOLLE et MANCEAUX chez un rongeur, le gondi (*ctenodactylus gondi*) à l'Institut Pasteur de Tunis. Son nom particulier de *Toxoplasma*, qui vient des mots grecs "toxon", arc et "plasma", forme, lui fut donné par référence à sa morphologie. Dans le même temps, SPLENDORE, au Brésil, décrivait également la présence du parasite chez un lapin de laboratoire. Par la suite, *T. gondii* fut retrouvé dans la rétine d'un enfant hydrocéphalique (JANKU, 1923). Néanmoins, le rôle réel de *T. gondii* en pathologie humaine resta mal connu jusqu'à la description d'un cas de toxoplasmose congénitale par WOLF et COWEN en 1937. Cette description suscita un intérêt considérable et fut suivie cinq ans plus tard par une publication précisant les différents aspects de la toxoplasmose congénitale (SABIN, 1942).

La mise au point du test de lyse dépendante du complément ou "Dye-Test", par SABIN *et al.*, en 1948, permit d'établir la large répartition de ce parasite à travers le monde. Les différents modes de transmission restèrent inconnus jusqu'en 1960, où JACOBS *et al.*, confirmèrent la possibilité d'infection par ingestion de viande mal cuite. Cependant, les épidémies survenant chez les herbivores ou les oiseaux devaient procéder d'un autre mode de transmission. Ce n'est qu'après les travaux de HUTCHISON, en 1967, de FRENKEL *et al.*, en 1969, et de SHEFFIELD *et al.*, en 1969, que la présence d'une nouvelle forme kystique infectieuse de *Toxoplasma* dans les selles de chat fut confirmée. Finalement, le cycle évolutif de ce parasite fut complètement élucidé en 1970.

Différents auteurs confirmèrent l'existence d'une phase sexuée au cours du cycle parasitaire chez les félinés (FRENKEL *et al.*, 1970; HUTCHISON *et al.*, 1970; SHEFFIELD *et al.*, 1970) et apportèrent la démonstration que les toxoplasmes sont effectivement des coccidies de chat chez lequel ils ont la possibilité d'évoluer suivant un cycle complet, mais qu'ils possèdent en outre, un cycle incomplet chez les hôtes intermédiaires.

EMBRANCHEMENT	<i>APICOMPLEXA</i>
CLASSE	<i>SPOROZOEA</i>
SOUS-CLASSE	<i>COCCIDIA</i>
ORDRE	<i>EUCOCCIDIIDA</i>
SOUS-ORDRE	<i>EIMERIINA</i>
FAMILLE	<i>TOXOPLASMIDAE</i>
GENRE	<i>TOXOPLASMA</i>

**FIGURE 1**  
**CLASSIFICATION DE *T. GONDII***  
**SELON LEVINE (1980)**

Actuellement, et selon la classification de LEVINE *et al.*, en 1980, (Figure 1) *Toxoplasma gondii* se situe dans l'embranchement des *Apicomplexa*, la classe des *Sporozoea*, la sous classe des *Coccidia*, l'ordre des *Eucoccidiida*, le sous-ordre des *Eimeriina*, et la famille des *Toxoplasmae*.

## **B. LE PARASITE: STRUCTURE ET EVOLUTION DES DIFFERENTS STADES PARASITAIRES**

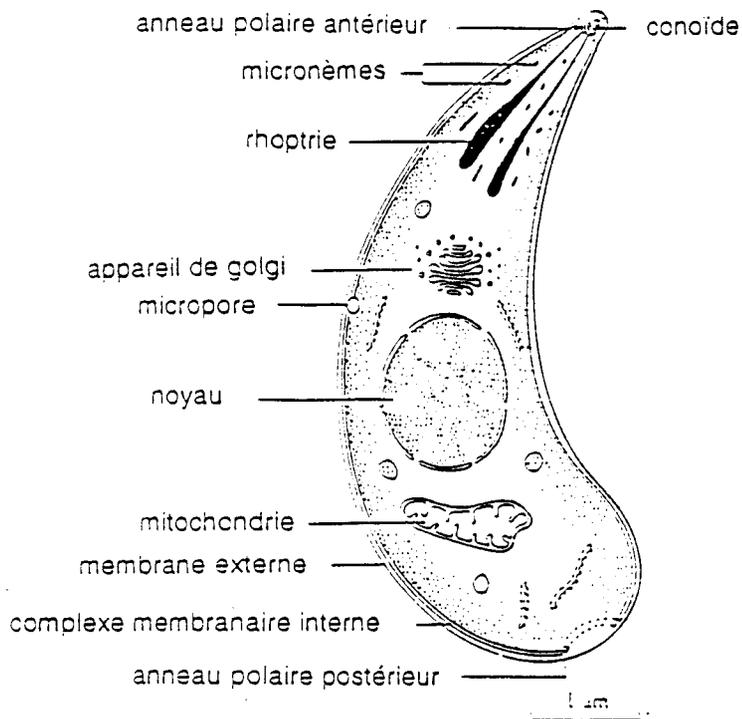
*T. gondii* se présente sous différentes formes au cours du cycle parasitaire. Néanmoins, trois stades sont infectieux : les tachyzoïtes, les bradyzoïtes, et les sporozoïtes.

### **B.I. LE TACHYZOÏTE: FORME PROLIFÉRATIVE**

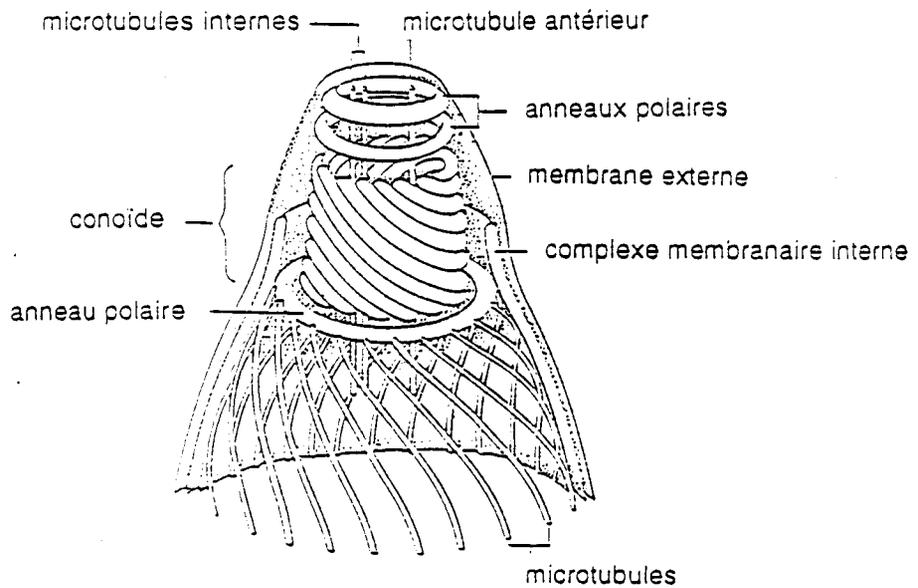
C'est la forme de multiplication intracellulaire rapide et brève du parasite, qui s'observe au cours de la phase aiguë de l'infection.

#### **B.I.1. Structure**

Le tachyzoïte est un organisme en forme d'arc, mesurant 6 à 7  $\mu\text{m}$  de long sur environ 2  $\mu\text{m}$  de large. Le tachyzoïte possède une membrane externe et un complexe membranaire interne double très fluides, dont la composition est quelque peu différente de bon nombre d'autres systèmes cellulaires (GALLOIS *et al.*, 1988). La membrane externe est continue tout le long du parasite, tandis que le complexe membranaire interne est interrompu au niveau des anneaux polaires antérieurs et postérieurs. Le noyau est généralement situé au pôle postérieur de la cellule, tandis que le pôle antérieur, effilé, présente un appareil de pénétration complexe, le conoïde (Figure 2A). De l'anneau polaire antérieur émerge un cytosquelette sous-pelliculaire comportant 22 microtubules (Figure 2B) (NICHOLS *et al.*, 1987). Les



A: Ultrastructure



B: Détail de la partie antérieure

**FIGURE 2****STRUCTURE DU TACHYZOITE**

(D'après NICHOLS et CHIAPPINO, 1987)

rhoptries, organes sécrétoires, se prolongent dans le conoïde par deux microtubules centraux et interviennent surtout lors de l'entrée du parasite dans la cellule (NICHOLS *et al.*, 1983). Entre les rhoptries se localisent de petites vésicules appelées micronèmes dont le rôle exact est encore mal connu.

### **B.I.2. Biologie du tachyzoïte**

Pour survivre et se multiplier, le tachyzoïte doit pénétrer dans une cellule-hôte et échapper aux mécanismes de défense mis en oeuvre par l'hôte parasité. Une des premières propriétés favorables à la survie du tachyzoïte, est l'incapacité de ce dernier à activer le complément par la voie alterne. Cette voie peut en effet être induite en absence d'anticorps et constitue donc une des premières défenses de l'hôte non immun (FUHRMAN et JOINER, 1989). Un second avantage de *T. gondii* est sa capacité à infecter de nombreuses cellules de mammifères, y compris les globules rouges (JADIN et CREEMERS, 1968).

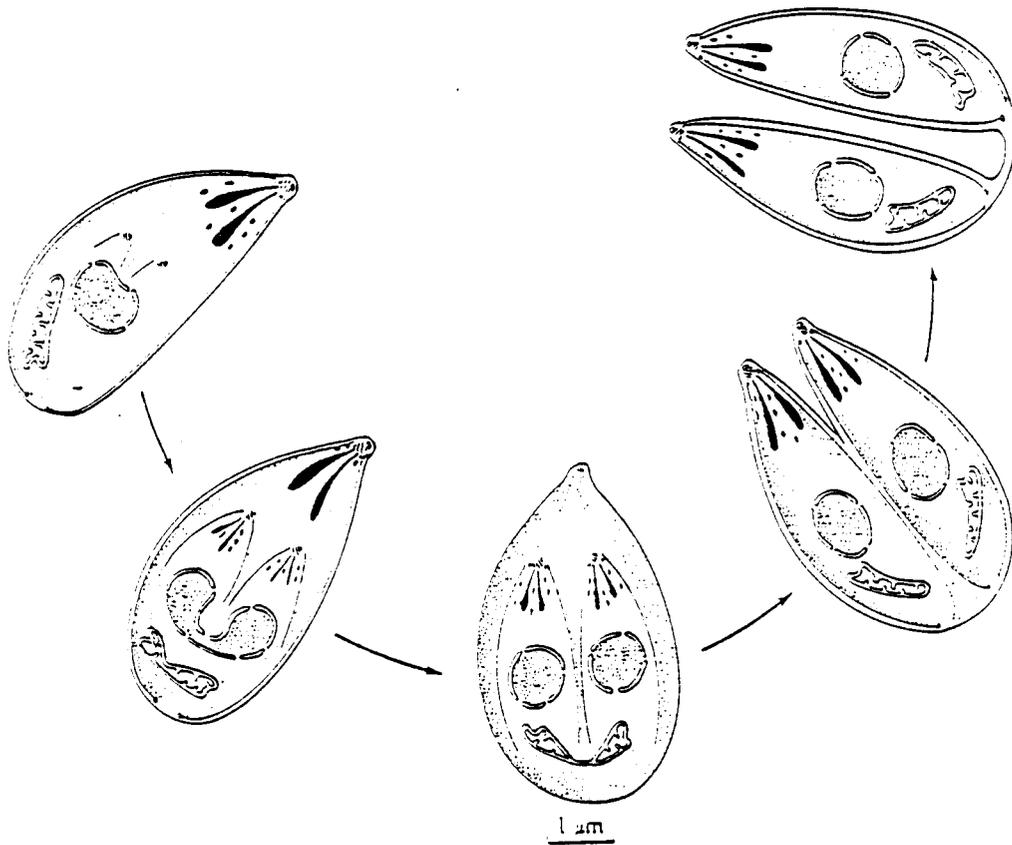
#### **Invasion active**

L'invasion active est le mécanisme le plus important permettant l'entrée rapide dans la cellule-hôte des toxoplasmes. Une pénétration par phagocytose a également été décrite, essentiellement dans les macrophages (WERK, 1985). Le processus actif s'effectue en deux étapes principales, attachement puis invasion. Peu d'éléments sont connus concernant les processus d'attachement, qui pourraient impliquer la laminine (JOINER *et al.*, 1989). Cependant, l'attachement provoque la création d'une jonction avec la cellule, jonction se déplaçant le long du parasite au cours de son entrée (AIKAWA *et al.*, 1977). Le parasite perturbe la membrane de la cellule-hôte grâce à l'extension du conoïde et aux sécrétions des rhoptries (DUBREMETZ *et al.*, 1985). Celles-ci contiennent probablement un facteur augmentant la pénétration, le PEF ("penetration enhancing factor", LYCKE *et al.*, 1975; SCHWARTMAN, 1986). Cette pénétration dans la cellule-hôte requiert des mécanismes

dépendant d'énergie (ATP), et dure moins de 15 secondes. La phospholipase A2 calcium-dépendante de *T. gondii* semble également jouer un rôle important à ce niveau. Cette enzyme de 20 kDa possède la capacité d'augmenter la pénétration cellulaire de *T. gondii* (SAFFER *et al.*, 1989,1991).

Dès l'entrée du parasite dans la cellule, il y a formation d'une vacuole parasitophore, décrite dès 1954 par GUSTAFSON. Au cours de ce processus, les tachyzoïtes déversent le contenu de leurs organites sécrétoires, ce qui entraîne ainsi l'accumulation de protéines dans la vacuole parasitophore et donne naissance à un réseau de microvillosités (KIMATA et TANABE, 1987; SIBLEY *et al.*, 1986, 1988). Plusieurs protéines de granules denses P23 (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1989), P28.5, P21 (CHARIF *et al.*, 1990), P30 (LERICHE et DUBREMETZ, 1991), P32 (SIBLEY et KRAHENBUHL, 1986), et P40 (ACHBAROU *et al.*, 1991) sont impliquées et semblent localisées différemment au niveau de la vacuole parasitophore. Cette vacuole modifiée est alors capable de résister au processus de fusion avec les lysosomes (SIBLEY *et al.*, 1985). L'acquisition de cette compétence s'établit lors de l'entrée du parasite dans la cellule, puisque la mort des tachyzoïtes dans la vacuole parasitophore ne permet pas la fusion avec les lysosomes (JOINER *et al.*, 1990). Des données récentes, essentiellement dérivées de l'étude de *Plasmodium*, suggèrent le rôle des lipides des rhoptries dans la formation de la vacuole parasitophore. Ces lipides pourraient être responsables, en partie, de l'absence de fusion avec les autres organelles (FOUSSARD et DUBREMETZ, 1991). Un autre mécanisme impliquerait l'exclusion de certains composants membranaires de la cellule-hôte (PORCHET-HENNERE et TORPIER, 1983 ; DE CARVALHO et DE SOUZA, 1989).

Enfin, après s'être installé dans la cellule-hôte, le tachyzoïte se divise par un processus appelé endodyogénie décrit par GOLDMAN *et al.*, en 1958 (Figure 3). La division dure entre 5 à 9 heures selon la souche étudiée. Puis, la cellule finit par éclater et libère un grand nombre de parasites qui vont infecter de nouvelles cellules.



**FIGURE 3**  
**MULTIPLICATION DU TACHYZOITE PAR ENDODYOGENIE**  
**(D'après GOLDMAN, 1958)**

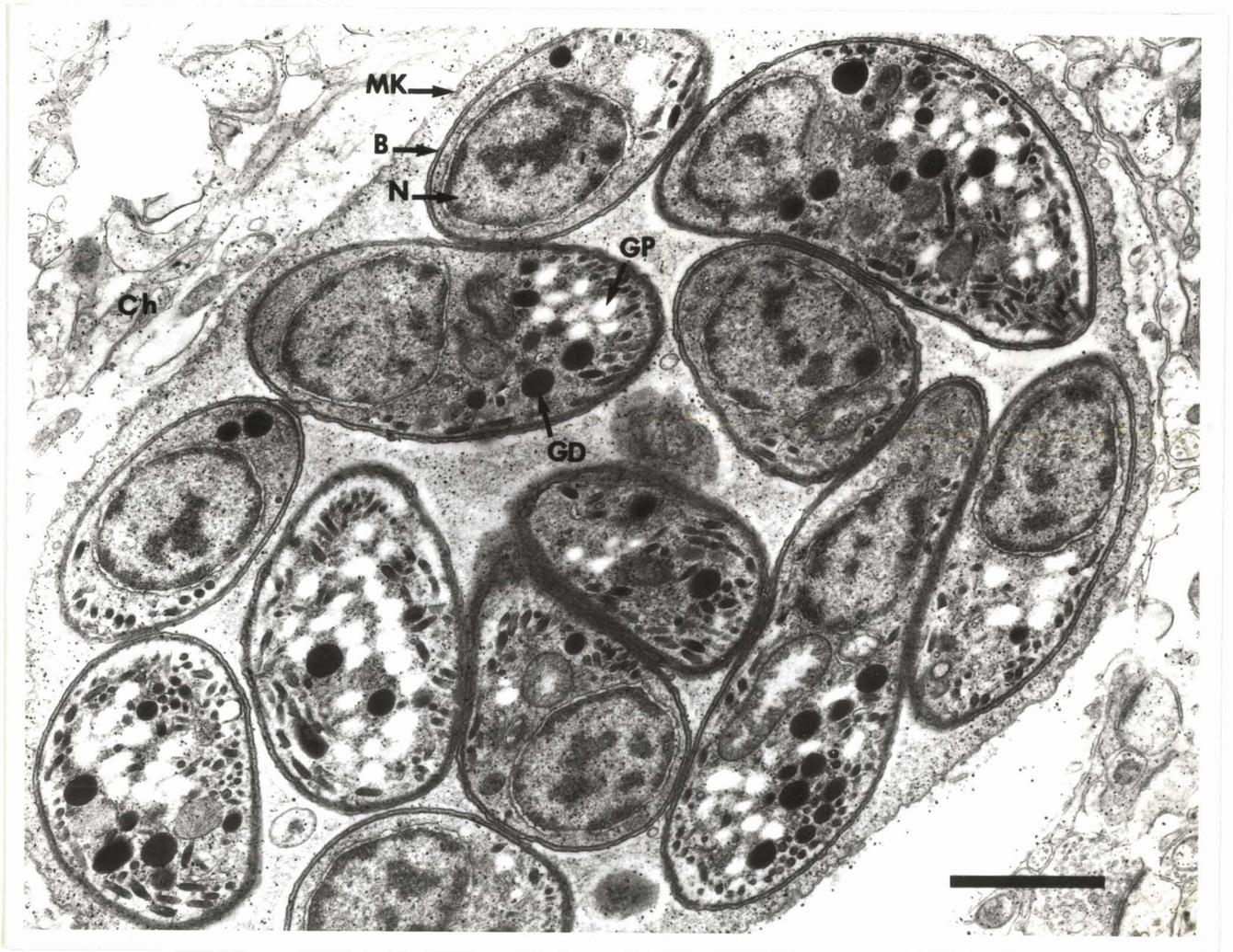
Des toxoplasmes opsonisés mais viables, peuvent aussi pénétrer dans la cellule-hôte. Cette pénétration s'effectue différemment selon que la cellule possède ou non un récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines qui conditionne par ailleurs, la destruction ou la survie du parasite. L'absence de récepteurs Fc sur la cellule-hôte, provoque l'entrée active des toxoplasmes dans la cellule, le regroupement des anticorps fixés en surface à un pôle du parasite ("capping"), puis l'élimination d'une partie de ces anticorps. Il n'y a pas de fusion avec les lysosomes ni destruction du parasite (DUBREMETZ *et al.*, 1985). La présence d'un récepteur Fc sur la cellule-hôte, et son internalisation lors de la phagocytose du parasite semble être un élément décisif entraînant par contre, la mort du toxoplasme (JOINER *et al.*, 1990). Le même résultat est obtenu lors de l'entrée de tachyzoïtes opsonisés dans des cellules transfectées par un récepteur Fc (FcRII) mais incapables de déclencher la production de radicaux oxygénés (JOINER *et al.*, 1990).

## **B.II. BRADYZOITES ET KYSTES**

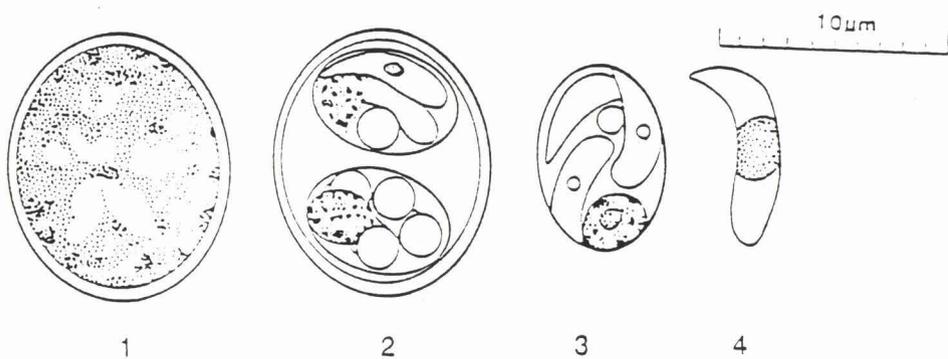
Au cours de la phase aiguë de la toxoplasmose, les parasites vont s'enkyster dans les muscles, le cerveau, le coeur et la rétine, où ils persistent pendant toute la vie de l'hôte (REMINGTON *et al.*, 1965). Les facteurs influençant la formation des kystes sont mal connus. Certains auteurs rapportent que des réponses anticorps élevées favorisent la formation des kystes, mais que l'immunité à médiation cellulaire intervient également (BRINKMANN *et al.*, 1987).

La paroi du kyste se forme à partir de la membrane de la vacuole parasitophore (FERGUSON *et al.*, 1987). Certaines études ont démontré que cette paroi comprend une couche neurofibrillaire au niveau de laquelle on trouve des composants de la cellule-hôte (SIMS *et al.*, 1988).

Les kystes sont des éléments intracellulaires sphériques ou ovoïdes pouvant atteindre 100 µm de diamètre qui peuvent contenir plusieurs milliers de formes à multiplication lente appelées bradyzoïtes. (Figure 4A). Néanmoins, récemment certains auteurs n'ont observé que



A. LE BRADYZOITE ET LE KYSTE: (GD=Granule dense; N=Noyau, B=Bradyzoïte; GP=Granule de polysaccharides; Ch=Cytoplasme de la cellule-hôte; Mk=Membrane du kyste)



B. L'OOCYSTE NON SPORULE (1), L'OOCYSTE SPORULE (2), LE SPOROCYSTE (3), ET LE SPOROZOITE (4)

#### FIGURE 4

#### AUTRES FORMES PARASITAIRES

(D'après DUBEY et BEATTIE, 1988)

des kystes extracellulaires chez des souris SWISS inoculées par la souche ME49 de *T. gondii*. Ces auteurs ont aussi noté la présence de bradyzoïtes à différents stades de maturation à l'intérieur du même kyste (PAVESIO *et al.*, 1992). Les kystes peuvent être détectés dès le 8<sup>ème</sup> jour après l'infection chez l'animal (LAINSON, 1958), sont thermorésistants (45°C) et ne sont détruits que par des congélations prolongées. Les bradyzoïtes ont une structure peu différente du tachyzoïte, mais ils contiennent un grand nombre de granules cytoplasmiques (réserves de polysaccharides). Ils sont aussi plus résistants que les tachyzoïtes aux sucs digestifs, bien que la paroi du kyste soit détruite immédiatement après l'ingestion (JACOBS *et al.*, 1960a).

Dans des conditions physiologiques, le kyste pourrait relarguer de faibles quantités d'antigènes dans l'organisme et permettre ainsi le maintien d'une immunité protectrice (HULDT, 1971). La rupture de kystes peut se produire occasionnellement *in vivo* chez un hôte immunocompétent sans entraîner de conséquences particulières (FERGUSON *et al.*, 1989). Cependant dans certains cas pathologiques, notamment chez les patients immunodéprimés, la rupture des kystes au cours de la phase chronique peut entraîner des lésions graves du type encéphalite et chorioretinite (FRENKEL, 1988).

### **B.III. FORMES DE LA PHASE SEXUEE DU CYCLE PARASITAIRE**

Toutes les étapes de la schizogonie (multiplication asexuée) et de la gamétogonie (multiplication sexuée) se déroulent dans les cellules épithéliales de l'intestin du chat. La gamétogonie est un phénomène complexe comportant 5 phases (A-E) conduisant à différentes formes:

#### **B.III.1. Les schizontes**

Ce sont des formes primaires multinucléées de la schizogonie (multiplication non sexuée) donnant naissance à 12 à 15 mérozoïtes, qui après éclatement de la cellule mère iront réinfecter d'autres cellules.

### **B.III.2. Les gamétocytes**

La différenciation en gamète mâle ou femelle survient autour de la troisième génération de schizogonie. Les gamétocytes mâles et femelles évoluent en microgamètes mâles et macrogamètes femelles. Le microgamète mâle représente le seul stade où le parasite est flagellé. Le macrogamète femelle présente deux sortes de granules cytoplasmiques appelés "wall forming bodies" I et II qui interviendront dans la formation de la paroi de l'oocyste.

### **B.III.3. Les oocystes et les sporozoïtes**

Les oocystes issus de la fécondation d'un macrogamète par un microgamète sont aussi des formes de résistance du parasite. Ils sont elliptiques et mesurent environ 9 et 14  $\mu\text{m}$  selon leurs deux axes. D'abord non sporulés, puis sporulés, ils contiennent alors deux sporocystes, donnant chacun quatre sporozoïtes (Figure 4B). La double paroi de l'oocyste est résistante à de nombreux agents chimiques.

Les sporozoïtes ressemblent morphologiquement au tachyzoïte. Ils mesurent environ 6-8  $\mu\text{m}$  de long, mais possèdent néanmoins plus de micronèmes et de rhoptries (SHEFFIELD *et al.*, 1970). Ils restent viables plus d'un an en atmosphère humide.

## **C. LE CYCLE PARASITAIRE**

Les toxoplasmes sont des sporozoaires présentant un cycle évolutif double faisant intervenir selon les cas, une reproduction uniquement asexuée (cycle incomplet) ou une multiplication asexuée et sexuée, seulement chez les félidés (cycle complet).

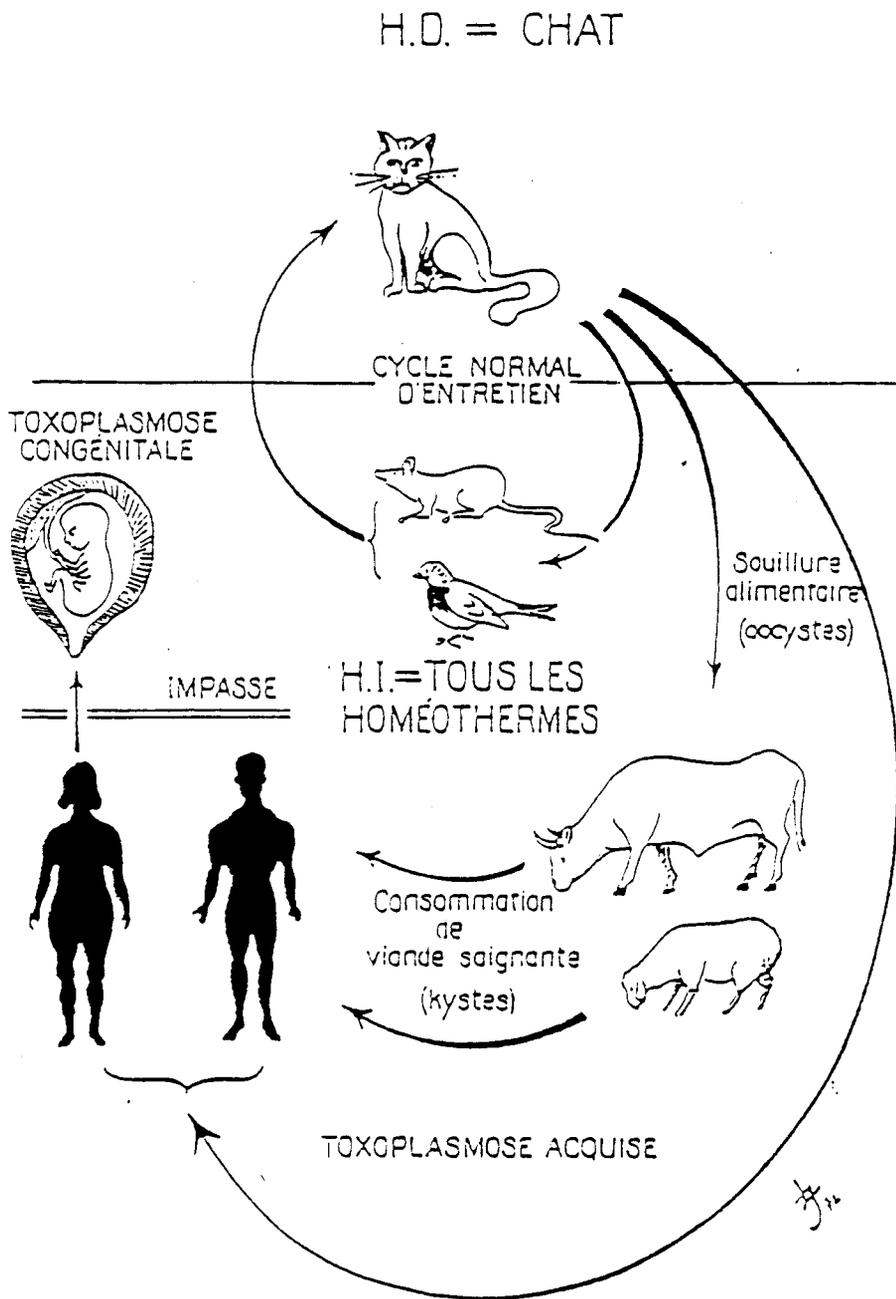
### **C.I. LE CYCLE ASEXUE**

C'est celui qui se déroule chez l'homme, les mammifères à sang chaud, et les oiseaux. La contamination s'effectue le plus souvent par voie digestive, lors de l'ingestion de kystes contenus dans la viande parasitée ou d'oocystes présents dans les aliments souillés par de la terre infectée. L'autre mode de contamination constitue le passage transplacentaire des parasites de la mère au fœtus provoquant la toxoplasmose congénitale (Figure 5).

Après digestion de la membrane du kyste ou de l'oocyste, les formes infestantes, bradyzoïtes ou sporozoïtes sont libérées dans l'intestin, pénètrent dans les cellules du système réticulo-endothélial, se multiplient puis se disséminent rapidement. La mobilisation du système immunitaire de l'hôte entraîne une diminution de la parasitémie et la formation des kystes. Les kystes sont observés en 3 à 5 jours chez la souris après infection par des tachyzoïtes, en 7 jours après inoculation par des bradyzoïtes et en 9 jours après inoculation de sporozoïtes (DUBEY *et al.*, 1976). Ces formes kystiques, de par leur résistance et leur longévité, représentent les principales formes infestantes du toxoplasme dans son cycle asexué.

### **C.II. LE CYCLE SEXUE**

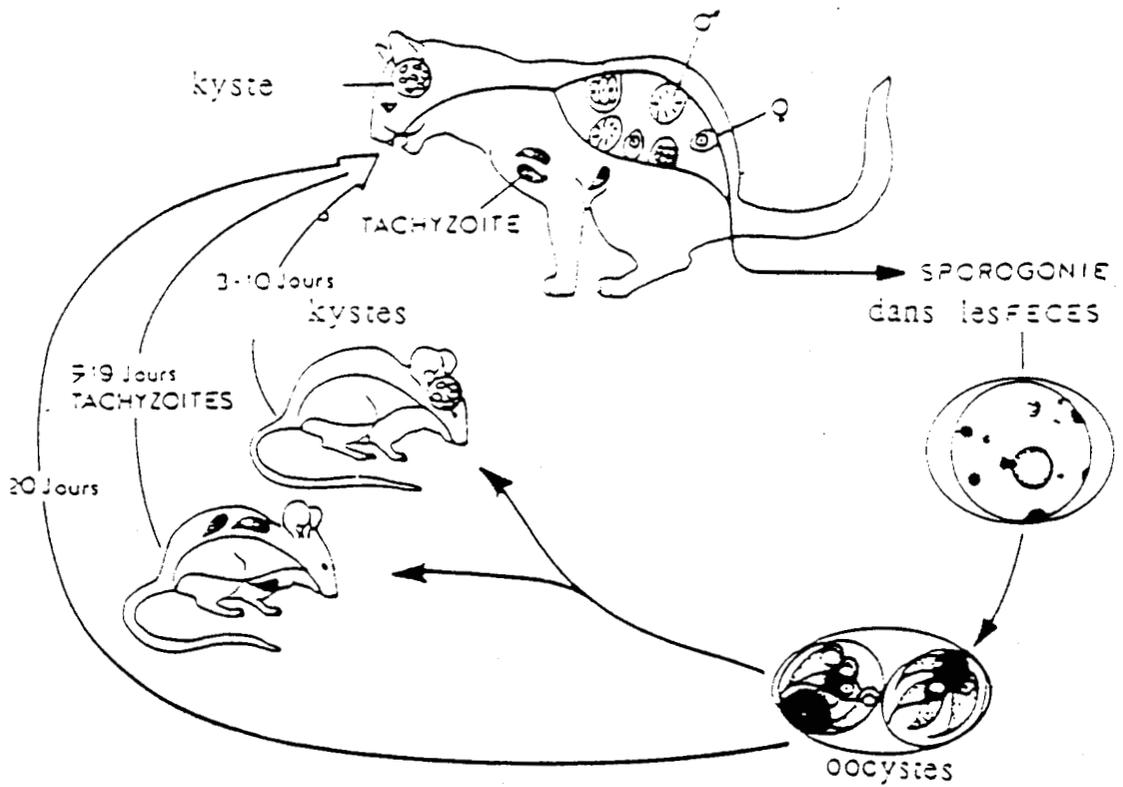
Ce cycle n'existe que chez les félinés, en particulier le chat, hôte définitif (Figure 6). Le chat se contamine en ingérant soit des kystes, soit des oocystes infestants, soit des tachyzoïtes. Le temps d'émission par le chat d'oocystes infestants dépend de l'infection initiale. Dans les deux derniers cas de contamination, une période de 21 à 40 jours est nécessaire, tandis que l'ingestion de kystes produit des oocystes au bout de 3 à 10 jours (FREYRE *et al.*, 1989). Les parasites pénètrent dans les cellules épithéliales de l'intestin et commencent le processus de gamétonie conduisant, après multiplication, à la formation de schizontes, puis de gamètes mâles et femelles dont la fusion produit l'oocyste non sporulé éliminé dans les fèces du chat. La



**FIGURE 5**

**CYCLE DU TOXOPLASME**

(D'après JACQUEMIN ET JACQUEMIN, 1980)



**FIGURE 6**

**CYCLE DE *TOXOPLASMA GONDII* CHEZ LE CHAT**

(D'après DUBEY et BEATTIE, 1988)

sporulation survient à l'extérieur en fonction des conditions d'oxygénation et de température, et produit 8 sporozoïtes infestants.

## **D. LA TOXOPLASMOSE**

### **D.I. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE: ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES**

L'incidence estimée par les tests sérologiques varie selon les pays de 20 à 90%. En France, DESMONTS *et al.*, établirent qu'en 1965, 80% de la population parisienne avait été infectée. Aux Etats-Unis, on admet que 30 à 60% des adultes ont été infectés par *T. gondii* (FRENKEL, 1990). La prévalence en France, n'est plus actuellement que d'environ 60%, vraisemblablement en raison de l'amélioration des conditions d'hygiène et des habitudes alimentaires (PINON *et al.*, 1985).

On distingue classiquement, la toxoplasmose acquise et la toxoplasmose congénitale.

#### **D.I.1. La toxoplasmose acquise**

Elle survient toujours après ingestion de viandes parasitées ou d'aliments souillés par des oocystes. En dehors des formes inapparentes les plus fréquentes, où la destruction de parasites intervient rapidement et où l'infection reste bénigne, les principales manifestations concernent les ganglions lymphatiques (formes lymphadéniques). Durant la phase aiguë de la maladie, on observe donc des polyadénopathies, une fièvre modérée (38°-38.5°C), et une asthénie qui peut être durable. La période d'incubation est évaluée entre 5 et 18 jours, puis, parallèlement au développement de l'immunité, les kystes apparaissent. La présence de kystes est habituellement asymptomatique, et signe l'installation d'une phase chronique.

La toxoplasmose acquise peut par contre revêtir l'aspect d'une maladie très grave voire mortelle chez des patients immunodéprimés et ceci par réactivation de foyers d'infection latente (WEISS *et al.*, 1988). Les bradyzoïtes libérés à partir des kystes peuvent alors reprendre leur multiplication sous forme de tachyzoïtes (ISRAELSKI et REMINGTON, 1988). C'est le cas au cours des traitements immunosuppresseurs, des transplantations d'organes (LUFT *et al.*, 1988), au cours de greffes de moelle quand le donneur est négatif et le receveur positif en anticorps toxoplasmiques (DEROUIN *et al.*, 1986; ARAUJO et REMINGTON, 1987).

Enfin, l'émergence de l'infection par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) a souligné l'importance de l'encéphalite toxoplasmique, principale infection opportuniste du système nerveux central chez les patients ayant un S.I.D.A (Syndrome d'immunodéficience acquise). Elle affecte 25% des patients à Bruxelles, Berlin et Paris et 5 à 10% des cas aux USA (McCABE et REMINGTON, 1988; LUFT *et al.*, 1988). De plus, chez ces patients, on n'observe pas d'augmentation de la réponse humorale avec présence d'IgM caractéristiques d'une infection aiguë, ce qui rend inadéquat le diagnostic sérologique classique (LUFT *et al.*, 1984b). Par contre, les réactivations toxoplasmiques s'accompagnent souvent de l'apparition d'anticorps IgA spécifiques (DARCY *et al.*, 1991). Chez d'autres patients, il peut aussi y avoir d'importantes lésions du myocarde (LUFT *et al.*, 1983) ou des lésions rétinienne pouvant conduire à la cécité (HOLLAND, 1988). Une incidence importante de toxoplasmose pulmonaire a également été décrite (CATTERALL *et al.*, 1986a; DEROUIN *et al.*, 1989).

### **D.I.2. La toxoplasmose congénitale**

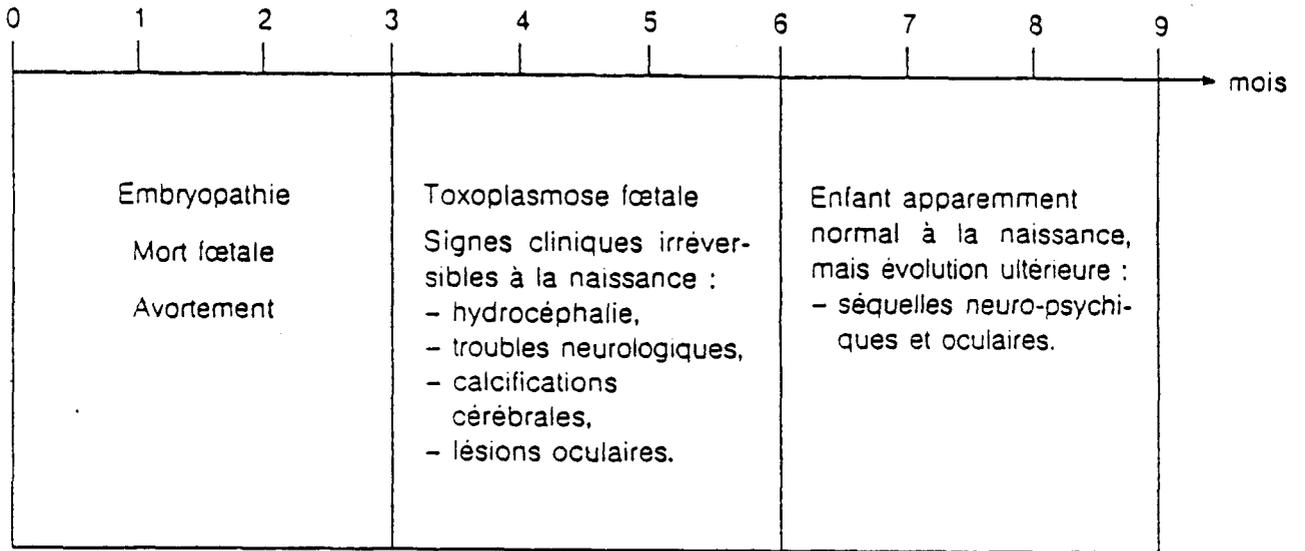
La fréquence de la toxoplasmose congénitale en France est estimée à environ 6 à 10 cas pour 1000 naissances (PINON *et al.*, 1986a). Elle est de 0,1 à 0,3% aux Etats-Unis (MITCHELL *et al.*, 1990).

Elle fait suite à une primo-infection maternelle contractée en cours de grossesse. Environ 40% des toxoplasmoses maternelles sont transmises *in utero* au fœtus au travers de petites lésions

placentaires. En théorie, le passage des toxoplasmes est possible dès la mise en place de la circulation foetale à partir du 21<sup>ème</sup> jour, cependant il semble plus probable que ce phénomène intervienne vers la fin du second mois quand le placenta est constitué et que la surface d'échange entre la circulation foetale et maternelle est importante. Le risque de transmission et la gravité des symptômes au cours de la grossesse sont inversement proportionnels (Figure 7). En effet, une toxoplasmose congénitale sévère est observée si l'infection survient au cours du premier ou du second trimestre, car elle affecte les étapes primordiales de l'embryogénèse. La protection exercée alors par le placenta est plus élevée et les risques de passage sont donc moins grands (12% entre la 6<sup>ème</sup> et la 16<sup>ème</sup> semaine, 20% entre la 16<sup>ème</sup> et la 28<sup>ème</sup> semaine). Par contre, en fin de grossesse, le placenta n'assure plus qu'imparfaitement sa fonction de barrière, les signes cliniques sont peu nombreux voire inapparents à la naissance, mais le passage des parasites est fréquent, jusqu'à 80% à partir de la 28<sup>ème</sup> semaine de grossesse (DAFFOS *et al.*, 1988). Une transmission survenant au tout début de la grossesse entraîne soit la mort du fœtus *in utero*, soit des signes pathologiques graves: macrocéphalie, hydrocéphalie, retards psychomoteurs, calcifications intracrâniennes, signes oculaires, notamment chorioretinite. Lors d'une infection au cours du quatrième mois de grossesse, le nouveau-né peut être atteint d'autres troubles tels que encéphalomyélite, convulsions, hépatosplénomégalie. Enfin, lors d'une contamination très tardive, des formes inapparentes, dont la seule trace est sérologique sont généralement observées. La survenue de chorioretinites toxoplasmiques décrites après plusieurs mois ou années justifie néanmoins un contrôle et un suivi rigoureux de ces patients. (AMBROISE-THOMAS et GARIN, 1984; FORESTIER *et al.*, 1990; FRENKEL *et al.*, 1988).

## **D.II. LA TOXOPLASMOSE VETERINAIRE**

La toxoplasmose reste un problème majeur de santé vétérinaire car elle affecte un grand nombre d'hôtes intermédiaires. Chez la brebis et la chèvre elle est responsable de plus de



**FIGURE 7**

**CONSEQUENCES D'UNE PRIMOIINFECTION CONTRACTEE EN COURS DE  
GROSSESSE**

(D'après DELETOILLE, Diagnostics Pasteur)

50% des avortements spontanés. Chez le mouton la prévalence de l'infection augmente avec l'âge et peut atteindre 100% chez la population adulte. Des essais de vaccination chez des brebis avec des souches de *T. gondii* de virulence modérée, ont conduit à une prévention significative de la toxoplasmose congénitale ovine (JOHNSON, 1989).

## **E. STRUCTURE ANTIGENIQUE DE T. GONDII**

Les nombreuses approches expérimentales utilisant les techniques d'électrophorèse en gel de polyacrylamide, de radiomarquage et d'immunotransfert ont permis d'établir l'extrême complexité des structures antigéniques de ce parasite.

C'est ainsi que de nombreux antigènes dont les poids moléculaires varient de 4000 à 800000 daltons selon les techniques utilisées, ont été identifiés (JOHNSON, 1985).

A cette diversité antigénique s'ajoute la présence de souches différentes (Figure 8) pour lesquelles on détecte des antigènes spécifiques de souche (WARE et KASPER, 1987).

De plus, des études isoenzymatiques ont établi l'existence de profils enzymatiques différents selon les souches, ce qui a permis de classer 7 souches de toxoplasmes en 3 zymodèmes distincts. Ces profils semblent, de plus, être corrélés au degré de virulence des différentes souches (DARDE *et al.*, 1988).

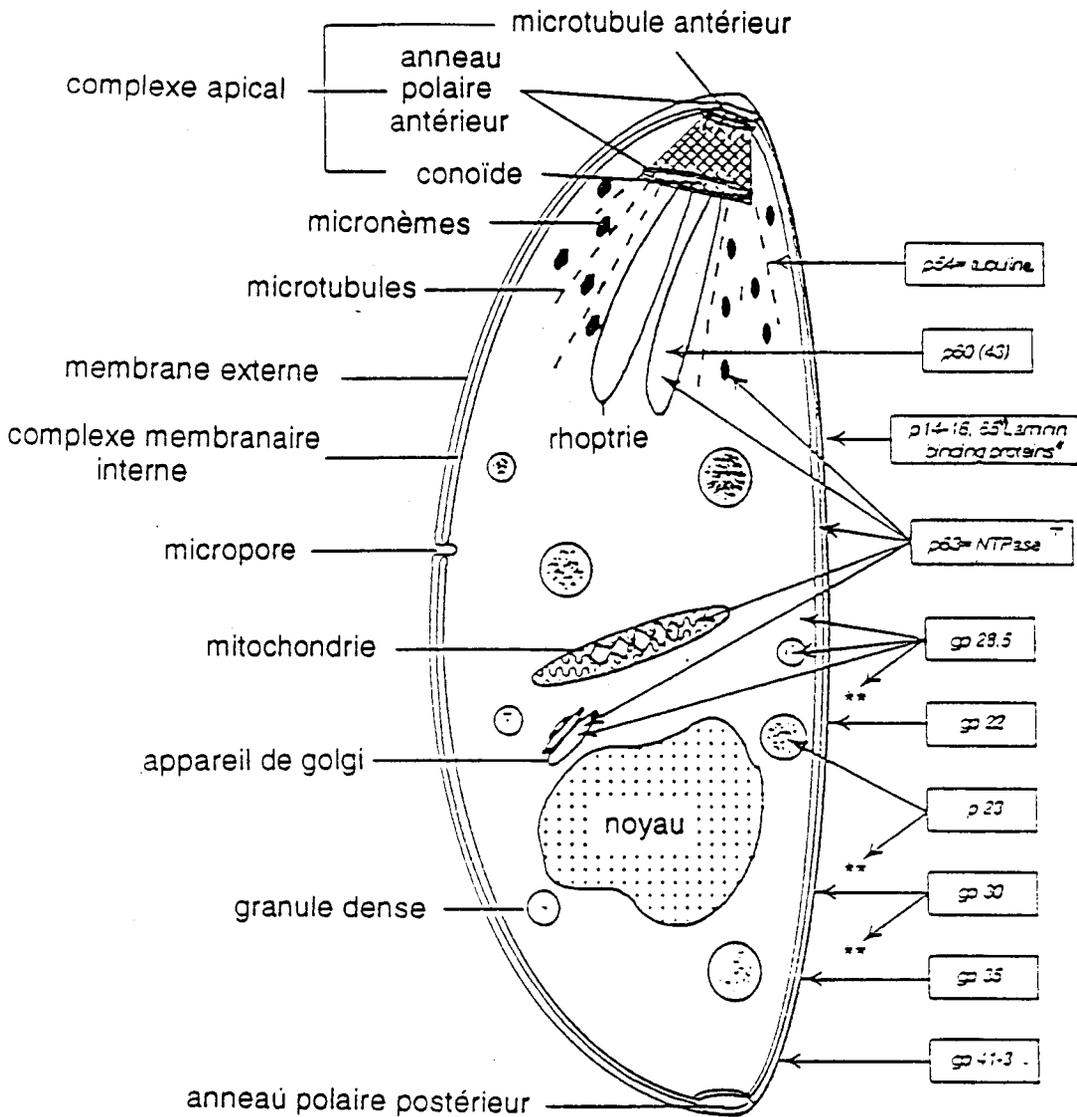
Le stade parasitaire le plus étudié reste le tachyzoïte, bien que quelques études se soient également focalisées sur d'autres stades du parasite.

### **E.1. LE TACHYZOÏTE**

Les antigènes présents chez le tachyzoïte peuvent être classés en différents groupes selon leur localisation ou leur rôle (Figure 9).

Différentes souches	Origine	Pathogénicité chez la souris	Références
Souche RH	Isolée en 1939 d'un cas d'encéphalite aiguë humaine (USA)	Souche virulente	SABIN, 1941
Souche P	Isolée d'un mouton en Californie, puis d'un placenta humain en 1983 Dérivée de la souche ME49	Souche virulente	KASPER <i>et al.</i> , 1985b
Souche C	Isolée d'un chat infecté en 1976 à Darmouth, USA, puis isolée d'un placenta humain en 1981 à Paris	Souche chronique	PFEFFERKORN <i>et al.</i> , 1977
Souche C56	Isolée d'ovaire de poulet en 1961 aux USA	Virulence modérée	ARAUJO <i>et al.</i> , 1976
Souche 76K	Isolée d'un cerveau de cobaye à Marseille en 1970	Souche chronique	LAUGIER et QUILICI, 1970
Souche ME49	Isolée d'un muscle de mouton	Souche avirulente	SUZUKI <i>et al.</i> , 1989

**FIGURE 8**  
**PRINCIPALES SOUCHES DE *T. GONDII***



\*\* Sécrétion dans la vacuole parasitophore

**FIGURE 9**  
**STRUCTURE ANTIGENIQUE DE *T. GONDII***  
 (D'après McLEOD, 1991)

### E.I.1. Les antigènes membranaires du tachyzoïte

Dès 1980, HANDMAN et REMINGTON ont identifié par des techniques d'immunoprécipitation d'antigènes radioiodés à l'aide de sérums immuns et d'anticorps monoclonaux, 4 antigènes majeurs de surface de poids moléculaires apparents de 43, 35, 27 et 14 kDa. Puis JOHNSON *et al.*, en 1983, ont décrit des antigènes de 43, 35, 22 et 14 kDa et ont établi que le transfert passif d'anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de 14 et 35 kDa est capable de protéger des souris contre la toxoplasmose. Enfin, la même année, SHARMA *et al.*, ont démontré par immunoélectrotransfert que les IgG et les IgM de sérums humains infectés reconnaissent majoritairement 2 antigènes de poids moléculaires apparents de 22, et 32 kDa ainsi qu'un composant de 6 kDa de nature glycosidique.

L'antigène de 22 kDa est reconnu par des sérums humains d'infection aiguë et chronique. Des mutants défectifs en antigène P22 ont été produits par KASPER *et al.*, en 1982.

L'antigène de 35 kDa est précocément reconnu par des sérums d'infection ce qui en fait un antigène d'intérêt diagnostique potentiel (POTASMAN *et al.*, 1986).

Les principaux antigènes de surface du tachyzoïte ont été clonés: P30 (BURG *et al.*, 1988), P22 (PRINCE *et al.*, 1990) et P43 (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1992 en préparation).

Finalement, les derniers travaux de COUVREUR *et al.*, en 1988, ont confirmé la présence de 4 antigènes majeurs de 43, 35, 30, 22 kDa et d'un antigène mineur de 23 kDa. Les 4 antigènes majeurs sont ancrés dans la membrane par un complexe glycosyl-phosphatidylinositol (TOMAVO *et al.*, 1989; NAGEL et BOOTHROYD, 1989).

#### L'antigène majeur de surface des tachyzoïtes: P30

Cette protéine de 30 kDa représentant 3 à 5% des protéines parasitaires a été purifiée par immunoabsorption à l'aide d'un anticorps monoclonal par KASPER *et al.*, en 1983. Cette molécule dont le gène a été cloné et séquencé, code pour un précurseur d'environ 32kDa (BURG *et al.*, 1988). Des mutants de *T. gondii* défectifs en antigène P30 ont également été

produits (KASPER, 1987). La séquence du gène codant pour P30 a été clonée dans un plasmide pGEX-1 et exprimée dans *E. coli*, sous forme d'une protéine de fusion associée à la glutathion-S-transférase (MAKIOKA et KOBAYASHI, 1991b, sous presse). Cette molécule est hautement conservée (97%) entre la souche parasitaire RH, et les souches C et P. (BÜLOW et BOOTHROYD, 1991).

P30 est distribuée de façon homogène sur la surface du parasite (DUBREMETZ *et al.*, 1985). Cette molécule est présente dans la vacuole parasitophore (réseau de microvillosités) très tôt après l'invasion, et est aussi un composant majeur de la membrane de la vacuole parasitophore (SIBLEY *et al.*, 1986). Son rôle fonctionnel au cours de l'invasion a par ailleurs été confirmé par GRIMWOOD et SMITH, en 1992, cette phase étant inhibée partiellement par des anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène P30.

L'antigène P30 est enfin fortement immunogène et induit une réponse polyisotypique intense au cours de l'infection. La protéine P30 est en effet, fortement reconnue par les anticorps d'isotype IgG et IgM (SHARMA *et al.*, 1983; SANTORO *et al.*, 1986; HUSKINSON *et al.*, 1989), IgA (DECOSTER *et al.*, 1988a, 1991, 1992; HUSKINSON *et al.*, 1990; GODARD *et al.*, 1990), et IgE (PINON *et al.*, 1990; GODARD *et al.*, 1990). Cette propriété a permis d'utiliser un monoclonal dirigé contre P30 dans deux tests d'immunocapture, l'un pour la détection des IgM (CESBRON *et al.*, 1985) et l'autre pour la détection des IgA (DECOSTER *et al.*, 1988, 1991, 1992) permettant un diagnostic précoce de l'infection.

### **E.I.2. Les antigènes cytoplasmiques**

Ces antigènes ont été caractérisés dans un extrait soluble obtenu après traitement aux ultrasons ou après des congélations et décongélations successives de tachyzoïtes. L'utilisation d'un anticorps monoclonal FMC 20 ne réagissant pas dans les tests d'immunofluorescence classique mais étant capable de réagir dans un test d'hémagglutination indirecte a permis l'identification d'un antigène de 98 kDa dans un extrait soluble du parasite (JOHNSON *et al.*,

1983). Un autre antigène, la nucléoside triphosphate hydrolase est bien connue grâce aux travaux de ASAI *et al.*, (1983, 1987). Cette hydrolase est localisée dans le cytoplasme des toxoplasmes de la souche RH et a un poids moléculaire apparent de 240 à 260 kDa. Elle constitue environ 8% des protéines parasitaires.

### **E.I.3. Les antigènes sécrétés par le parasite**

#### **E.I.3.a. Les antigènes excrétés-sécrétés (ES)**

Ces antigènes ont été quelque peu délaissés par rapport aux antigènes solubles et surtout membranaires, longtemps considérés comme les cibles principales de la réponse immune. Les antigènes d'excrétion-sécrétion sont cependant des molécules très immunogènes possédant des activités enzymatiques variées et pouvant être exprimées transitoirement à la surface du parasite, comme cela a été démontré dans d'autres maladies parasitaires à helminthes telles que la schistosomiase (DAMONNEVILLE *et al.*, 1986), au cours de l'infection par *Toxocara canis* (MAIZELS *et al.*, 1987), et également dans d'autres protozooses comme la leishmaniose (SACKS *et al.*, 1987) ou la trypanosomiase (OUAISSI *et al.*, 1990). Ces antigènes peuvent donc être de bons candidats pour une approche immunoprophylactique (CAPRON et DESSAINT, 1988).

Dans la toxoplasmose, deux études préliminaires ont souligné l'importance de ces antigènes. HUGHES et VAN KNAPPEN en 1982, ont montré que les antigènes sécrétés constituent la majeure partie des antigènes circulants au tout début de l'infection. Ces antigènes sont donc les premiers exposés au système immunitaire de l'hôte parasité. D'autre part, la stimulation lymphocytaire vis-à-vis de tels antigènes semble plus importante que celle induite par les antigènes somatiques du parasite (HUGHES *et al.*, 1985).

La mise au point de milieux de culture appropriés, permettant une survie optimale des parasites, a rendu possible l'obtention des antigènes ES dont une analyse immunochimique a alors pu être réalisée. Après marquage métabolique des toxoplasmes par la méthionine  $^{35}\text{S}$ ,

l'immunoprécipitation des antigènes marqués par différents sérums d'infection expérimentale ou humaine, ou par des sérums d'immunisation a permis la mise en évidence des antigènes d'excrétion-sécrétion les plus immunogènes tels que les antigènes de 97, 57, 42, 39, et 28.5 kDa (DARCY *et al.*, 1988).

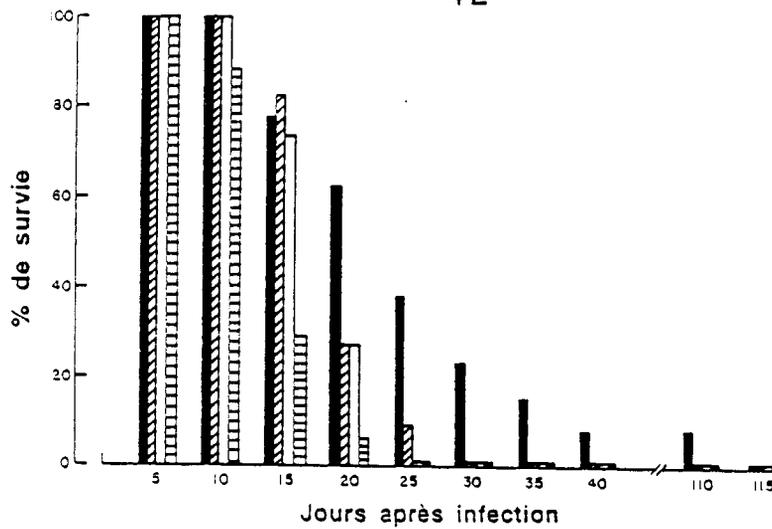
Ces antigènes se sont révélés protecteurs dans deux modèles particuliers. Chez le rat congénitalement athymique "nude" (Nu/Nu), le transfert passif de sérum de rats Fischer immunisés par les antigènes ES, et le transfert de cellules T spécifiques de ces antigènes ont protégé significativement cet animal vis-à-vis d'une infection létale par la souche RH (Figure 10) (DARCY *et al.*, 1988; DUQUESNE *et al.*, 1990). Chez la souris immunisée par ces mêmes antigènes, puis infectée par 1200 kystes de la souche 76K par voie orale, une protection d'environ 70% a également été démontrée (DARCY *et al.*, 1992)

La production d'anticorps monoclonaux de classe IgG dirigés contre les antigènes de sécrétion de 28.5, 27 et 21 kDa a rendu possible l'identification et la localisation de ces antigènes dans la matrice des granules denses des tachyzoïtes et associés au réseau présent dans la vacuole parasitophore. Un nouveau mécanisme de sécrétion des tachyzoïtes à partir des granules denses a ainsi pu être démontré (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1989; CHARIF *et al.*, 1990; LERICHE et DUBREMETZ, 1990).

De plus, l'anticorps monoclonal TG 17-43 dirigé contre l'antigène de 27 kDa a permis d'établir l'identité de ce dernier avec l'antigène recombinant P24, dont le gène a été cloné et séquencé (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1989). Cette protéine est capable de fixer le calcium.

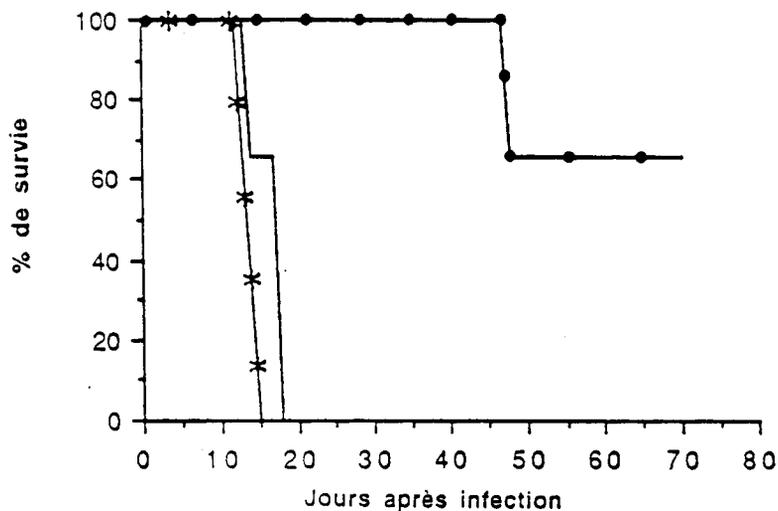
Certains auteurs ont démontré que le transfert passif de l'anticorps monoclonal F3G3 (HANDMAN et REMINGTON, 1980a) dirigé contre deux protéines de 28 (correspondant vraisemblablement à l'antigène de sécrétion GP28,5) et 58 kDa (SIBLEY *et al.*, 1987), ainsi que l'immunisation avec l'antigène correspondant purifié par immunoaffinité protège la souris contre une infestation létale par la souche C56 de *T. gondii* (SHARMA *et al.*, 1984).

Le gène codant pour l'antigène de 28 kDa a fait l'objet d'un clonage et d'un séquençage (PRINCE *et al.*, 1989). Dans notre laboratoire l'anticorps monoclonal TG17-179 dirigé contre



Transfert passif de:

- Sérum de rats immunisés par les ES
- ▨ Sérum de rats infectés par 10<sup>5</sup> tachyzoïtes vivants
- Sérum de rats infectés par 10<sup>5</sup> tachyzoïtes irradiés
- ▤ Sérum de rats n'ayant reçu que l'adjuvant (AIF)



Transfert passif de:

- 10<sup>4</sup> cellules T spécifiques des antigènes ES
- × 10<sup>4</sup> cellules T spécifiques de la BSA
- Témoin d'infection par 10<sup>5</sup> tachyzoïtes

**FIGURE 10**

**ROLE PROTECTEUR DES ANTIGÈNES D'EXCRETION-SECRETION**

(D'après DARCY, 1988 et DUQUESNE, 1990)

la protéine de 28.5 kDa a permis l'isolement de clones cDNA codant pour la partie carboxyterminale de l'antigène qui correspond à un épitope B majeur (CESBRON-DELAUW *et al.*, 1992 sous presse).

L'étude de la réponse IgG et IgM au cours des différentes phases de la toxoplasmose humaine a permis d'établir que les deux antigènes sécrétés, de 27 et 28.5 kDa, sont reconnus par des sérums humains de phase chronique, et que l'antigène de 28,5 est également reconnu par des sérums aigus d'infection (MURRAY *et al.*, 1992 en préparation). De plus, un antigène de 97 kDa, reconnu très tôt lors de l'infection pourrait représenter un marqueur potentiel de séroconversion (DECOSTER *et al.*, 1988b).

Il faut en fait distinguer ces antigènes sécrétés par le toxoplasme en milieu acellulaire de ceux que certains auteurs ont appelé "exoantigènes". Ces exoantigènes sont récoltés dans les surnageants de cultures cellulaires infectées par *T. gondii*, et possèdent de ce fait un grand nombre de protéines d'origine cellulaire (DESGEORGES *et al.*, 1980 ; HUGHES et VAN KNAPPEN, 1982; CHUMPITAZI *et al.*, 1983, 1987). Le rôle protecteur de ces antigènes de poids moléculaires variant de 6 à 800 kDa (ROQUES *et al.*, 1986) n'a pas été démontré.

### E.I.3.b. Les antigènes de rhoptries

Ces antigènes sont impliqués dans l'invasion de la cellule hôte et contiennent une activité PEF ("penetration enhancing factor", LYCKE et NORRBY, 1966; LYCKE *et al.*, 1975). Ils ont été récemment caractérisés, à l'aide d'anticorps monoclonaux et par immunotransfert d'une sous-fraction cellulaire enrichie en rhoptries. Deux antigènes majeurs de poids moléculaires respectifs de 55 et 60 kDa (SADAK *et al.*, 1988) ont été identifiés.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de rhoptries de 60 et 43 kDa décrits par SCHWARTZMAN et KRUG, en 1989, se sont avérés capables de bloquer l'effet du P.E.F. sur la pénétration des toxoplasmes. Enfin, un antigène de 42 kDa a aussi été décrit par KIMATA *et al.*, en 1987.

## E.II. LES ANTIGENES DES AUTRES STADES PARASITAIRES

Les antigènes spécifiques de stade ont été peu étudiés jusqu'à présent. Ce sont les travaux de KASPER *et al.*, en 1984 qui ont permis l'identification de 2 antigènes de 67 et de 25 kDa, caractéristiques de la membrane du sporozoïte et de la paroi de l'oocyste.

Puis, un antigène de poids moléculaire apparent de 20 kDa apparemment cytoplasmique, spécifique des bradyzoïtes et commun à plusieurs souches de *T. gondii* a été identifié (OMATA *et al.*, 1989), ainsi que 4 antigènes de poids moléculaires apparents 36, 34, 21, et 18 kDa dont trois au moins sont probablement des antigènes de surface des bradyzoïtes (TOMAVO *et al.*, 1991). Enfin, certains anticorps monoclonaux dirigés contre la forme tachyzoïte, notamment contre les antigènes de 22 et de 30 kDa, ne réagissent pas avec la surface des sporozoïtes et des bradyzoïtes (KASPER, 1989). Récemment, MAKIOKA *et al.*, (1991c), ont confirmé l'existence d'antigènes spécifiques de stade tachyzoïte et bradyzoïte chez la souche ME49 de *T. gondii*, à l'aide de sérums d'infection humaine et expérimentale.

D'autres auteurs se sont orientés vers la recherche d'antigènes des différents stades présentant des épitopes communs. Ceci repose sur l'hypothèse, qu'au cours des affections chroniques caractérisées par une immunité non stérilisante comme la toxoplasmose, une immunité durable ne pourrait être maintenue que grâce à l'expression d'épitopes communs entre les différents stades d'évolution parasitaire. Ces épitopes communs présenteraient donc un intérêt indéniable dans la conception d'une immunoprophylaxie efficace.

Ce sont essentiellement les travaux de DARCY *et al.*, en 1990 qui décrivent 4 antigènes de tachyzoïtes de 63, 43, 39, et 28.5 kDa reconnus par des sérums dirigés contre des extraits de bradyzoïtes, et la présence d'une molécule de 43 kDa de bradyzoïtes reconnue par des sérums dirigés contre le tachyzoïte. Ces travaux ont été confirmés par TOMAVO *et al.*, (1991), qui démontrent la présence de deux antigènes de surface communs au bradyzoïte et au tachyzoïte: P43 et P23. Enfin, des antigènes de rhoptries de 55 et 60 kDa sont également communs aux différents stades, tachyzoïte, bradyzoïte et sporozoïte (SADAK *et al.*, 1988).

## **F. LA REPONSE IMMUNE CONTRE T. GONDII**

Au cours de l'infection par *T. gondii*, la réponse immune fait intervenir à la fois des mécanismes humoraux et cellulaires. La part respective de chaque type de mécanisme est encore mal connue et dépend surtout de l'hôte considéré, bien que la part prépondérante de l'immunité à médiation cellulaire soit généralement admise (REMINGTON et KRAHENBUHL, 1982; JOHNSON, 1990). La résistance à la réinfection, bien établie chez l'homme immunocompétent, a été observée également dans de nombreuses espèces de laboratoire dont la souris, le lapin, le hamster, et le singe rhésus. Cette résistance apparaît 2 à 4 mois après l'infection initiale, mais n'élimine pas les parasites de la primo-infection: c'est une immunité non stérilisante encore appelée immunité de prémunition.

### **F.I. IMPORTANCE DE LA REPONSE A MEDIATION CELLULAIRE**

#### **F.I.1. Mise en évidence de la réponse à médiation cellulaire**

L'immunité à médiation cellulaire au cours de la toxoplasmose peut être détectée *in vitro* et *in vivo*.

*In vivo*, on peut mettre en évidence une réaction d'hypersensibilité retardée (HSR), vis-à-vis d'un antigène total de *T. gondii*. Cette réaction a été décrite chez l'homme par FRENKEL (1948), ainsi que dans de nombreux modèles animaux. Elle peut apparaître tardivement, plusieurs mois à plusieurs années après l'infection initiale (REMINGTON et KRAHENBUHL, 1982). Chez l'homme ce type de réponse peut être provoqué par un test cutané d'injection d'antigènes toxoplasmiques et reflète la présence d'une infection chronique. Une modification du test cutané utilisant des exoantigènes parasitaires a permis d'en augmenter la spécificité et la sensibilité (ROUGIER *et al.*, 1985).

*In vitro*, la prolifération lymphocytaire vis-à-vis d'antigènes de *Toxoplasma gondii* a pu être observée par le test de transformation lymphoblastique (TTL).

Chez l'homme, plusieurs études ont été réalisées à l'aide d'extraits antigéniques totaux ou d'antigènes excrétés-sécrétés par le parasite (KRAHENBUHL *et al.*, 1972; HUGHES *et al.*, 1985). Différentes études ont démontré que les lymphocytes T de certains patients en phase aiguë de la toxoplasmose prolifèrent moins en réponse à l'antigène que des lymphocytes de patients en phase chronique (LUFT *et al.*, 1984a; ANDERSON *et al.*, 1977). En effet, chez certains sujets, une réponse proliférative T est détectée dès 1 à 3 mois après l'infection, mais cette réponse est présente chez l'ensemble des sujets à partir d'1 an (MADDISON *et al.*, 1979; ANDERSON *et al.*, 1979), et peut persister très longtemps (au moins 20 ans).

Cette méthode possède un intérêt dans les cas de toxoplasmose congénitale puisqu'elle peut être appliquée à des enfants âgés de moins d'un an (WILSON *et al.*, 1980), bien qu'une absence totale de prolifération vis à vis d'antigènes de *T. gondii* puisse être néanmoins observée dans certains cas (McLEOD *et al.*, 1985). Enfin, une réponse proliférative importante vis-à-vis de l'antigène P22 a été décrite chez des patients présentant une toxoplasmose oculaire (NUSSENBLATT *et al.*, 1989).

### **F.I.2. Implication des différentes cellules et de leurs produits de sécrétion dans l'immunité**

La réponse contre *T. gondii* fait intervenir un grand nombre de populations cellulaires effectrices, parmi lesquelles les macrophages et les lymphocytes T jouent un rôle prépondérant, mais implique également les plaquettes et les cellules NK. De nombreuses lymphokines agissant sur ces différents types cellulaires sont impliquées dans ces mécanismes, cependant l'IL2 et l'IFN  $\gamma$  semblent jouer un rôle prépondérant au cours de l'immunité (Figure 11). Un grand nombre d'équipes se sont attachées à l'étude approfondie de cette réponse afin de comprendre le rôle respectif de chaque type cellulaire.

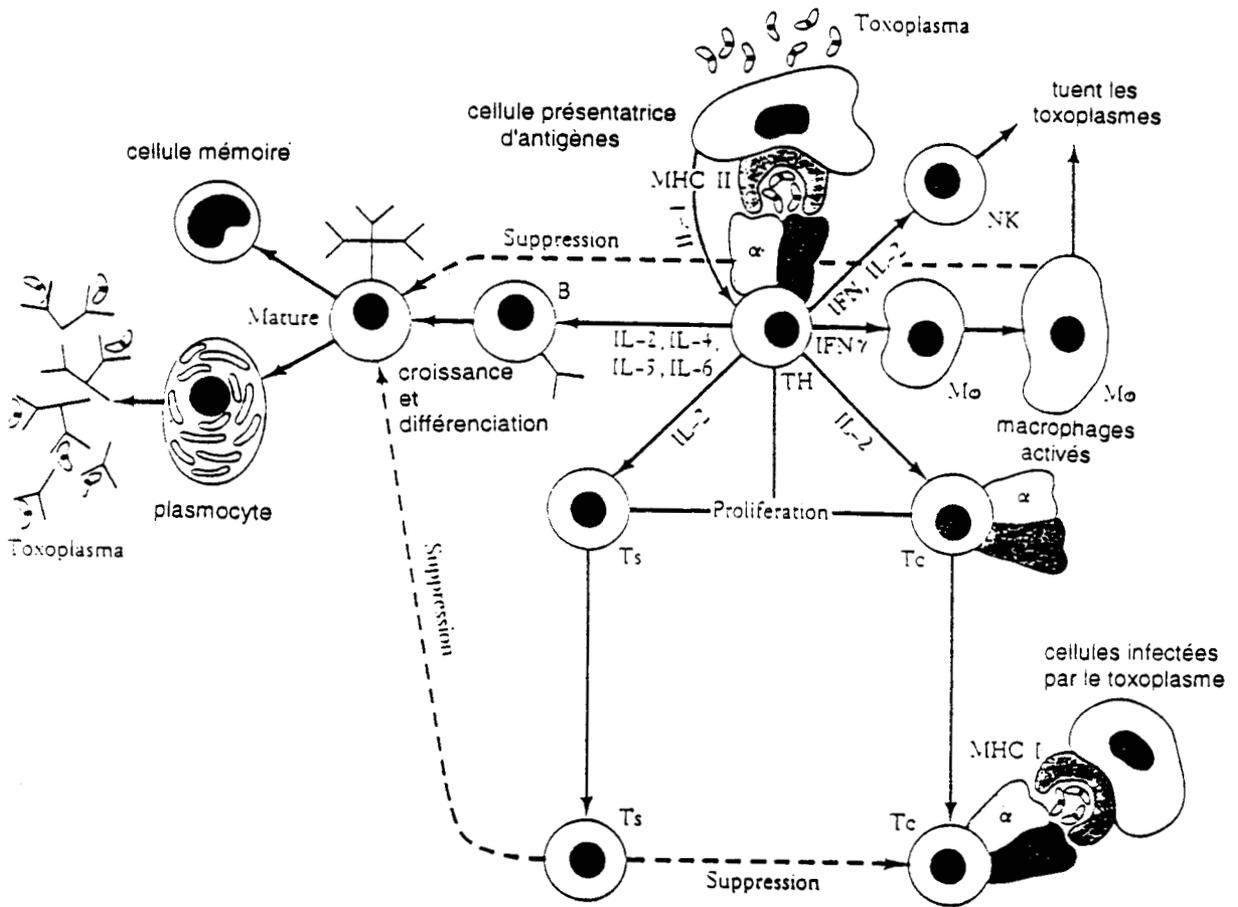


FIGURE 11

**IMMUNITE HUMORALE ET CELLULAIRE AU COURS DE LA  
TOXOPLASMOSE**

(D'après SHARMA, 1990 )

### F.I.2. a. Rôle des cellules à activité phagocytaire: macrophages et neutrophiles

Dans les macrophages, la pénétration de *toxoplasmes opsonisés* entraîne la mort intracellulaire du parasite. Des parasites préalablement traités par du sérum décomplémenté de souris immune ou par des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface du parasite sont phagocytés par les macrophages. On observe alors une fusion entre la vacuole parasitophore et les lysosomes entraînant une acidification de la vacuole et la destruction des parasites (JONES *et al.*, 1972a et b et 1975; ANDERSON *et al.*, 1976; SETHI *et al.*, 1981; HAUSER et REMINGTON, 1981). Des mécanismes dépendant de l'oxygène sont impliqués dans la destruction des parasites par les macrophages. Ces mécanismes entraînent la production de métabolites spécifiques dont le radical  $\text{OH}^\circ$  et l'anion superoxyde qui sont actifs sur *T. gondii* (MURRAY *et al.*, 1979; HUGHES, 1988). Au cours de la phagocytose de toxoplasmes opsonisés on observe une activation de la NADPH oxydase; ceci est en faveur d'une augmentation de l'activité oxydative des macrophages (DE CARVALHO et DE SOUZA, 1989).

Par contre, le comportement des macrophages vis-à-vis de *tachyzoïtes vivants non opsonisés*, varie selon les espèces:

L'entrée de toxoplasmes vivants dans des macrophages de souris saine n'entraîne pas la destruction du parasite. Il n'y a pas de fusion entre la vacuole parasitophore et les lysosomes (JONES *et al.*, 1972b; BLOOM, 1979; NICHOLS et O'CONNOR, 1981), pas d'acidification de la vacuole parasitophore ni de génération de radicaux libres (WILSON *et al.*, 1980). Des macrophages de souris infectées exercent par contre une action statique ou lytique vis-à-vis des parasites avec implication de processus oxydatifs (MURRAY *et al.*, 1979).

Chez le rat et l'homme, naturellement résistants à l'infection par *T. gondii*, les macrophages alvéolaires et péritonéaux tuent les toxoplasmes sans qu'il y ait besoin de stimulation préalable, par des mécanismes essentiellement non oxydatifs (MURRAY *et al.*, 1985; McCABE et REMINGTON, 1986; CATTERALL *et al.*, 1986b et 1987).

*En conclusion*, la destruction des parasites dans les macrophages peut donc provenir de deux mécanismes différents, oxygène-dépendant et oxygène-indépendant, le premier mécanisme semblant néanmoins prépondérant.

Enfin, les tachyzoïtes sont capables de proliférer dans 25 à 35% des neutrophiles humains (NAKAO et KONISHI, 1991a et b). Par contre, l'opsonisation des parasites entraîne rapidement leur mort dans ces cellules.

#### E.I.2.b. Rôle des lymphocytes et des lymphokines

Le rôle primordial des lymphocytes dans l'immunité protectrice a été établi dès 1967 par FRENKEL. Le transfert de cellules spléniques ou ganglionnaires d'un hamster immun à d'autres hamsters induit une protection significative contre une infection léthale par *T. gondii*. Le transfert passif de cellules thymiques de souris normales à des souris athymiques "nude" confère à ces dernières une résistance contre l'infection (LINDBERG et FRENKEL, 1977). Le transfert de lymphocytes T non spécifiques provenant de rats euthymiques chez le rat "nude", permet aussi de restaurer la résistance à l'infection (SANTORO *et al.*, 1987). Le transfert passif de cellules de la rate provenant de souris immunisées avec le mutant thermosensible ts-4 de *T. gondii* (PFEFFERKORN et PFEFFERKORN, 1976) a permis d'obtenir une protection vis à vis de la souche modérée C56, et d'établir la participation des cellules L3T4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) et Lyt2<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) dans la résistance à l'infection (SUZUKI et REMINGTON, 1988a; NAGASAWA *et al.*, 1991). Ces travaux ont été confirmés récemment par d'autres auteurs (GRAZINELLI *et al.*, 1991; ARAUJO, 1991) montrant que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> participeraient au développement d'une résistance au cours de la vaccination par le mutant ts-4 de *T. gondii*, et pendant la phase aiguë de la toxoplasmose, tandis que les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> seraient impliqués dans le maintien de l'immunité protectrice (KHAN *et al.*, 1991; NAGASAWA *et al.*, 1991).

Ces 2 types cellulaires interviendraient dans le contrôle de la formation des kystes (BROWN et Mc LEOD, 1990; PARKER *et al.*, 1991).

D'autre part, les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> humains ou murins sont impliqués dans la lyse directe de tachyzoïtes extracellulaires (KHAN *et al.*, 1988b, 1990). Chez l'homme et la souris, les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont également impliquées dans la destruction de parasites intracellulaires (YANO *et al.*, 1989; SUBAUSTE *et al.*, 1991; KASPER *et al.*, 1992).

Parmi les différentes lymphokines, l'interféron  $\gamma$  semble jouer un rôle prépondérant dans la résistance à l'infection (SUZUKI *et al.*, 1988b). Chez la souris, l'interféron  $\gamma$  endogène semble être impliqué dans la prévention de l'encéphalite toxoplasmique (SUZUKI *et al.*, 1989). D'autre part, l'injection d'interféron  $\gamma$  recombinant prévient la mort des animaux par toxoplasmose aiguë (McCABE *et al.*, 1984). Le traitement par l'interféron  $\gamma$  de souris chroniquement infectées, réduit significativement la réponse inflammatoire dans le cerveau (SUZUKI *et al.*, 1990b). D'autre part, un traitement par un anticorps monoclonal anti-interféron  $\gamma$  supprime l'immunité conférée par les cellules T CD8<sup>+</sup> de souris vaccinées par le mutant ts-4 (SUZUKI et REMINGTON, 1990a). Enfin, le rôle protecteur de l'interféron  $\gamma$  a été confirmé dans un modèle d'infection de la souris par 1200 kystes de la souche 76K par voie orale, et également dans le modèle expérimental du rat "nude" (BENEDETTO *et al.*, 1991).

Chez l'homme, l'interféron  $\gamma$  semble être également impliqué dans l'inhibition de multiplication des toxoplasmes dans les fibroblastes et ceci par la dégradation d'un acide aminé essentiel pour la croissance intracellulaire du parasite, le tryptophane (PFEFFERKORN *et al.*, 1986). Ce rôle n'a cependant pas été confirmé chez la souris (SCHWARTZMAN *et al.*, 1990).

Contrairement à l'interféron  $\gamma$ , le GMCSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) n'a pas d'effet sur l'activité des macrophages envers le parasite (COLEMAN *et al.*, 1988).

Le TNF  $\alpha$  ( Tumor necrosis factor) n'augmente pas non plus l'activité des macrophages (DE TITTO *et al.*, 1986), mais induit une protection significative chez la souris en synergie avec d'autres lymphokines, notamment l'IL1  $\alpha$  et l'IL1  $\beta$  (CHANG *et al.*, 1990).

Enfin l'IL2 pourrait intervenir en réduisant le nombre de kystes dans le cerveau et la mortalité chez des souris infectées par une dose létale de *T. gondii*. Cette réduction semble corrélée à une augmentation de l'activité des cellules NK (Natural killer) (SHARMA *et al.*, 1985). Chez le rat, l'effet protecteur de l'IL2 serait plutôt lié à l'activation des cellules LAK (lymphokine activated killer) (DANNEMANN *et al.*, 1989).

#### F.I.2.c. Rôle des cellules NK

La participation de ces cellules dans l'immunité vis-à-vis de *T. gondii* reste très controversée et mal connue. Pour certains auteurs, des cellules NK de souris infectées 3 jours auparavant par des tachyzoïtes de la souche RH se sont révélées hautement cytotoxiques pour des toxoplasmes extracellulaires, par contact direct entre la cellule et la cible parasitaire (HAUSER *et al.*, 1986). A l'opposé, les travaux de HUGHES *et al.*, (1988) ne montrent pas d'activité létale pour cette population cellulaire vis-à-vis du parasite.

#### F.I.2.d. Rôle des plaquettes

Les plaquettes de rats infectés ou immunisés par les antigènes ES, et portant un grand nombre d'IgE de surface sont capables de conférer par transfert passif une protection à des rats "nude" infectés par une dose létale de parasites (RIDEL *et al.*, 1988). D'autre part, YONG *et al.*, (1991) ont montré que des plaquettes humaines non immunes sont capables de tuer les parasites, et que le tromboxane serait impliqué dans cette cytotoxicité plaquettaire.

## **F.II. IMPORTANCE DE LA REPOSE HUMORALE DANS L'IMMUNITE**

### **F.II.1. Rôle des anticorps dans la protection**

Bien que l'infection par *T. gondii* soit accompagnée de la production d'anticorps spécifiques d'isotypes différents, on ne connaît pas la part exacte de cette réponse dans l'immunité. Dès 1966, HULDT a immunisé des lapins avec des toxoplasmes tués par la chaleur; bien que des titres élevés en anticorps aient été obtenus, ces lapins n'ont pas résisté à une réinfection par une souche virulente du parasite. Par la suite, la participation de la réponse anticorps dans la protection a surtout été étudiée par transferts passifs d'anticorps dans différents modèles expérimentaux, tels que la souris, le rat "nude", le lapin et le cobaye.

#### **F.II.1.a. Etudes par transferts passifs d'anticorps**

Chez la souris, le transfert passif d'anticorps spécifiques n'a pas permis d'obtenir une protection significative lors de l'infestation par une souche virulente de *T. gondii* (FOSTER *et al.*, 1968; GILL *et al.*, 1970), par contre une protection significative a été obtenue contre des parasites de virulence modérée (JOHNSON *et al.*, 1983b; SHARMA *et al.*, 1984).

De plus, le traitement de souris par un anticorps anti  $\mu$  qui inhibe la formation d'anticorps, entraîne une exacerbation de l'infection. Ces souris ne survivent pas malgré un traitement à la sulfadiazine, mais le transfert passif d'anticorps spécifiques permet alors une élimination des parasites chez 50% des animaux (FRENKEL et TAYLOR, 1982).

Chez le cobaye, un transfert passif de sérum immun, est capable d'induire une protection contre une infection par la souche virulente RH (PAVIA, 1986).

Enfin, chez le rat "nude", DARCY *et al.*, en 1988 ont démontré par transfert passif le rôle protecteur d'anticorps dirigés contre des antigènes excrétés-sécrétés par le parasite. Le rôle des anticorps d'isotype IgE au cours de cette protection a été souligné (RIDEL *et al.*, 1988).

### F.II.1.b. Principaux mécanismes d'action des anticorps

Les anticorps peuvent agir en détruisant les parasites avant ou après leur entrée dans la cellule-hôte et ceci par différents mécanismes: le premier, démontré par SABIN en 1948, est la lyse dépendante du complément ou "Dye-Test" dont nous avons déjà parlé. Un second mécanisme, l'opsonisation, permet la phagocytose des parasites et leur destruction au niveau des macrophages. De plus, les anticorps participent à d'autres mécanismes indirects appelés mécanismes d'ADCC (antibody-dependent-cellular-cytotoxicity) consistant à "armer" certaines cellules (macrophages, plaquettes...), qui interviennent dans la lyse de parasites. Enfin, la présence d'une forte réponse anticorps, pourrait limiter la dissémination en favorisant la formation des kystes (BRINKMAN *et al.*, 1987).

### F.II.2. Réponse anticorps et applications diagnostiques

Dès 1948, SABIN et FELDMAN, ont mis en évidence grâce au Dye-test la présence d'une réponse anticorps chez les patients infectés par *T. gondii*.

La toxoplasmose induit une réponse polyisotypique (IgM, IgG, IgA, et IgE). Chez l'homme, la détection des anticorps IgM et IgG constitue jusqu'à maintenant la base des méthodes de diagnostic classiques.

#### F.II.2.a. Détection de la réponse anticorps d'isotype IgG et IgM

Les anticorps IgM apparaissent dès le 7<sup>ème</sup> jour après l'infection. Cette réponse atteint un maximum en quelques semaines et diminue par la suite. Ces anticorps peuvent persister pendant de longues périodes chez certains individus (KONISHI, 1987).

Les anticorps d'isotype IgG apparaissent quant à eux dans les 1 à 2 mois qui suivent l'infection et atteignent un plateau vers la 6<sup>ème</sup> semaine. Puis le titre en anticorps décroît pendant plusieurs

mois et des taux résiduels persistent pendant toute la vie ( toxoplasmose chronique).

Afin d'améliorer les tests de diagnostic sérologique, la spécificité de reconnaissance de ces différents anticorps a été analysée par quelques auteurs en immunoélectrotransfert. Des sérums humains de phase aiguë et chronique contiennent des anticorps d'isotype IgG et IgM dirigés contre de nombreux antigènes de poids moléculaires apparents compris entre 115 à 6 kDa. Néanmoins, les anticorps IgG de sérums de phase aiguë reconnaissent préférentiellement un antigène de 35kDa et les anticorps IgM un antigène de 6 kDa (SHARMA *et al.*, 1983; PARTANEN *et al.*, 1983, POTASMAN *et al.*, 1986, SUZUKI *et al.*, 1988c). Enfin, une étude concernant les différents sous-classes isotypiques chez l'homme a souligné la prédominance des IgG1 dirigées contre l'antigène P30 au cours de l'infection (HUSKINSON *et al.*, 1989).

#### E.II.2.b. Détection de la réponse anticorps d'isotype IgE et IgA

Dès 1982, PINON *et al.*, démontrent par la technique des pics E.L.I.F.A. (Enzyme-linked immunofiltration-assay) que certains constituants antigéniques sont capables d'induire au cours de la toxoplasmose humaine une réponse anticorps d'isotypes G, M, A, ou E et que la présence d'anticorps IgE et IgA est autant significative d'une infection récente que la détection classique des IgM. La même année, *l'intérêt des IgE* au cours de la toxoplasmose est également évalué (BESSIERES-CATHALA, 1982). Les derniers travaux de PINON *et al.*, (1987,1990) démontrent que les anticorps d'isotype IgE, d'apparition précoce sont détectés chez 86 % des patients infectés et dans les sérums d'enfants présentant une toxoplasmose congénitale, à la naissance et au cours de la première année de la vie.

Pendant la dernière décade, de nombreux auteurs se sont intéressés à la cinétique d'évolution *des anticorps IgA*. Les IgA spécifiques sont détectées précocément dans le sérum d'infections humaine et expérimentale et disparaissent généralement en 3 à 9 mois chez l'homme (SEGUELA, 1982). Certains travaux décrivent l'apparition des anticorps IgA comme

immédiatement postérieure à celle des IgM (TURUNEN *et al.*, 1983), d'autres comme simultanée (VAN LOON *et al.*, 1983; FAVRE *et al.*, 1984; LE FICHOUX *et al.*, 1987), par contre les IgA sont toujours absentes dans le cas d'immunités anciennes. La mise en évidence d'une forte réponse IgA contre l'antigène P30 a conduit à la mise au point d'un test d'immunocapture IgA et à la confirmation de la présence de cette réponse au cours de la toxoplasmose aiguë (DECOSTER *et al.*, 1988a, 1991, 1992). Un autre test d'immunocapture I.S.A.G.A. (Immunosorbent agglutination assay) permet aussi la détection d'IgA dans le sérum et le liquide céphalorachidien (PINON *et al.*, 1986b).

Lors de la toxoplasmose congénitale, l'absence de passage transplacentaire des IgA maternelles, et la synthèse *in utero* d'IgA par le fœtus infecté permettent d'ores et déjà d'améliorer le diagnostic précoce de l'infestation de l'enfant par la détection d'IgA spécifiques. Actuellement, la détection des IgA parfois en absence d'IgM, permet d'établir un diagnostic précoce de l'infection congénitale (LE FICHOUX *et al.*, 1987; DECOSTER *et al.*, 1988a, 1991, 1992).

## **G. LES ANTICORPS D'ISOTYPE IgA DANS L'IMMUNITÉ**

Il y a aujourd'hui presque 30 ans que le concept d'un système immunitaire muqueux fut développé (CHODIRKER et TOMASI, 1963). Ce concept était basé sur des études concernant le contenu des différents liquides biologiques, avec l'observation frappante que l'IgA représentait l'isotype majeur au niveau des sécrétions baignant les muqueuses. De plus, les IgA sériques étaient différentes des IgA sécrétoires et contenaient un constituant supplémentaire, la pièce sécrétoire, impliqué dans le transport de ces IgA particulières (TOMASI *et al.*, 1965). Depuis, on a démontré que chez certaines espèces, les compartiments systémiques et sécrétoires sont très nettement indépendants:

*Chez l'homme*, la majorité des IgA du sérum est produite en premier lieu dans la moëlle osseuse

et n'intervient pas de façon significative dans les sécrétions externes (KUTTEH *et al.*, 1982), tandis que les IgA trouvées dans la plupart des sécrétions sont produites par des plasmocytes distribués dans les tissus sécrétoires et ne contribueraient pas ou peu au pool circulatoire.

*Chez d'autres espèces*, notamment le rat et la souris, le métabolisme est quelque peu différent et la présence d'IgA au niveau de certaines sécrétions serait le résultat d'un transport d'immunoglobulines provenant du sérum (HALSEY *et al.*, 1980; FISCHER *et al.*, 1979; DELACROIX *et al.*, 1985).

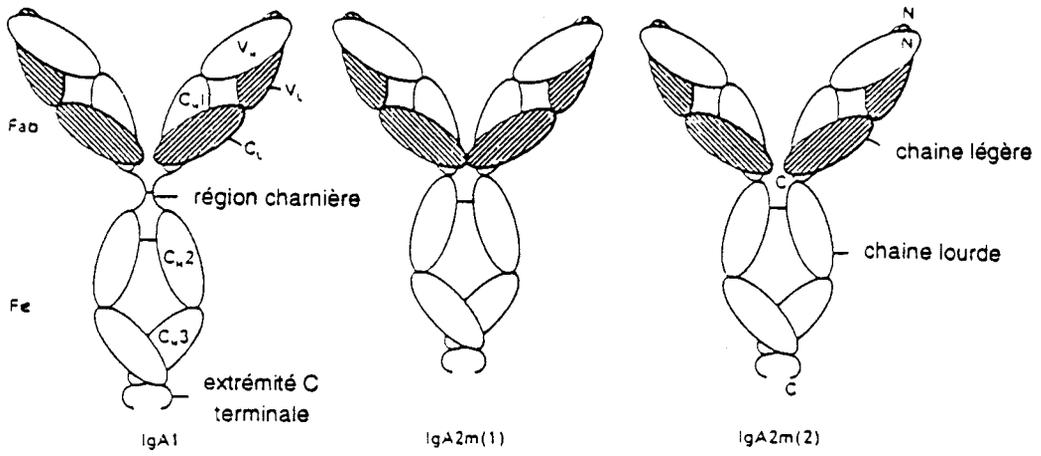
## **G.I. STRUCTURE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DES IgA**

Il existe donc deux types principaux d'IgA: les IgA sériques et les IgA sécrétoires (Figure 12).

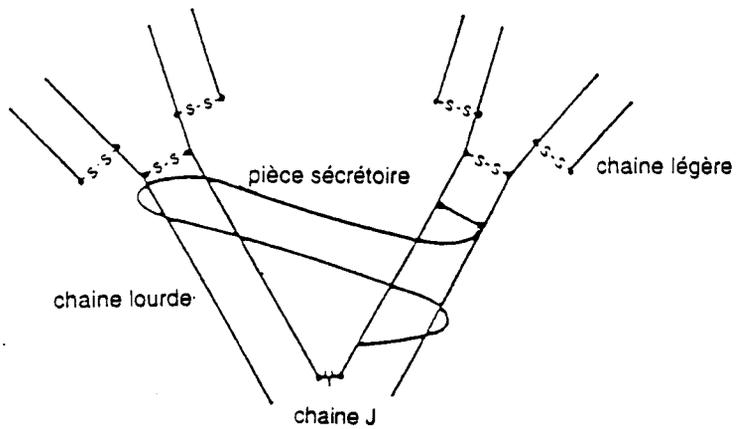
### **G.I.1. Les IgA sériques**

Les IgA sériques sont constituées d'un assemblage de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ). Chez l'homme, il existe deux sous-classes d'IgA, les IgA<sub>1</sub> et les IgA<sub>2</sub> (Revue par MESTECKY et RUSSEL, 1986 ; MESTECKY et McGHEE, 1987; KERR, 1990) qui se différencient au niveau de la région charnière ("Hinge region") de la chaîne lourde par la présence d'une délétion de 22 acides aminés sur 365 dans le cas de l'IgA<sub>2</sub> et par leur composition en glycanes. L'IgA<sub>2</sub> possède deux allotypes IgA<sub>2</sub> (1) et IgA<sub>2</sub> (2) différents par la position des ponts disulfure.

L'IgA<sub>1</sub> prédomine largement dans le sérum et les muqueuses, bien que les taux d'IgA<sub>2</sub> soient nettement augmentés à ce niveau. La concentration sérique de l'IgA est d'environ 3g/l pour 12g/l d'IgG, mais comme les IgA sont catabolisées 5 fois plus vite, les taux de synthèse semblent donc équivalents. Chez d'autres espèces, notamment le rat et la souris, les taux d'IgA sériques sont beaucoup plus faibles et les IgA prédominent sous forme polymérique.



A. Comparaison des différentes immunoglobulines humaines  
(D'après KERR, 1990)



B. Structure de l'IgA sécrétoire  
(D'après TOMASI, 1989)

**FIGURE 12**  
**STRUCTURE DES IgA**

### G.I.2. Les IgA sécrétoires

Les sécrétions externes contiennent des formes dimériques et tétramériques associées à un polypeptide J et à un composant sécrétoire. La molécule d'IgA sécrétoire est le produit de deux cellules différentes: les plasmocytes qui produisent l'IgA avec la chaîne J et les cellules épithéliales qui produisent la pièce sécrétoire.

Le polypeptide J est également associé aux IgM polymériques. Sa production s'effectue dans des cellules B immatures, mais la synthèse est nettement augmentée dans les cellules B matures après contact antigénique. Son assemblage avec les IgA et les IgM survient tardivement, probablement juste avant la sécrétion. La chaîne J se lie à l'avant-dernière cystéine de l'extrémité C terminale. Cette fixation permettrait à la molécule d'adopter une conformation qui faciliterait la bonne interaction avec la pièce sécrétoire (TOMASI, 1989).

Le récepteur pour les IgA polymériques est une protéine membranaire située à la surface des cellules épithéliales. Son clivage libère la partie ectoplasmique qui entre dans la composition des IgA et IgM sécrétoires et est également retrouvée comme glycoprotéine libre présente dans les sécrétions externes.

Les caractéristiques et les propriétés des IgA sont succinctement présentées dans le Tableau 1. Les IgA ne traversent pas le placenta, fixent le complément par la voie alterne et possèdent une demi-vie assez courte. Les IgA possèdent néanmoins d'autres propriétés importantes telles que l'absence de fixation sur la protéine A de *Staphylococcus aureus* et la fixation sur les cellules possédant un récepteur  $Fc\alpha$ . Les IgA humaines peuvent notamment se fixer sur les neutrophiles, les lymphocytes B et T (Revue par MESTECKY et MCGHEE, 1987) et les éosinophiles (CAPRON *et al.*, 1988).

IgA	Sécrétoires	Sériques
Forme	Polymère	Monomère
Sédimentation	11S	7S
Poids moléculaire	390000	165000
Pièce sécrétoire	+	-
Chaîne J	+	-
IgA1 IgA2	50-75% 25-50%	80-90% 10-20%

#### A. PROPRIETES DES IgA HUMAINES

	Poids moléculaire en kDa	concentration sérique mg/ml	fixation du complément	transfert placentaire	1/2 vie (jours)
Rat	160-320	0,03-0,05	+ Voie alterne	-	1,1
Souris	160-400	0,4-1,3	+ Voie alterne	-	1,3
Homme IgA1 IgA2	165 -390	2-3 0,3-0,5	+ Voie alterne	- -	5 à 6

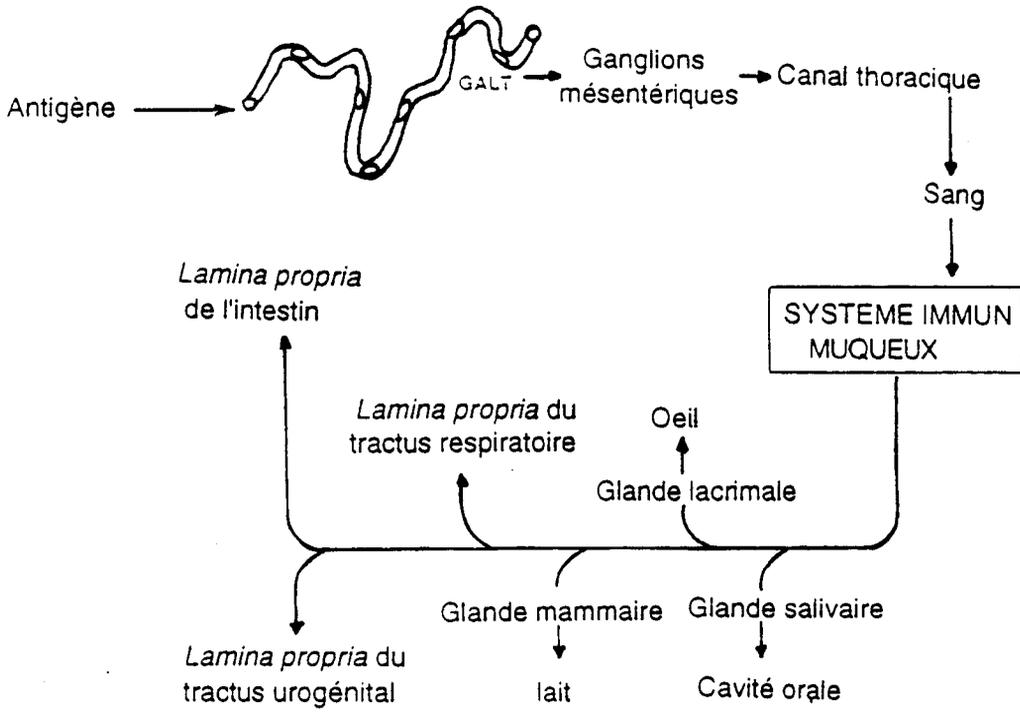
#### B. COMPARAISON ENTRE IgA DE DIFFERENTES ESPECES

**TABLEAU 1**  
**PROPRIETES ET DISTRIBUTION DES IgA**

## G.II. LE SYSTEME IMMUN MUQUEUX

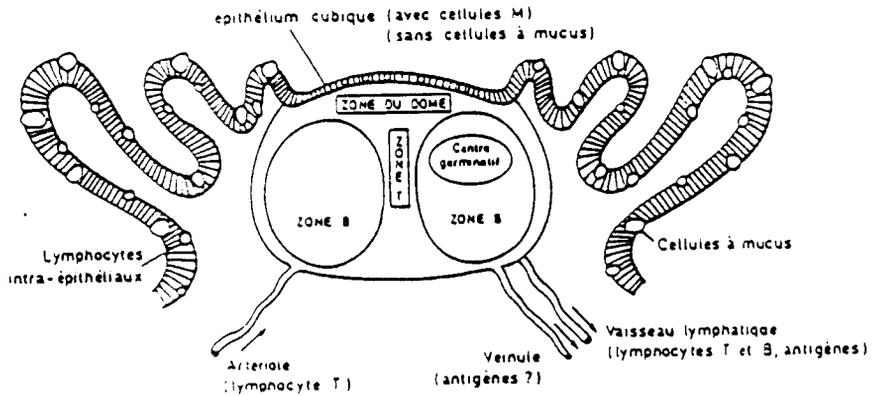
Chez les mammifères, les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT: gut-associated lymphoid tissues) et les tissus lymphoïdes associés au système respiratoire (BALT: bronchus-associated lymphoid tissues) sont des sites majeurs inducteurs d'IgA conduisant à la production d'IgA dans les sécrétions externes. Ce système a été appelé système immunitaire muqueux (Figure 13A). Il peut être subdivisé en sites inducteurs d'IgA et en sites effecteurs où il y a synthèse d'IgA. Les antigènes inhalés ou ingérés sont captés par ces tissus spécialisés (BALT et GALT). La stimulation de précurseurs B au niveau du GALT lors de l'ingestion de l'antigène conduit à la dissémination de cellules B et T vers les sites effecteurs tels que la *lamina propria*, et de nombreuses glandes sécrétoires. Les sites inducteurs d'IgA sont classiquement représentés au niveau du GALT par les plaques de Peyer, l'appendice, et de petits nodules lymphoïdes (Revue par McGHEE *et al.*, 1992).

La plaque de Peyer contient une région, appelée dome, enrichie en lymphocytes et macrophages. Ce dome est couvert par un épithélium renfermant de nombreuses cellules M ("microfolded") spécialisées dans la capture de l'antigène. L'antigène est ensuite présenté au tissu lymphoïde sous-jacent contenant une zone B riche en lymphocytes B possédant des IgA de surface, et une zone T renfermant majoritairement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (environ 65% des lymphocytes T) favorisant l'élaboration de réponses IgA (Figure 13B). On y trouve également des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (environ 25% des cellules T) précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques, et également des macrophages et des cellules dendritiques. Après stimulation, les cellules B et T quittent les plaques de Peyer par les canaux lymphatiques et atteignent la circulation par le canal thoracique. Puis ces lymphocytes vont peupler les sites effecteurs, notamment la *lamina propria*. Au niveau des sites effecteurs, les cellules majoritaires sont également les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (environ 50% des cellules T), les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (environ 30% des cellules T), les lymphocytes B stimulés par l'antigène et différenciés en plasmocytes producteurs d'IgA (environ 90% des plasmocytes).



INDUCTION D'UNE REPOSE SPECIFIQUE DE L'ANTIGENE PAR LE SYSTEME IMMUN MUQUEUX (D'après MCGHEE, 1992)

B



LA PLAQUE DE PEYER (D'après BAZIN, 1990)

FIGURE 13  
LE SYSTEME IMMUNITAIRE MUQUEUX

### G.III. REGULATION DE LA REPONSE IgA PAR LES LYMPHOCYTES T

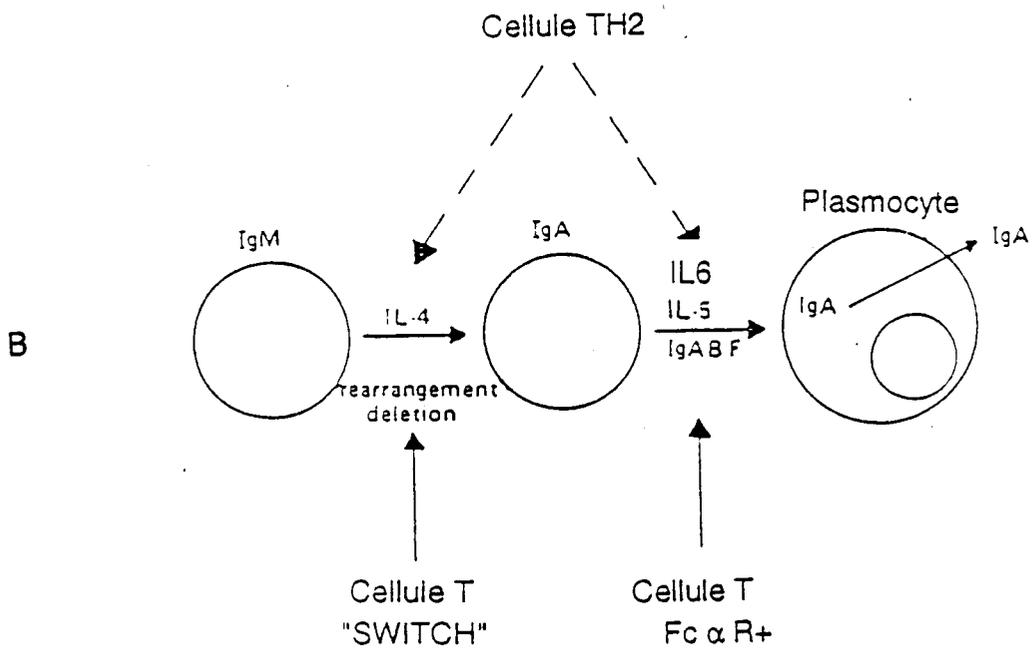
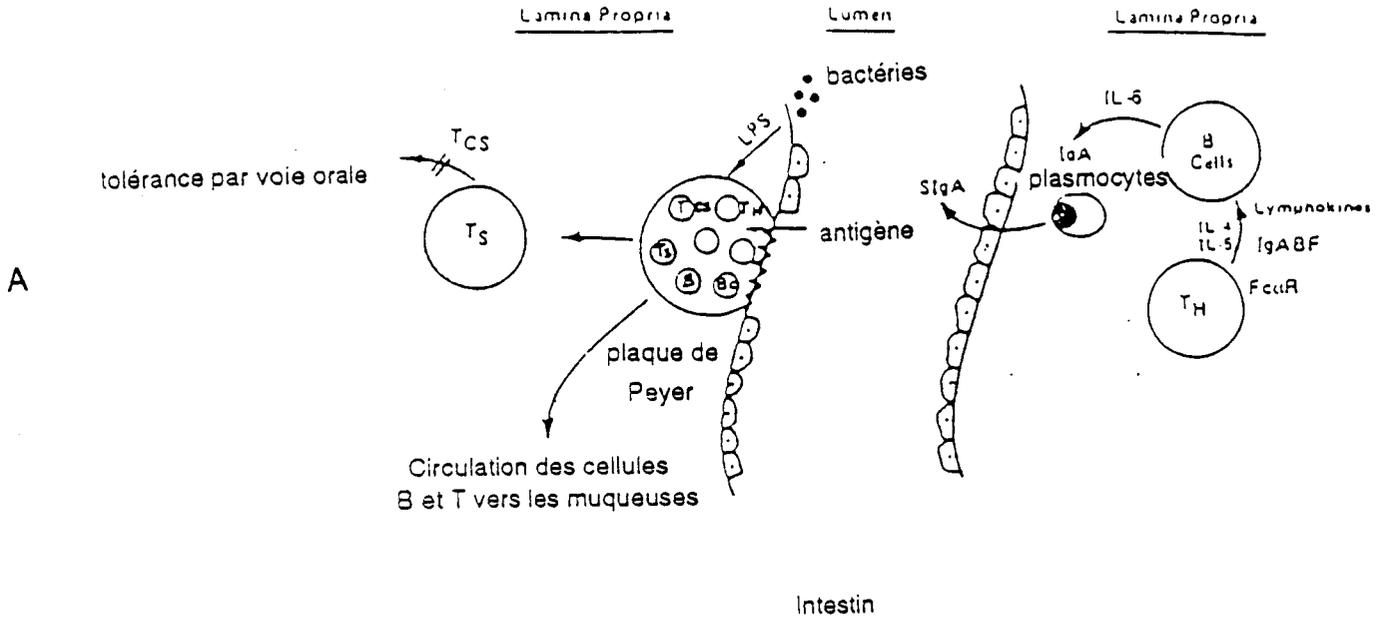
La dépendance lymphocytaire T de la réponse IgA a été suggérée pour la première fois par le fait que des souris athymiques ne présentaient que de faibles taux d'IgA (LUZZATI et JACOBSON, 1972). Puis ELSON *et al.*, en 1979, ont montré que la réponse IgA était régulée par des lymphocytes T présents en grande quantité au niveau des plaques de Peyer. Des lymphocytes T suppresseurs existant à ce niveau peuvent migrer vers les tissus périphériques où ils provoquent une absence de réponse: c'est la tolérance par voie orale. Cet effet peut être supprimé par l'intervention de cellules contrasuppressives permettant au contraire d'augmenter la réponse immune (Figure 14A).

Les cellules T "helper" de plaques de Peyer stimulées par la concanavaline A suppriment les réponses IgG et IgM, mais favorisent la production d'IgA par des cellules B activées d'origine splénique ou de plaques de Peyer. Par contre des cellules T "helper" de la rate activées par le même mitogène, suppriment au contraire les réponses IgA.

Deux types de cellules T semblent ainsi réguler la réponse IgA à différents niveaux dans la plaque de Peyer (Figure 14B):

- *des cellules T de commutation ('switch')*, qui permettent l'induction préférentielle de cellules B portant des IgA membranaires, mais n'induisent pas la différenciation terminale des cellules B IgA<sup>+</sup> en plasmocytes (KAWANISHI *et al.*, 1983). Ces cellules pourraient agir par le biais du TGF  $\beta$  (Tumor Growth factor) qui serait capable d'induire cette transition (SONODA *et al.*, 1989).

- *d'autres cellules T CD4<sup>+</sup>* exprimant des récepteurs Fc  $\alpha$  seraient impliquées dans l'induction spécifique de la réponse IgA. Les récepteurs Fc  $\alpha$  ont été mis en évidence sur des cellules T humaines et murines et peuvent être libérés sous forme soluble ou IBF (immunoglobulin binding factor). Le mécanisme d'action de ces facteurs solubles est encore mal connu.



**FIGURE 14**  
**REGULATION DE LA REPONSE ANTICORPS IgA**  
**PAR LES LYMPHOCYTES T**  
 (D'après TOMASI, 1989)

Ces IBF  $\alpha$  pourraient exercer deux effets antagonistes selon leur concentration, une forte concentration supprimant la réponse IgA et une faible concentration permettant au contraire, une augmentation de cette réponse (KIYONO *et al.*, 1985).

*Chez la souris*, les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être différenciées en TH1 et TH2 ( T helper 1 et 2) selon les cytokines qu'elles sécrètent (MOSMANN *et al.*, 1989). Ces deux types de lymphocytes T sont présents dans les sites inducteurs et effecteurs d'IgA. Cependant, les sites effecteurs contiennent davantage de cellules TH2 produisant les lymphokines IL4, IL5, IL6, et IL10, que de cellules TH1 sécrétant de l'IL2, de l'IFN  $\gamma$  et du TNF  $\beta$ . Dans les sites inducteurs d'IgA par contre, on note une égale distribution des populations TH1 et TH2 (TAGUCHI *et al.*, 1990). L'IL5 et IL6 agissent en induisant la synthèse d'IgA (McGHEE *et al.*, 1989; BEAGLEY, *et al.*, 1988, 1989). L'IL5 agit sur des cellules déjà engagées vers la production d'IgA et provoque donc la différenciation terminale de ces cellules (HARRIMAN *et al.*, 1988; SCHOENBECK *et al.*, 1989). L'IL6 induit également la différenciation terminale des cellules B et apparaît à ce niveau deux à trois fois plus efficace que l'IL5 (BEAGLEY *et al.*, 1989).

*Chez le singe rhésus*, il semble peu probable que les cellules T des sites effecteurs et inducteurs d'IgA représentent une population homogène de cellules analogues aux TH1 et TH2 murins. La capacité de ces cellules à produire et à utiliser les différentes lymphokines semble être davantage le résultat d'un état d'activation et de différenciation particuliers (JAMES *et al.*, 1990).

*Enfin, chez l'homme*, on a pu montrer dans un modèle *in vitro*, permettant une différenciation des cellules B en absence de cellules T, que la commutation isotypique (switch) des cellules B portant des IgD de membrane vers des cellules engagées dans la production d'IgA survient après coculture en présence de TGF  $\beta$  et d'un anti-CD40 (marqueur présent sur les lymphocytes B). Le signal nécessaire pour la croissance et la différenciation de ces cellules B serait par contre l'IL10 (DEFRANCE *et al.*, 1992).

## **G.IV. FONCTIONS CONNUES DES IgA**

Le rôle des IgA sériques est encore inconnu bien que ce type d'anticorps soit retrouvé au cours de nombreuses infections. Le rôle des IgA sécrétoires a fait par contre l'objet de nombreux travaux. Dans les sécrétions, les IgA sont prédominantes sous forme dimérique et tétramérique et agissent dans un environnement riche en enzymes protéolytiques (MAGNUSSON *et al.*, 1982). Ceci leur confère des avantages non négligeables par rapport aux autres immunoglobulines présentes au niveau des muqueuses. La formation de complexes entre l'antigène et l'IgA sécrétoire limite la pénétration de cet antigène au niveau des muqueuses. D'autre part, la faible capacité d'activation du complément par ce type d'immunoglobulines, permet de limiter la création de réactions inflammatoires locales. Enfin, les IgA peuvent également supprimer certaines réactions anaphylactiques créées par les anticorps d'isotype IgE et IgG (RUSSEL-JONES *et al.*, 1980, 1981).

### **G.IV.1. Neutralisation de virus**

L'importance de ce mécanisme a été souligné dans la prévention de l'infection (Revue par OGRA *et al.*, 1989). Les IgA sécrétoires sont particulièrement efficaces dans la neutralisation des virus. Ceci a été montré à l'aide d'études réalisées sur le virus Influenza A. En effet, au cours de cette étude, les IgA sécrétoires se sont révélées plus efficaces que les IgA monomères ou les IgG, en empêchant la pénétration de virus dans les cellules (TAYLOR *et al.*, 1985).

### **G.IV.2. Fonctions antibactériennes**

Des IgA sécrétoires spécifiques sont produites au cours de nombreuses infections bactériennes. Leur rôle possible dans l'inhibition de l'adhérence des bactéries aux cellules

épithéliales muqueuses (WILLIAMS et GIBBONS, 1972 ; FUBARA et FRETER, 1973) et dans l'opsonisation de bactéries (BOHNSACK *et al.*, 1989) est connu. Les IgA peuvent de plus limiter la croissance des bactéries en agissant en synergie avec la lactotransferrine. Néanmoins, elles peuvent empêcher l'adhérence d'entérobactéries aux cellules épithéliales par des mécanismes indépendants de leur activité spécifique d'anticorps et impliquant des interactions de type lectine (WOLD *et al.*, 1990).

D'autre part les IgA peuvent se fixer sur un grand nombre de cellules possédant un récepteur Fc $\alpha$ . L'activité antibactérienne de monocytes et de lymphocytes des muqueuses et des organes lymphoïdes ainsi armés grâce à la fixation de l'IgA sécrétoire peut être augmentée dans des mécanismes de cytotoxicité anticorps-dépendants (ADCC) (TAGLIABUE, 1984).

Un effet neutralisant des IgA sécrétoires vis à vis d'enzymes et de toxines bactériennes a également été prouvé (FUKUI *et al.*, 1973). Enfin, il a été démontré que des IgA salivaires spécifiques dirigées contre *Streptococcus mutans* sont responsables de la réduction du nombre de caries observées dans certains modèles expérimentaux (EVANS *et al.*, 1975).

### **G.IV.3. Fonctions antiparasitaires**

Bien que de nombreux auteurs aient décrit l'induction d'une réponse anticorps IgA intestinale, tant dans les helminthiases (*Trichinella spiralis*, ALMOND *et al.*, 1986; *Nippostrongylus brasiliensis*, WEDRYCHOWICZ *et al.*, 1984, par exemple) que dans les protozooses (*Giardia muris*, HEYWORTH, 1989; *Toxoplasma gondii*, McLEOD *et al.*, 1986, par exemple), la fonction précise de ce type d'anticorps sériques et sécrétoires dans ces maladies reste encore mal définie, voire inconnue.

**EN CONCLUSION**, toutes ces données soulignent l'intérêt de l'étude précise de la réponse anticorps IgA (induction et cibles antigéniques) et des différents mécanismes effecteurs induits au cours de la toxoplasmose.

**MATERIEL ET METHODES**

## **I. SOUCHES DE *T. GONDII***

### **I.1. La Souche RH**

Cette souche pathogène a été isolée en 1939, aux Etats-Unis d'un enfant mort d'encéphalite toxoplasmique (SABIN, 1941). Elle est entretenue depuis lors par inoculation par voie intrapéritonéale chez des souris.

A l'Institut Pasteur de Lille, cette souche est entretenue par passages successifs sur souris OF1. Les tachyzoïtes sont récupérés par lavage intrapéritonéal dans du milieu RPMI 1640 (Gibco, Pleasanton, CA., USA). La suspension de tachyzoïtes est ensuite filtrée sur membrane de polycarbonate de porosité 3µm Nuclepore (Nuclepore Corp., Pleasanton, USA) afin d'éliminer les contaminants cellulaires murins. Les tachyzoïtes ainsi récoltés servent également à l'ensemencement de cultures de cellules humaines Hep-2 (carcinome de larynx). Une culture massive de tachyzoïtes peut ainsi être obtenue en 4 à 6 jours.

### **I.2. La Souche 76K**

Cette souche a été isolée du cerveau d'un cobaye mort après son arrivée au laboratoire de parasitologie de Marseille (LAUGIER et QUILICI, 1970). Des souris infectées par le broyat de ce cerveau ont survécu et ont présenté de nombreux kystes.

Les cerveaux des souris infectées sont homogénéisés dans un tube de Potter d'environ 20ml (Thoma, Penn., USA). Les kystes sont ensuite comptés au microscope puis l'entretien de cette souche est assuré par inoculation intrapéritonéale de 25 kystes tous les deux mois à des souris OF1.

## **II. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES DE *T. GONDII***

### **II.1. Préparation de l'extrait antigénique soluble: fraction S2**

Les tachyzoïtes sont récupérés et filtrés sur papier Whatman, puis lavés 2 fois en tampon

PBS 0,01M, pH 7,4 centrifugés à 1000g pendant 15 minutes. Le culot parasite est remis en suspension dans de l'eau distillée à une concentration finale de  $6 \times 10^8$  tachyzoïtes par ml en présence de 1% de PMSF (fluorure de phényl méthyl sulfonyle, Sigma, Dorset, Grande-Bretagne). Cette suspension est soumise à un traitement aux ultrasons de 4 fois 1 minute, suivi d'une congélation à  $-20^{\circ}\text{C}$  et d'un passage sur une X-Press (LKB, Uppsala, Suède). La suspension finale est centrifugée 2 heures à 36000g. Le surnageant recueilli est utilisé comme source d'antigènes toxoplasmiques solubles après addition 100 U/ml d'aprotinine (Sigma, Dorset, Grande-Bretagne). Cette fraction est dénommée S<sub>2</sub>.

### **II.2. Préparation de l'extrait antigénique membranaire: fraction "chaps"**

Le culot contenant les antigènes membranaires est traité par addition d'un détergent, le 3-((3-cholamidopropyl)-diméthylammonio)-propanesulfonate, ou CHAPS (Fluka, Buchs, Suisse) 9,7mM en tampon PBS 0,01M pH 7,2. Ce traitement s'effectue dans un volume de 5ml d'une solution contenant également des inhibiteurs de protéases, PMSF 0,04mM, EDTA 0,25mM (acide éthylène diamine tétraacétique, Prolabo, Paris, France), TLCK 0,2mM (N- $\alpha$ -p-tosyl-L-lysine chlorométhyl cétone), (Sigma, Dorset, Grande-Bretagne), et TPCK 0,2mM (N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl cétone), (Sigma, Dorset, Grande-Bretagne). Ce mélange est mis en agitation sur une roue inclinée pendant une nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ . Après une centrifugation à 12000g pendant 30 minutes, le surnageant contenant les antigènes membranaires solubilisés est récupéré, filtré sur membrane Millipore de  $0,22\mu\text{m}$  (Millipore corp, Bedford, MA., USA) et conservé à  $-70^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation.

### **II.3. Préparation de l'extrait total de tachyzoïtes**

La fraction soluble S<sub>2</sub> et la fraction d'antigènes membranaires sont dosées en protéines par la méthode de PETERSON (PETERSON *et al.*, 1977) puis mélangées en quantités de protéines égales. Ce mélange constitue l'extrait total de tachyzoïtes.

#### **II.4. Préparation des antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes (antigènes ES)**

Des tachyzoïtes de la souche RH ( $1,5 \times 10^8$ ) préalablement filtrés, sont incubés pendant 3 heures sur une roue inclinée en milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté pendant 30 minutes à 56°C (Boehringer, Mannheim, Allemagne). Après 3 heures d'incubation, les tubes sont centrifugés à 1000g pendant 15 minutes, les surnageants sont filtrés sur membrane Millipore 0,22µm (Millipore Corp, Bedford, MA., USA) puis additionnés de 1000 U/ml d'aprotinine avant leur congélation à -70°C. La viabilité des parasites est vérifiée avant et après incubation par un test de coloration des parasites morts à l'érythrosine B, selon la méthode décrite par JAFFE *et al.*, en 1984. Brièvement, 0,05ml de suspension de tachyzoïtes et 0,05ml d'érythrosine B sont mélangés et incubés dans de la glace pendant exactement 5 minutes. Une goutte de la suspension est alors observée au microscope (X400). Dans ces conditions, la viabilité des parasites doit être égale ou supérieure à 80% à la fin de l'incubation.

#### **II.5. Préparation d'un extrait d'antigènes libérés par les tachyzoïtes en absence de calcium**

Cet extrait est préparé selon la méthode décrite par SIBLEY *et al.*, en 1986. Les tachyzoïtes récupérés dans les lavages péritonéaux de 150 souris infectées 3 jours auparavant par la souche RH sont récupérés en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans une solution de lavage Hanks/ $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$  1mM, Héparine 10U/ml, HEPES 10mM) dans la glace. Les parasites sont lavés 3 fois puis incubés pendant 30 minutes à 4°C dans 100 ml de tampon de dissociation sans  $\text{Ca}^{2+}$  et sans  $\text{Mg}^{2+}$  (PBS 0,01M pH 7,2, Héparine 10U/ml, EDTA 0,1mM, DTT 0,1mM, PMSF 1µg/ml, TLCK 10µg/ml). Après centrifugation des parasites à 1000g, le surnageant est récupéré et centrifugé 5 fois à 1000g pendant 10 minutes pour le clarifier. Le dernier surnageant est fractionné par centrifugation à 10000g pendant 1 heure puis à 100000g pendant 2 heures et contient alors les protéines solubles

qui sont concentrées sur membrane Centricon 10 (Amicon, Danvers, MA, USA).

Cette préparation contient notamment les antigènes sécrétés de 28,5 et 27 kDa.

### **III. ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE DES PROTEINES DU TOXOPLASME**

#### **III.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodécyl sulfate)**

La séparation des différentes protéines est effectuée selon la méthode de LAEMMLI (1970). Les échantillons sont préalablement chauffés à 100°C (2 fois 1 minute) en tampon échantillon (Tris HCl 62,5mM pH 6,8, 10% de saccharose, 0,1% de bleu de bromophénol avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol. Ces échantillons sont déposés sur un gel de concentration à 5% d'acrylamide, puis séparés dans un gel résolutif à 10 ou 13% d'acrylamide préparée en tampon Tris HCl 0,75M pH 8,8. Des marqueurs de poids moléculaire précolorés (BRL, Gaithersburg, MD, USA) permettent le suivi de la migration. Celle-ci s'effectue en 16 à 18 heures à raison de 7mA par gel dans du tampon Tris à 0,025M (Merck, Darmstadt, Allemagne), Glycine 0,19M (Merck, Allemagne), SDS 2% (Sigma, St Louis, MO, USA) à pH 8,3.

#### **III.2. Immunoélectrotransfert**

Le gel d'électrophorèse est démoulé et les protéines sont transférées sur de la nitrocellulose (Schleicher et Schuell Inc, Keene, NH., USA) selon la méthode décrite par TOWBIN *et al.*, en 1979. Le transfert s'effectue en tampon Tris 0,02M, glycine 0,15M, méthanol 20%, pendant 3 heures à 60V ou 1 nuit à 10V. La nitrocellulose est ensuite saturée 1 heure en tampon PBS 0,01M, NaCl 0,15M, contenant 1% de BSA ou 3% de lait écrémé. Les différents sérums sont alors analysés et dilués au 1/50 pour le rat et la souris et au 1/100 pour l'homme. Ces sérums sont incubés une nuit à 4°C, ou 2 heures à

température ambiante. Après 2 lavages en PBS 0,01M pH 7,2 suivi de 2 lavages en PBS Tween 20 0,1%, les bandes de nitrocellulose sont incubées avec le second anticorps approprié (Tableau 2) dilué en PBS 0,01M, lait 3% pendant 2 heures à 1 nuit. Enfin, après de nouveaux lavages, la révélation des bandes s'effectue par addition d'une solution contenant le substrat de la peroxydase (30mg de 4 chloro-1-naphtol dans 10ml de méthanol froid, 40ml de PBS et 0,05ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30%. La réaction est arrêtée au bout de 30 minutes par addition d'eau distillée.

#### **IV. ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS IgA DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX**

##### **IV.1. Protocoles d'infection et d'immunisation des animaux**

\* *Des lots de 10 souris OF1 mâles*, de 2 mois et demi, ont été infectées par voie orale à l'aide d'une sonde de gavage (Carrieri Instruments, Paris, France), par 100 kystes de la souche 76K dans du PBS 0,01M ou par 100 kystes de la même souche par voie intrapéritonéale. Les groupes témoins du même âge sont constitués par des animaux non infectés. Le suivi de la cinétique est réalisé 2 fois par semaine jusqu'à J21 puis une fois par semaine par la suite.

\* *Des lots de 5 rats Fischer mâles* de 2 mois et demi ont été infectés par voie orale, par 1200 kystes de la souche 76K dans du PBS 0,01M avec une sonde de gavage (Carrieri Instruments, Paris, France) ou par 1200 kystes de la même souche par voie intrapéritonéale. Le suivi cinétique a été réalisé de J0 à J300 après l'infection initiale. Les témoins sont constitués par des rats ayant reçu l'équivalent en broyat de cerveau de souris non infectée.

Spécificité anticorps	espèce	origine	dilution
<b>Anti-IgA de rat</b> ( $\alpha$ -chaîne spécifique)	Mab souris	Don du Dr Bazin (Brussels, Belgium)	1/1000
<b>Anti-IgG de rat</b> ( $\gamma$ -chaîne spécifique): marqué peroxydase. Anticorps purifié	chèvre (MD, USA)	Kpl Gaithersburg	1/500
<b>Anti-IgE de rat</b> ( $\epsilon$ -chaîne spécifique)	Mab souris	Biosys. Compiègne, Fr.	1/1000
<b>Anti-IgM de rat</b> ( $\mu$ -chaîne spécifique) marqué peroxydase	Mab souris	Biosys	1/1000
<b>Anti-IgA de souris</b> ( $\alpha$ -chaîne spécifique) marqué peroxydase. Anticorps purifié	chèvre	Kpl Gaithersburg	1/500
<b>Anti-IgE de souris</b> ( $\epsilon$ -chaîne spécifique)	Mab rat	Biosys	1/500
<b>Anti-IgG(H+L) de souris:</b> marqué peroxydase. Anticorps purifié	mouton	Diagnostics Pasteur (Marnes la Coquette, Fr)	1/500
<b>Anti-IgG(H+L) de chèvre:</b> marqué peroxydase. Anticorps purifié	âne	ICN Immunobiologicals (Lisle, Israel)	1/500
<b>Anti-IgG(H+L) de lapin:</b> marqué peroxydase. Anticorps purifié	chèvre	Diagnostics Pasteur	1/500

TABLEAU 2

## LISTE DES DIFFERENTS REACTIFS UTILISES

#### **IV.2. Protocoles d'immunisation par les antigènes excrétés-sécrétés**

Des lots de 5 rats Fischer mâles, de 2 mois et demi, ont été immunisés dans les mêmes conditions par les mêmes antigènes, chaque injection correspondant cette fois à l'excrétion d'environ  $8 \times 10^7$  à  $1 \times 10^8$  tachyzoïtes pendant 3 heures.

Dans les 2 cas les témoins sont constitués par des rats ou des souris n'ayant reçu que l'adjuvant.

#### **IV.3. Analyse par Immuno-empreinte ("Dot-Blot")**

Cette technique a été utilisée selon VELGE-ROUSSEL *et al.*, (1989) avec quelques modifications mineures. Des quantités données d'antigène ( $3 \mu\text{g}$  et  $6 \mu\text{g}$  pour l'analyse de sérums de rat et de souris respectivement), sont déposées sur des bandelettes de nitrocellulose. Les bandelettes sont ensuite saturées dans une solution de caséine à 0,1% dans du PBS 0,3M, puis incubées avec les différents sérums dilués au 1/50. La réalisation des différentes incubations comme la révélation des différentes bandes sont identiques à la technique décrite pour l'électroimmunotransfert.

### **V. REPOSE IgA HUMAINE: ANALYSE DE SERUMS HUMAINS**

#### **V.1. Les sérums humains**

Les sérums humains proviennent du laboratoire de l'hôpital Saint-Antoine à Lille et ont été aimablement fournis par le Docteur Anne Decoster. Ils ont été préalablement analysés selon les méthodes classiques de diagnostic détectant les IgG et les IgM: test d'hémagglutination indirecte avec ou sans  $\beta$ -mercaptoéthanol et immunofluorescence indirecte.

### V.2. Marquage d'anticorps par l'iode $^{125}\text{I}$

Cette méthode a été décrite par HUNTER et GRINWOOD en 1962.

La réaction s'effectue sous hotte fermée avec les précautions d'usage pour la manipulation des radioéléments. Vingt microgrammes d'un anti-IgA humain, sont incubés avec 3,7 MBq soit 0,1mCi d'iode  $^{125}\text{I}$ . L'oxydation se fait par l'addition goutte à goutte de 0,05ml de chloramine T (solution à 1mg par ml en tampon phosphate 0,5M pH 7,2) sous agitation lente. La réaction est arrêtée au bout de 1 minute exactement par l'addition de 0,05ml de métabisulfite de sodium (solution à 2mg par ml en tampon phosphate 0,5M pH 7,2), en une seule fois. La protéine marquée est séparée de l'iode libre par élution sur une colonne de Séphadex G25 (PD10, Pharmacia, Uppsala, Suède) équilibrée au préalable par une solution de PBS 0,01M en tampon phosphate pH 7,2 et comportant 0,3% de BSA (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

### V.3. Technique radioimmunologique

Un extrait antigénique total de *T.gondii* est adsorbé sur des plaques de polystyrène souple (Falcon 3911, Beckton Dickinson, CA, USA) à raison de 1 $\mu\text{g}$  par puits, une nuit à température ambiante. Les plaques sont ensuite saturées par une solution de PBS 0,01M pH 7,2-1%BSA, 1 heure à température ambiante. Après deux lavages en PBS-Tween 0,1%, les sérums dilués au 1/50 sont ajoutés 2 heures à température ambiante. Après 2 nouveaux lavages en PBS-Tween 20 0,1%, l'anti-IgA humain (MIAB) marqué à l'iode  $^{125}\text{I}$  est ajouté à raison de 100000 cpm ( $1 \times 10^6$  cpm = 1 $\mu\text{Ci}$ , rendement 50%) par puits pendant 1 heure 30 minutes. Enfin, après 5 à 6 nouveaux lavages, les cupules sont comptées individuellement au compteur  $\gamma$  (Type LKB-Wallac, Clinigamma1272, Finlande).

## VI. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX IgA SPECIFIQUES DE *T. GONDII*

### VI.1. Protocoles d'infection et d'immunisation

#### VI.1.a. Protocoles d'infection

\* Dix souris *BALB/c* de 2 mois et demi ont été infectées par 300 kystes de la souche 76K par voie orale. La rate et les ganglions ont été prélevés stérilement au 18ème jour de l'infection (hybridations cellulaires TG23 et TG24) et au 32ème jour de l'infection (hybridations cellulaires TG25 et TG26).

\* Dix souris *BALB/c* de 2 mois et demi ont été infectées par 75 kystes de la souche 76K par voie orale à J0, puis J7 en association avec 10µg puis 5µg de toxine cholérique (Sigma) par souris. Les plaques de Peyer de tous les animaux ont été prélevées au 18ème jour après l'infection. Ce protocole correspond à l'hybridation cellulaire TG31.

#### VI.1.b. Protocoles d'immunisation

Deux types de protocoles qui utilisent soit la toxine cholérique, soit le muradipeptide (MDP, gracieusement obtenu du laboratoire Vacsyn-France), ont été élaborés:

##### *\* Immunisation en présence de toxine cholérique:*

Dix souris *BALB/c* de 2 mois et demi ont été immunisées par voie orale aux jours J0, J7 et J14 soit par l'extrait antigénique total de *T. gondii* à raison de 100 µg par souris, soit par 0,2ml d'antigènes ES (correspondant à l'excrétion de  $1 \times 10^8$  parasites pendant 3 heures) concentrés 5 fois sur membrane Amicon 15000 (Amicon, Danvers, MA, USA). Ces deux types d'antigènes ont été associés à la toxine cholérique utilisée à raison de 10µg pour la première injection et de deux fois 5µg pour les suivantes. Dans les deux cas, toutes les plaques de Peyer des animaux ont été prélevées à J18 après le début de

l'immunisation. Ces deux protocoles correspondent aux hybridations cellulaires TG29 et TG30 respectivement.

*\* Protocole d'immunisation en présence de MDP (muradipeptide)*

Des lots de 10 souris BALB/c de 2 mois et demi ont été immunisées 4 fois à 15 jours d'intervalle par des préparations d'antigènes ES (correspondant à l'excrétion de  $5 \times 10^7$  tachyzoïtes pendant 3 heures) concentrés également 5 fois sur membrane Amicon. Chaque souris a reçu 0,1 ml de cette préparation en association avec 0,1ml d'adjuvant incomplet de FREUND (Difco) par voie sous-cutanée. Enfin, 3 à 4 jours avant d'effectuer le prélèvement des Plaques de Peyer, chaque souris a reçu par voie orale 5mg de muradipeptide solubilisé dans du PBS 0,01M pH 7,2. Ce protocole correspond à l'hybridation cellulaire TG32.

## **VI.2. Hybridation cellulaire et sélection des hybrides**

### **VI.2.a. Milieux utilisés**

La composition des différents milieux utilisés figure dans le Tableau 3.

### **VI.2.b. Préparation des cellules de myélome**

Il s'agit de cellules tumorales de souris BALB/c de type SP<sub>2</sub>O ISREC non sécrétantes (SHULMAN *et al.*, 1978). Ces cellules, déficientes en HGPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transférase) et sensibles au système de sélection de LITTLEFIELD (1964), sont lavées deux fois en milieu DULBECCO (DULBECCO'S MEM, Gibco, Paisley, Ecosse) pour éliminer le sérum de veau foetal qui inhiberait la fusion. Les cellules sont ensuite comptées en cellule de Thoma.

### **VI.2.c. Préparation des lymphocytes**

Les lymphocytes des plaques de Peyer, de la rate ou des ganglions mésentériques sont

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

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

<sup>b</sup> AANE : acide aminé non essentiel (GIBCO, USA)

<sup>c</sup> SVF : sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage (30 mn, 56°C)

**TABLEAU 3**  
**COMPOSITION DES DIFFERENTS MILIEUX UTILISES EN CULTURE CELLULAIRE**

récupérés stérilement après dissociation des organes et filtration sur un filtre de nylon (Blutex, 90mailles/cm<sup>2</sup>, Fenvald Laboratories, Deerfield, IL, USA). Les cellules sont lavées en milieu DULBECCO additionné de 2,5g/l de NaHCO<sub>3</sub>, 50µg/l de streptomycine (Spécia, Paris, France) et 10<sup>5</sup> UI/l de pénicilline (Spécia, Paris, France) puis sont comptées en cellule de Thoma.

#### VI.2.d. Préparation des cellules nourricières

Afin d'assurer une meilleure croissance des hybrides et une élimination des débris cellulaires, des cellules nourricières, essentiellement constituées de fibroblastes et de macrophages provenant de lavages péritonéaux de souris, sont distribuées dans des puits de culture destinés à recevoir les cellules issues de la fusion.

#### VI.2.e. Fusion cellulaire

Les cellules sont mélangées selon un rapport de 1 cellule de myélome pour 5 cellules lymphocytaires puis le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 400g. La fusion est ensuite induite par addition goutte à goutte pendant 1 minute de polyéthylène glycol (PEG 1500, Boehringer, Mannheim, Allemagne). Puis on ajoute sous agitation douce 1ml de milieu DULBECCO en 1 minute, puis 20ml en 4 minutes. La suspension est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 400g et les cellules sont lavées afin d'éliminer le PEG. Le culot cellulaire est repris par addition de milieu sélectif HAT (Hypoxanthine aminoptérine thymidine) à raison de  $2,5 \times 10^4$  à  $5 \times 10^4$  cellules par ml. Celles-ci sont distribuées dans des plaques de culture de 96 ou 24 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) qui sont alors incubées à 37°C (atmosphère humide, 5% de CO<sub>2</sub>). Les premiers clones sont observés après le 7<sup>ème</sup> jour de culture.

### **VI.3. Sélection et analyse des clones producteurs d'anticorps d'isotype IgA**

L'analyse et la sélection des différentes cellules hybrides s'est effectuée en deux temps par une technique radioimmunologique. Les clones producteurs d'anticorps d'isotype IgA ont tout d'abord été sélectionnés vis-à-vis d'un anti-IgA ( $\alpha$ ) de souris (Sigma) adsorbé sur plaques (1 $\mu$ g par puits) la révélation s'effectuant par l'anti-IgA ( $\alpha$ ) de souris marqué par l'iode  $^{125}\text{I}$ . Puis, dans un second temps, les clones producteurs d'anticorps d'isotype IgA spécifiquement dirigés contre un extrait antigénique total de *T.gondii* adsorbé sur plaques (1 $\mu$ g par puits) ont été révélés par le même anti-IgA radiomarké.

### **VI.4. Clonage des hybrides producteurs d'anticorps d'isotype IgA**

Les cellules hybrides positives sécrétant des anticorps IgA spécifiques ont été clonées par la technique de dilution limite, dont le but est d'obtenir théoriquement 1 seule cellule par puits de culture. Pour cela, 0,1ml d'une suspension à 10 cellules par ml sont distribués dans chaque puits de culture contenant des cellules nourricières. Au bout de quelques jours, le milieu est renouvelé; on sélectionne à nouveau les puits présentant un seul clone.

### **VI.5. Vérification de l'isotype IgA des anticorps produits**

Cette analyse a été réalisée sur des surnageants de culture des puits positifs clonés selon la méthode d'OUCHTERLONY (1958). La réaction de double diffusion en gel d'Indubiose 1% (Indubiose A37, Industrie biologique française) est réalisée sur des plaques de verre de 5cm/5cm. On dissout 1g d'indubiose dans 100ml de tampon véronal sodique 1,6% HCl pH 8,3, puis ce gel est coulé sur ces lames. Les puits sont réalisés à l'emporte-pièce. Les puits périphériques contiennent des anticorps spécifiques des différents isotypes de souris anti-IgM (Cappel, France), anti-IgG1, G2a, G2b, G3 (Nordic Immunological Laboratories, TEBU, Le perray en Yvelines, France) et anti-IgA de souris (Sigma). Ces différents anticorps (1mg/ml) sont dilués au 1/4 et 0,02ml de chaque réactif est déposé

dans le puits. La diffusion s'effectue pendant une journée à température ambiante, puis une nuit à 4°C. Les lames sont ensuite citratées (Citrates de sodium, Merck, Allemagne) pendant 30 minutes, lavées en eau déminéralisée pendant une nuit, puis séchées sur papier Whatman et colorées par l'amidoschwartz.

## **VI.6. Production massive d'anticorps monoclonaux**

Afin d'obtenir de grandes quantités d'anticorps monoclonaux, des liquides d'ascites sont produits chez la souris BALB/c par injection de cellules hybrides. Deux méthodes différentes ont été utilisées. La première consiste à induire une tumeur sous-cutanée par injection de  $2 \text{ à } 3 \times 10^6$  cellules hybrides par souris. Trois semaines à un mois plus tard, la tumeur est prélevée, dissociée, les cellules sont récupérées, filtrées, lavées en milieu DULBECCO avant d'être réinjectées par voie intrapéritonéale à d'autres souris BALB/c. La seconde technique consiste à sensibiliser des souris par injection de 0,5ml de pristane (2,6,10,14, tétraméthyl pentadécane, Sigma) par voie intrapéritonéale, ce qui favorise le développement de liquide d'ascite. Environ 7 à 10 jours plus tard,  $5 \times 10^6$  cellules hybrides préalablement lavées sont injectées par voie intrapéritonéale. Puis 8 à 10 jours plus tard, quelques ml de liquide d'ascites sont obtenus. Cette méthode présente l'inconvénient de produire un matériel contenant un peu de pristane difficile à éliminer par la suite. La qualité des différentes ascites produites est ensuite estimée par la technique radioimmunologique classique.

## **VI.7. Caractérisation des clones**

### **VI.7.a. Les techniques radioimmunologiques et immunoenzymatiques**

Les clones sont analysés vis-à-vis d'un extrait d'antigènes membranaires (Chaps) adsorbé sur des plaques de polystyrène ( $1 \mu\text{g}$  d'antigène par puits), et vis-à-vis d'un extrait d'antigènes solubles ( $1 \mu\text{g}$  d'antigène par puits). On utilise 0,1ml de surnageants purs et

0,1ml de liquides d'ascites dilués au 1/1000 et au 1/2000 dans les conditions décrites précédemment.

#### VI.7.b. Immuno-empreinte et électroimmunotransfert

*Pour l'immuno-empreinte*, des dépôts d'antigènes ont été effectués sur de la nitrocellulose à raison de 1,5µg, 1µg et 0,5µg d'extrait antigénique total, de 5µg, 2,5µg et 1µg d'extrait membranaire et d'extrait soluble, et de 1 µl d'antigènes ES concentrés 2 fois et de leur témoin (sérum de veau foetal) préparé dans les mêmes conditions.

*Pour l'électroimmunotransfert*, les premières étapes sont identiques à celles décrites précédemment. Les surnageants de culture sont utilisés non dilués. Afin d'augmenter la sensibilité de détection, la dernière incubation est réalisée en présence d'un anti-IgA de souris marqué à l'iode  $^{125}\text{I}$  à raison d'environ  $1 \times 10^6$  cpm par ml et par piste. La nitrocellulose est lavée 10 fois par du PBS 0,01M-NP40 0,1% puis séchée et révélée par autoradiographie (hyperfilm MP, Kodak).

#### VI.7. c. Test d'immunocapture IgA anti-P30 et anti-P28.5 chez la souris

Un anti-IgA de souris (Sigma) est adsorbé sur des plaques E.L.I.S.A. de 96 puits à une concentration de 5µg/ml à raison de 0,1ml par puits, pendant 3 heures à 37°C puis une nuit à 4°C. Après 3 lavages en PBS 0,01M-Tween 20 0,4%, les plaques sont saturées pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante; Les surnageants préalablement dosés en IgA totales grâce à une IgA myélomateuse témoin du commerce λ MOPC 315 (Sigma) sont ajoutés purs pendant 1 heure à 40°C en incubateur sec. Cette IgA myélomateuse a également été utilisée dans des concentrations compatibles avec le titre en IgA des surnageants.

Puis après 3 nouveaux lavages, l'antigène (extrait membranaire "chaps", dosé à 0,9mg/ml de protéines) est ajouté à 5µg/ml à raison de 0,1ml par puits, pendant une heure. Puis 3

nouveaux lavages sont réalisés et on ajoute 0,1ml d'anticorps monoclonal anti-P30 (TG05-54) couplé à la peroxydase (Diagnostics Pasteur, Steenworde, France) au 1/3000<sup>ème</sup>, soit 0,1ml d'anticorps monoclonal anti-GP28,5 (TG17-179) couplé à la  $\beta$ -galactosidase (1/200 en PBS 0,01M gélatine 0,1%), pendant 1 heure à 40°C. Enfin, après 4 nouveaux lavages, le substrat de la peroxydase est ajouté pendant 30 minutes, et la réaction arrêtée par 0,1ml d'HCl 4N. La densité optique est lue à 492 nm. Les résultats sont exprimés après soustraction de la DO du surnageant correspondant sans addition d'antigène.

#### VI.7. d. Réactions d'inhibition avec les peptides de la molécule P30

Les surnageants non dilués (0,1ml) sont préincubés pendant 1 heure à 37°C avec différents peptides de la molécule P30 (48-67, 82-102, 213-230, 237-256, 279-295, Figure 16) à raison de 10  $\mu$ g de peptide par essai. Puis le mélange est déposé pendant 2 heures à 37°C sur des microplaques sur lesquelles est adsorbé un extrait antigénique total du parasite. Après 3 lavages en PBS-Tween 20 0,1% on ajoute l'anti-IgA de souris (Sigma) marqué à l'iode <sup>125</sup>I pendant 1 heure 30 minutes. La lecture s'effectue au compteur  $\gamma$ .

### VI.8. Evaluation de l'activité biologique des anticorps monoclonaux

#### VI.8.a. Test de lyse dépendante du complément

Ce test permet d'évaluer une activité biologique *in vitro*. Le "Dye test" a été développé en 1948 par SABIN et FELDMAN puis amélioré par FELDMAN et LAMB, en 1966, afin de pouvoir évaluer le pouvoir lytique de différents sérums immuns décomplémentés. Celui-ci est visualisé par l'utilisation d'un colorant vital, le bleu de méthylène. L'activité biologique des anticorps monoclonaux a été étudiée en collaboration avec le laboratoire du Dr J.E. SMITH (Université de Leeds, Angleterre) sur des microplaques de culture de 96 puits.

Différentes dilutions de liquides d'ascites sont réalisées en tampon PBS et des fractions de 0,05ml sont disposées par puit. Un témoin positif dirigé contre P30 (anticorps monoclonal IgG TG05-54) est inclus dans le test. A ces dilutions sont ajoutés 0,05ml d'un mélange de  $2$  à  $4 \times 10^6$  tachyzoïtes par ml en PBS 0,01M et de facteur "accessoire" humain (source de complément externe). Les plaques sont ensuite incubées pendant 1 heure à 37°C puis 0,025ml d'une solution de bleu de méthylène à pH 11 sont ajoutés. Après une nouvelle incubation d'une heure à 20°C, les parasites vivants sont comptés à l'aide d'un microscope inversé au grossissement X400. Le titre correspond à la dilution où 50% des parasites sont vivants.

#### VI.8.b. Transfert passif chez le rat "nude"

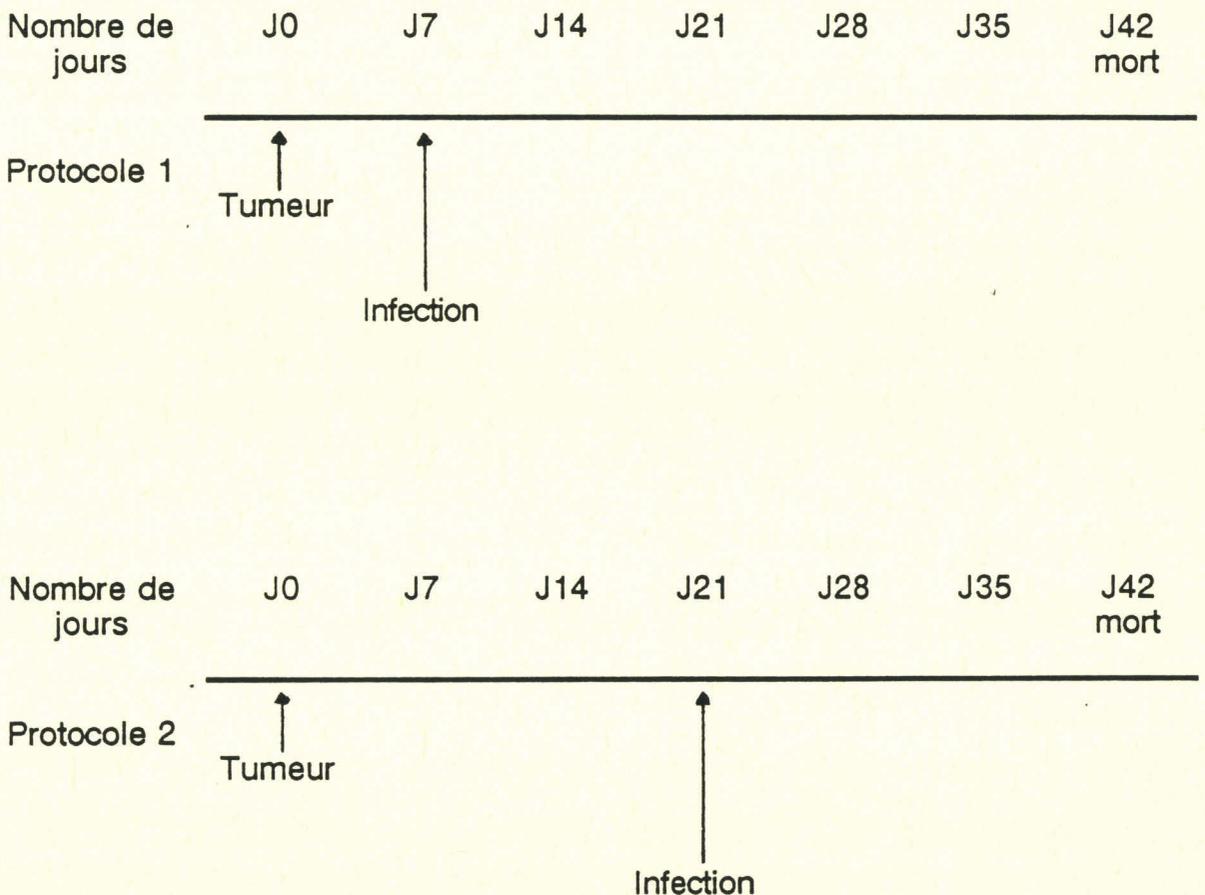
Des lots de 5 rats Fischer "nude" mâles et femelles élevés à l'Institut Pasteur de Lille ont été utilisés. Ces rats reçoivent par voie intraveineuse 1,5ml de liquide d'ascite IgA ou IgG 24 heures avant l'infection par  $5 \times 10^4$  tachyzoïtes de la souche RH par voie intrapéritonéale. Les groupes témoins sont constitués par des rats ayant reçu une ascite irrelevante IgA. Les témoins positifs de protection sont constitués par des rats traités par 1,5ml d'une ascite riche en anticorps monoclonaux IgG (TG05-54) dirigés contre l'antigène majeur de surface P30.

#### VI.8.c. Transfert passif chez la souris

Le rôle des différents liquides d'ascites a été étudié chez la souris BALB/c mâle (2 mois et demi) par transfert passif de 0,2ml de liquides d'ascites par voie intraveineuse. Différents groupes de 10 souris ont été traités par les liquides d'ascites IgA TG25 AB11 et TG30 GD5, par le liquide d'ascite IgA irrelevante, et par le liquide d'ascite IgG TG05-54 (témoin positif de protection). Le jour même, les animaux sont infectés par 1200 kystes de la souche 76K. Un dernier groupe représente les animaux infectés sans transfert passif préalable.

#### VI.8.d. Réalisation de tumeurs sous-cutanées chez la souris ("back-pack")

Les tumeurs ont été réalisées selon la méthode décrite par WINNER III *et al.*, en 1991. Des cellules hybrides préparées dans 0,5ml de milieu DULBECCO et correspondant aux clones, IgA irrelevante, IgA TG25 AB11, IgA TG30 GD5, et au clone IgG anti-P30 ont été injectées par voie sous-cutanée à des groupes de 8 souris BALB/c (2 mois et demi) à raison de  $1 \times 10^6$  cellules hybrides par souris. Des essais préliminaires ont démontré que ces souris meurent de leur tumeur en 38 à 42 jours après l'injection de cellules hybrides. Deux séries de protocoles ont été réalisées en raison de la difficulté de définir le meilleur moment pour l'infection. Celle-ci s'effectue par l'inoculation de 1200 kystes de la souche 76K par voie orale, avec une sonde de gavage. Dans ce modèle, les premières souris témoins meurent dès le 8<sup>ème</sup> jour après l'infection. C'est pourquoi l'infection a été réalisée soit au 7<sup>ème</sup> soit au 21<sup>ème</sup> jour après l'injection de cellules hybrides. Un groupe témoin est constitué de souris uniquement infectées. Le détail des 2 protocoles utilisés est donné ci-après.



## **VI. 9. Purification des formes dimériques des anticorps monoclonaux IgA**

Une colonne de 75 cm de longueur, de 1,6 cm de diamètre, de volume environ 150 ml a été remplie avec un gel de sépharose 4B (Pharmacia, Suède) permettant la séparation de poids moléculaires compris entre  $10^5$  à  $10^7$  kDa. Ce gel a permis la séparation des molécules dimères et monomères d'IgA. La séparation s'effectue en PBS 0,01M (débit de 18ml par heure, Pompe LKB). La calibration de la colonne a été réalisée à l'aide de protéines de poids moléculaire connu (DNP-Lysine 478 ; Ovalbumine 45000; Catalase 232000; Tyroglobuline 669000; Pharmacia, Suède). Le liquide d'ascite (1ml environ) auparavant centrifugé afin d'éliminer les agrégats éventuels, est déposé en surface du gel. Les différentes fractions sont récoltées environ 3 heures 30 minutes après le début de l'élution grâce à un collecteur recueillant environ 2ml par tube (Collecteur Pharmacia). La densité optique des différentes fractions est ensuite évaluée par lecture à 280 nm. Un gel à 7,5% de polyacrylamide est ensuite réalisé pour apprécier le contenu des différentes fractions.

## **VII. CARACTERISATION D'EPITOPES T ET B DE L'ANTIGENE P30**

### **VII.1. Construction de peptides synthétiques de P30**

Grâce à la détermination de la séquence de l'antigène P30 par BURG *et al.*, (1988) certains peptides potentiellement les mieux exposés au système immunitaire ont été identifiés par la méthode de HOPP et WOODS (1981), basée sur des critères d'hydrophobicité. D'autres critères, notamment de mobilité et d'accessibilité dans l'espace, basés sur des données statistiques de déplacement et de répartition des aminoacides entre l'extérieur et l'intérieur de protéines globulaires (JANIN *et al.*, 1979) ont été pris en compte. Le profil de l'antigène P30 établi selon ces paramètres est présenté (Figure 15). Sur ces bases, 5 peptides ont été sélectionnés et synthétisés dans le laboratoire du Professeur TARTAR à l'Institut Pasteur de Lille. Ces peptides 48-67, 82-102, 213-230,

238-256, 279-295 ont été utilisés non couplés à une protéine "carrier". Les séquences de ces peptides sont résumées dans la Figure 16.

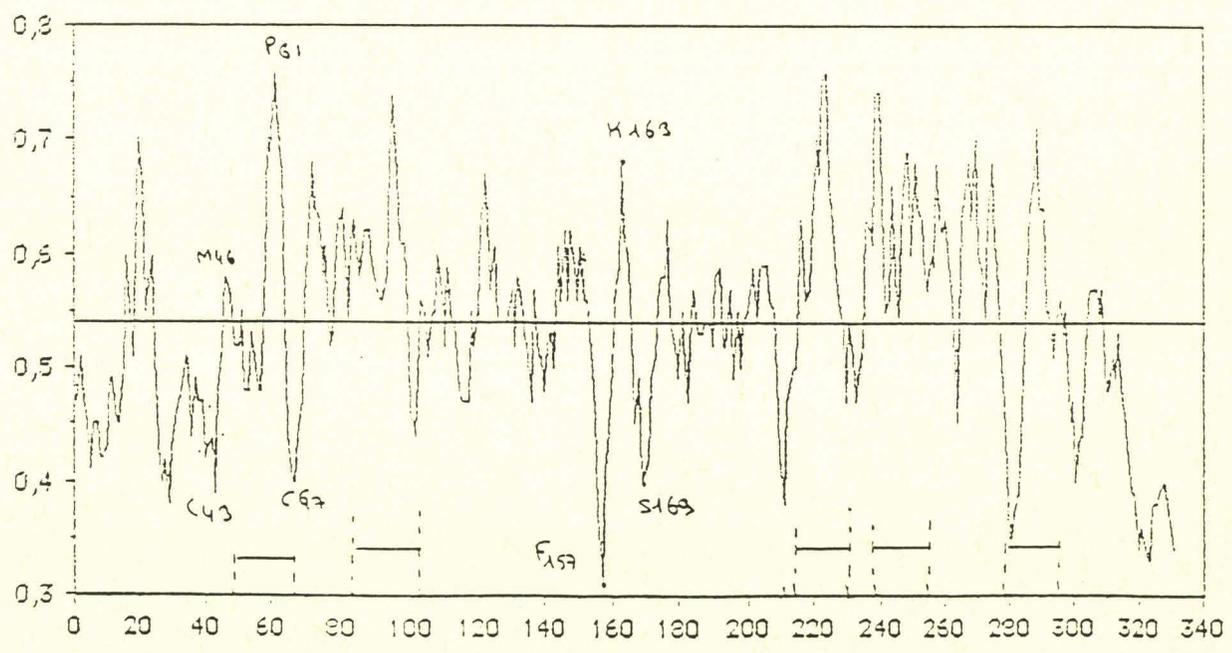
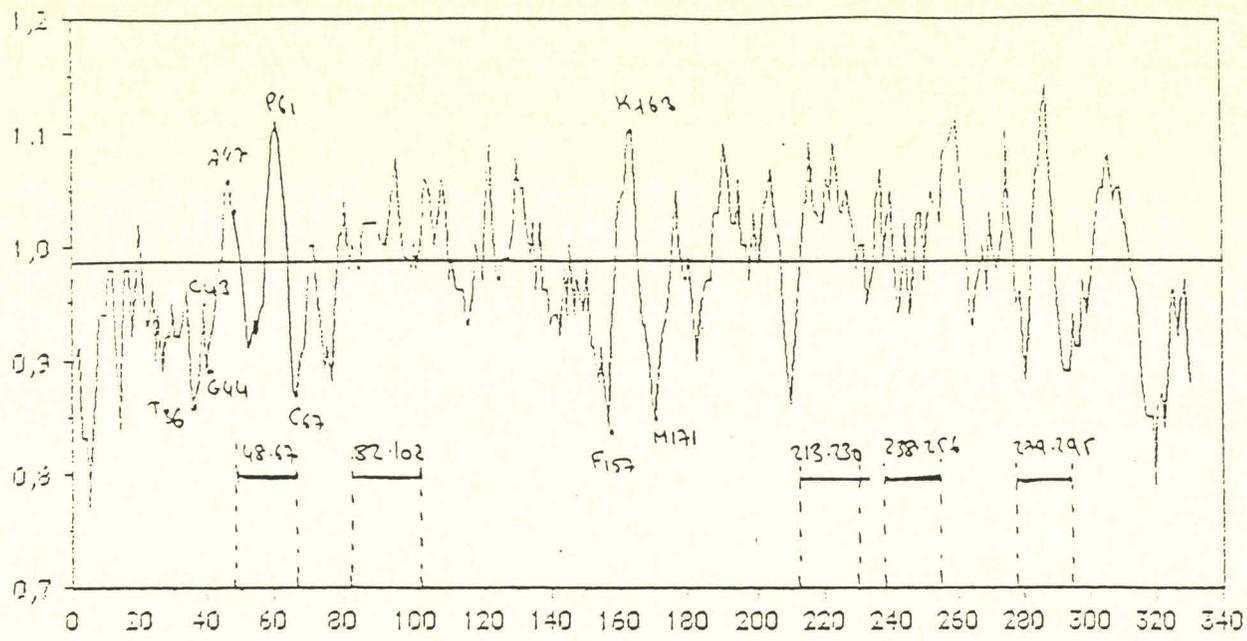
## **VII.2. Protocoles de protection avec le peptide N Terminal de P30: 48-67**

Le peptide 48-67 a été défini à partir de la séquence publiée par BURG *et al.*, 1988. Ce peptide constitue néanmoins le peptide N-terminal puisque lors de la maturation de la protéine, le peptide signal est clivé ce qui place la sérine de ce peptide en position N-terminale.

### **VII.2.a. Immunisation de rats et de souris**

*Des lots de 10 souris BALB/c* de 2 mois et demi ont été immunisés aux jours 42, 35, 27, et 7 avant l'infection par soit 25 µg du peptide P30 48-67 non couplé sous forme linéaire, soit par 25 µg d'une construction octamérique du peptide 48-67 (construction "MAP": multiple antigenic peptide) soit par 25µg d'une construction octamérique irrelevante ou enfin par 0,1ml d'antigènes excrétés-sécrétés (correspondant à l'excrétion de  $5 \times 10^7$  tachyzoïtes pendant 3 heures). Les différents peptides ont été solubilisés dans 0,1ml de PBS et injectés par voie sous-cutanée en présence de 0,1ml d'adjuvant incomplet de Freund. Les sérums sont récupérés avant l'infection et les souris sont alors infectées par 1200 kystes de la souche 76K par voie orale.

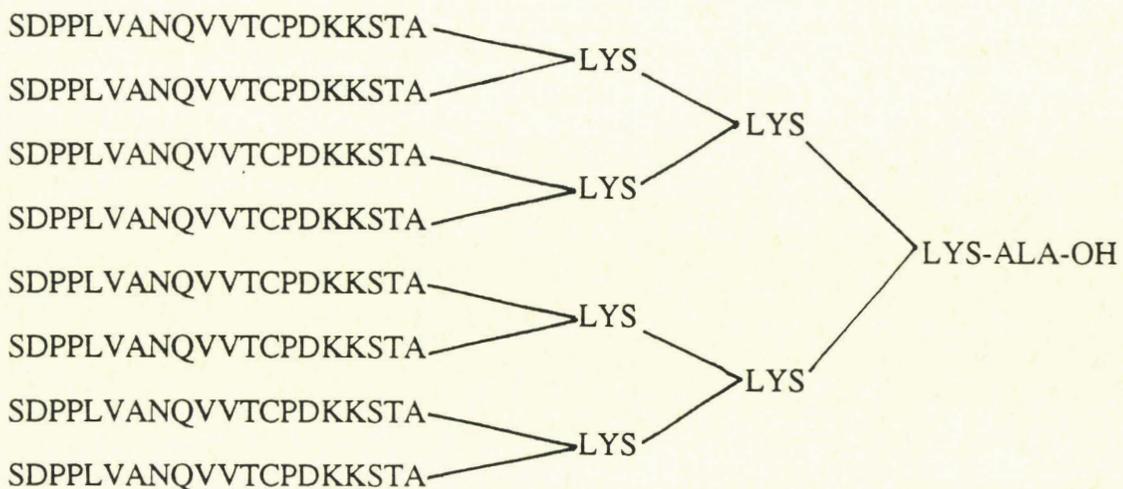
*Des lots de 5 rats Fischer* ont été immunisés par voie sous-cutanée aux 42<sup>ème</sup>, 35<sup>ème</sup>, 24<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jours avant la récupération des lymphocytes inguinaux, par 50 µg de la construction octamérique du peptide 48-67 et de la construction octamérique irrelevante en présence d'adjuvant incomplet de Freund.



**FIGURE 15**  
**PREDICTION DES SEQUENCES PEPTIDIQUES LES MIEUX**  
**EXPOSEES DE L'ANTIGENE P30**

Peptides	Séquence
48-67	SDPPLVANQVVTCPPDKKSTA
82-102	CPKTALTEPPTLAYSPNRQIC
213-230	LVCCKDGVKVPQDNNQYC
238-256	CNEKSFKDILPKLTENPWQ
279-295	KSVIIGCTGGSPKHHHC
irrelevant 158-175 P28 <i>Schistosoma mansoni</i>	LADLVLIAVIDHVTDLDK
irrelevant utilisé pour la construction octamérique	VEPDKVEEANKGEN

## A. SEQUENCE DES DIFFERENTS PEPTIDES P30



## B. STRUCTURE DE LA CONSTRUCTION OCTAMERIQUE DU PEPTIDE 48-67 DE P30

FIGURE 16

CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS PEPTIDES DE LA  
MOLECULE P30

### VII.2.b. Transfert de lymphocytes T spécifiques de la construction octamérique du peptide N-terminal 48-67

Les cellules T spécifiques des constructions octamériques 48-67 et irrelevante sont préparées comme décrit ci-dessus et injectées à des rats Fischer "nude" (Nu/Nu) à raison de  $5 \times 10^4$  cellules par rat dans 0,5ml de RPMI, la veille de l'infection par  $5 \times 10^4$  tachyzoïtes de la souche RH.

### VII.2.c. Analyse des sérums par E.L.I.S.A.

Des microplaques de 96 puits (Maxisorb, Nunc, Danemark) sont traitées par 0,2ml de solution de peptide à  $10 \mu\text{g/ml}$  en tampon carbonate-bicarbonate  $0,1\text{M}$  pH 9.6, pendant une nuit, à température du laboratoire. Les plaques sont ensuite saturées avec 0,3ml d'une solution de sérum albumine bovine (BSA, Boehringer, Mannheim, Allemagne) à 1%, 2 heures à température ambiante. Après 2 lavages en PBS- $0,3\text{M}$  NaCl - 0,1% Tween 20, les dilutions de sérums en PBS-BSA 1% sont ajoutées (Dilutions au 1/200 pour les sérums de souris et au 1/100 pour les sérums de rat). Enfin, après de nouveaux lavages, un anti-IgG de souris (H+L) couplé à la peroxydase (Diagnostics Pasteur, France), ou un anti IgG de rat (H+L) couplé à la peroxydase (KPL, Gaithersburg, MD, USA) sont ajoutés au 1/10000 et au 1/20000 respectivement pour 1 heure à température ambiante. Après 3 nouveaux lavages, une solution substrat contenant 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Diagnostics Pasteur) et  $10\text{mg/ml}$  d'orthophénylène diamine (Sigma) est alors ajoutée pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 0,1ml de HCl 4N. La densité optique est évaluée à 492nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Titertek Multiskan MCC 1340, Labsystems, les Ullis, France).

### VII.3. Approche cellulaire T au cours de l'infection

#### VII.3.a. Protocoles d'infection

Pour l'étude de la réactivité cellulaire T, des rats Fischer mâles de 2 mois et demi ont été infectés avec 1200 kystes de la souche 76K par voie orale comme précédemment décrit, ou par  $10^5$  tachyzoïtes de la souche RH par voie intrapéritonéale.

#### VII.3.b. Test de prolifération lymphoblastique

Pour toutes les cultures cellulaires, le milieu utilisé a été le RPMI 1640 auquel on ajoute  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ 2-mercaptoéthanol (Merck, Darmstadt, Allemagne), 2mM de L-Glutamine (Merck), 1mM de pyruvate de sodium (Gibco, Courbevoie, France), des antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de streptomycine; Spécia, Paris, France) et 10% de sérum de veau inactivé (Boehringer, Mannheim, Allemagne).

Les ganglions mésentériques et la rate sont prélevés stérilement et les lymphocytes T sont séparés par passage sur une colonne de Nylon (JULIUS *et al.*, 1973) et maintenus à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Pour la réalisation du test,  $5 \times 10^5$  lymphocytes T et  $10^6$  cellules présentatrices d'antigènes (irradiées pendant 3 minutes à 30 GY, Philips RT, filtre 1,7 Al, 100 Ku, 8mA, et provenant de thymus de jeunes rats Fischer) sont cultivées en présence de l'antigène pendant 5 jours dans un volume total de 0,2ml (Plaques Nunclon, Roskilde, Danemark). Un peptide irrelevant de l'antigène P28 du schistosome est utilisé comme contrôle. Au cours des dernières 16 à 18 heures de culture, on ajoute 18,5 kBq de thymidine tritiée (activité spécifique 37 GBq/mmol, CEA, Gif sur-Yvette, France). Le taux de radioisotope incorporé est déterminé après filtration des cellules sur fibre de verre (Titertek harvester, Skatron, Lirbven, Norvège), puis immersion des filtres dans un liquide de scintillation, et enfin un comptage à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (LKB Wallace, Turku, Finlande).

**RESULTATS**

## **I. ETUDE DE LA REPONSE IgA HUMAINE AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE**

Chez l'homme, la voie d'infestation naturelle est représentée essentiellement par l'ingestion de parasites. Notre première approche a donc concerné l'étude de l'induction d'une réponse anticorps d'isotype IgA au cours de l'infection naturelle.

Cette étude comporte deux volets impliquant tout d'abord la mise en évidence d'une réponse IgA sérique spécifique humaine par une méthode radioimmunologique puis dans un second temps, la détection des antigènes reconnus par les anticorps d'isotype IgA par la technique d'immunoélectrotransfert.

### **I.1. Mise en évidence de la réponse IgA spécifique au cours de la toxoplasmose**

Afin de définir la cinétique d'évolution des anticorps d'isotype IgA au cours de la toxoplasmose, une centaine de sérums humains d'infection et négatifs ont été obtenus par le Dr. Anne Decoster (hôpital St Antoine à Lille) et ont été étudiés.

Certains sérums des patients pour lesquels un suivi sérologique au cours de l'infection a été possible ont été analysés par une technique radioimmunologique permettant la détection des anticorps IgA spécifiques (Tableau 4). Ces sérums ont été préalablement analysés par les techniques classiques de diagnostic et ont été classés de la façon suivante:

- Sérums de "phase aiguë": un mois à un mois et demi après séroconversion avec présence d'anticorps IgM soit seuls, soit accompagnés d'anticorps IgG.
- Sérums de "phase subaiguë": il s'agit d'une phase évolutive, avec soit des anticorps d'isotype IgG à titre encore élevé associés ou non à la présence d'anticorps IgM.
- Sérums de phase "chronique": à ce stade, le taux d'anticorps d'isotype IgG est faible et stable au cours de plusieurs prélèvements avec une éventuelle présence d'anticorps IgM.

	N° Sérums	cpm *	IgG**	IgM	Date de prélèvement	
<b>A</b>	Phase aiguë/ subaiguë	465	1011	200	+	16/12/86
		489	900	200	+	20/1/87
	Toxoplasmose	604	796	100	+	4/6/87
	Nov-Dec 86	646	724	100	+	16/7/87
<b>B</b>	Phase subaiguë	516	721	800	+	6/2/87
		529	571	800	+	5/3/87
<b>C</b>	Phase subaiguë	440	580	400	+	11/12/86
		536	664	400	+	18/3/87
		616	568	400	+	23/6/87
<b>D</b>	Fin de phase subaiguë	333	548	200	+	24/7/86
		361	541	200	+	27/7/86
	Début de phase chronique	377	505	200	+	1/10/86
		414	454	200	+	31/10/86
	IgM résiduelles	418	459	200	+	13/11/86
		503	410	200	+	26/1/87
<b>E</b>	Fin de phase subaiguë.	499	334	400	-	21/1/87
		539	327	400	-	3/4/87
	Début de phase chronique	743	347	400	-	25/11/87
		754	278	200	-	15/12/87
<b>F</b>	Mère en phase subaiguë	470	582	400	+	19/12/86
		500	569	400	+	23/1/87
<b>G</b>	Enfant sans toxoplasmose congénitale	551	100	100	-	14/4/87
		586	130	100	-	14/5/87
		622	92	25	-	26/6/87
		703	79	10	-	1/10/87

\* Moyenne des sérums négatifs:  $140 \pm 32$  cpm

\*\* Exprimé en Unités Internationales par ml

TABLEAU 4

REPONSE ANTICORPS IgA HUMAINE  
ETUDE PAR UNE TECHNIQUE RADIOIMMUNOLOGIQUE

D'après les données obtenues pour les différents sérums analysés, la réponse anticorps d'isotype IgA est d'apparition précoce (A), persiste à taux élevé en phase subaiguë (B, C) et diminue lors du passage en phase chronique (D, E). Le dossier F concerne le cas typique d'une mère contaminée lors du premier trimestre de sa grossesse et se trouvant en phase subaiguë au moment de l'accouchement. Le dossier G est celui de son enfant non infecté suivi sur une période de 6 mois. Les sérums de la mère sont positifs en anticorps IgA spécifiques, le sérum de l'enfant ne possède quant à lui pas d'anticorps d'isotype IgA, mais uniquement les IgG maternelles transmises.

La réponse anticorps d'isotype IgA mise en évidence par cette technique est parallèle à la réponse IgM. Néanmoins, des anticorps IgA spécifiques peuvent être détectés par cette technique jusqu'en fin de phase subaiguë.

Cependant, chez l'homme, on ne peut connaître avec précision les cinétiques comparées de ces deux réponses anticorps puisque la date de l'infection est souvent difficile à déterminer.

## **I.2. Identification des antigènes impliqués dans la réponse anticorps IgA au cours de la toxoplasmose humaine**

Après avoir détecté une réponse anticorps IgA importante dans les sérums collectés en phase aiguë de l'infection, nous avons recherché quels étaient les antigènes reconnus par ces anticorps d'isotype IgA. L'analyse de ces sérums a donc été réalisée par immunotransfert en conditions réductrices et non réductrices à l'aide de deux sources d'antigènes, un extrait antigénique total du parasite et une préparation antigénique soluble (contenant notamment certains antigènes excrétés-sécrétés caractérisés dans notre laboratoire dans le cadre de la réponse IgG: les antigènes de 28,5 et de 27 kDa).

### I.2.a. Immunotransfert de l'extrait antigénique total de *T. gondii*

L'analyse de sérums humains collectés en phase aiguë de l'infection, après immunotransfert d'un extrait antigénique total du parasite (Figure 17) en conditions non réductrices (17A, pistes 1 à 4) démontre que la réponse anticorps IgA est majoritairement dirigée contre l'antigène majeur de surface P30 (pistes 1 à 4) bien que des antigènes de poids moléculaires apparents de 97, 83, et 43 kDa soient également reconnus. L'analyse des mêmes sérums après immunotransfert de l'extrait antigénique total en conditions réductrices (17B, pistes 8 à 11) montre que la réponse anticorps IgA de ces sérums est plus difficilement détectable mais essentiellement dirigée contre l'antigène de 30 kDa (pistes 9). La réponse anticorps IgG du sérum de la piste 4 (17A) et 11 (17B) est présenté à titre de comparaison (pistes 5 et 12). Ces anticorps IgG reconnaissent de nombreux antigènes, dont les principaux antigènes de surface du parasite P30, P35, et P43.

### I.2.b Immunotransfert d'une préparation antigénique soluble

Le rôle des antigènes excrétés-sécrétés dans l'immunité a été largement documenté dans notre laboratoire à l'aide de deux modèles expérimentaux (DARCY *et al.*, 1988; DUQUESNE *et al.*, 1990; DARCY *et al.*, 1992). Il nous a aussi paru intéressant de savoir si certains de ces antigènes représentaient les cibles d'une réponse anticorps IgA au cours d'une infection naturelle. Cependant, les préparations d'antigènes excrétés-sécrétés contiennent une quantité importante de sérum (10%) gênant la migration sur gel. Nous avons donc préféré utiliser pour l'analyse des sérums humains une préparation d'antigènes solubles libérés par le parasite en absence de calcium (SIBLEY *et al.*, 1986). Cette préparation est fortement enrichie en principaux antigènes sécrétés caractérisés dans notre laboratoire. Un gel à 10% de polyacrylamide a été réalisé en conditions réductrices et des sérums humains caractéristiques des différentes phases de l'infection ont été analysés (Figure 18).

A titre de contrôle, on a utilisé un sérum de souris immunisée par l'antigène P27. L'analyse d'un sérum de patient en phase aiguë de la toxoplasmose (A, piste 3) a révélé la

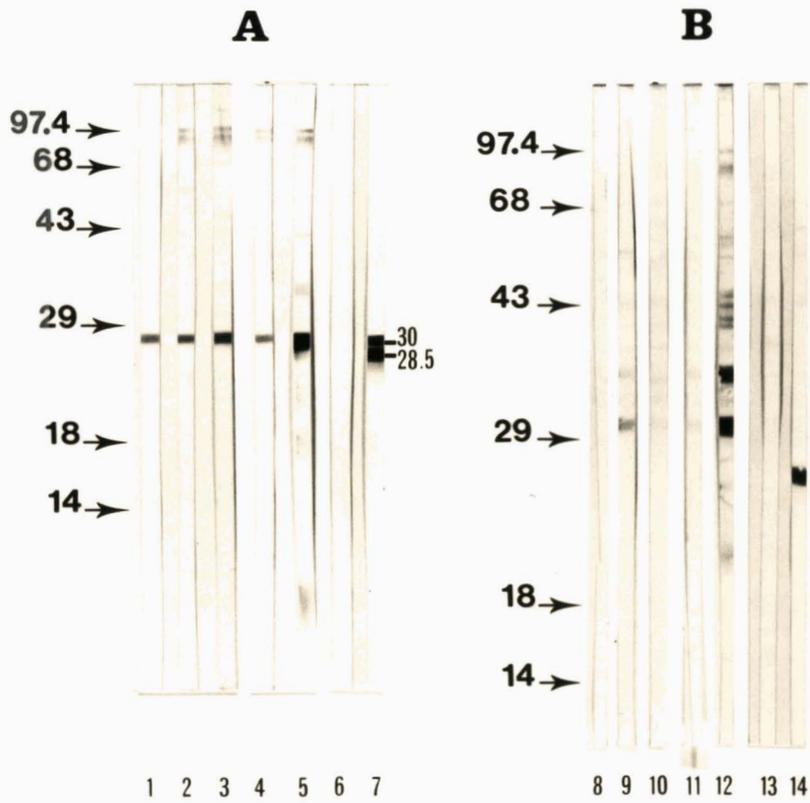


FIGURE 17

ANTIGENES RECONNUS PAR LES ANTICORPS IgA HUMAINS AU  
SEIN D'UN EXTRAIT ANTIGENIQUE TOTAL DE TACHYZOÏTES

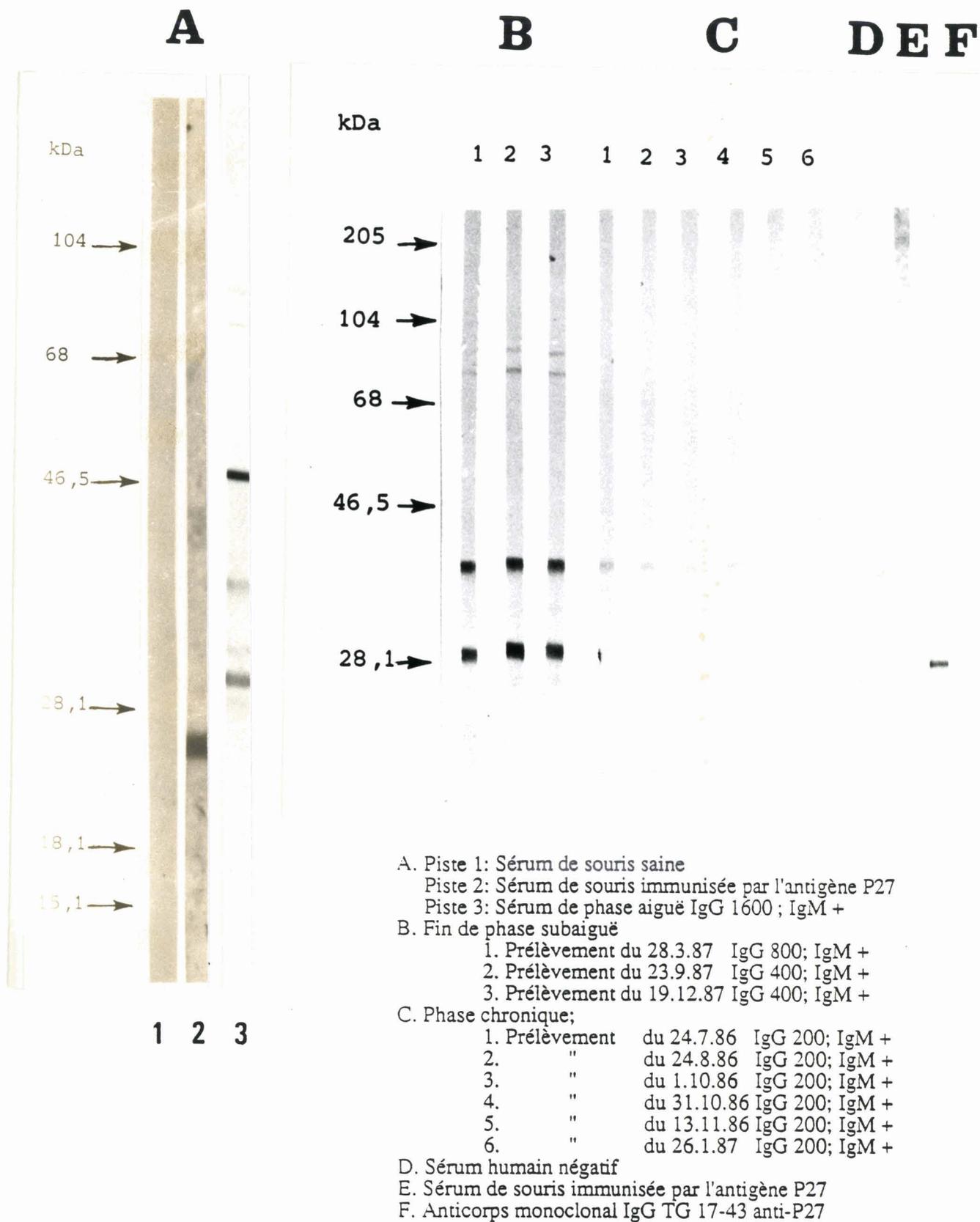


FIGURE 18

ANTIGENES RECONNUS PAR LES ANTICORPS IgA HUMAINS DANS  
 UN EXTRAIT SOLUBLE DE TACHYZOITES

reconnaissance particulière par les anticorps d'isotype IgA spécifiques des antigènes de 28,5 (faiblement), 30, 40 kDa et d'un antigène intensément marqué d'environ 50 kDa. Les sérums du patient B (fin de phase subaiguë) reconnaissent de façon majeure l'antigène de 28,5 kDa, et également un antigène de 40 kDa. Dans le cas C (sérums de phase chronique) pour lequel on possède un suivi des sérums sur 6 mois, la réponse anticorps IgA semble seulement dirigée dans les premiers prélèvements contre un antigène de 40 kDa, puis s'atténue au cours du temps.

Malheureusement, cette préparation antigénique nécessitant le prélèvement de lavages péritonéaux d'un grand nombre de souris infectées, nous n'avons pas pu étudier un grand nombre de sérums, notamment aigus, ce qui aurait été souhaitable.

## **II. ETUDE DE LA REPONSE IgA DIRIGEE CONTRE T. GONDII AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTALE**

La cinétique d'évolution précise de la réponse anticorps d'isotype IgA au cours de la toxoplasmose ne peut être établie que dans des modèles expérimentaux pour lesquels on connaît la date exacte de l'infection. Les deux modèles dont nous disposions étaient celui du rat, résistant à l'infection expérimentale par *T. gondii*, et la souris, animal sensible à une infection par ce parasite.

### **II.1. Cinétique de la réponse anticorps IgA chez le rat et la souris en fonction de la voie d'infection**

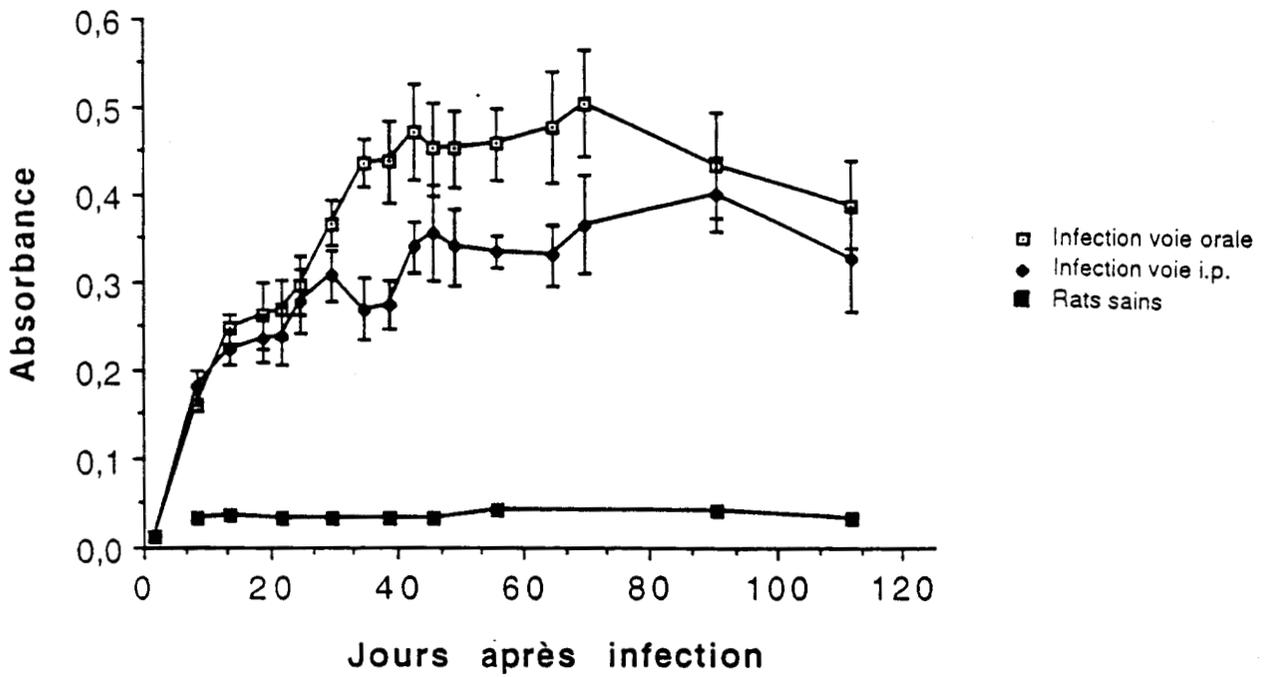
Des rats Fischer ont été infectés par voies orale et intrapéritonéale par 1200 kystes de la souche atténuée 76K de *T. gondii*. Les souris OF1 ont reçu par les mêmes voies d'inoculation 100 kystes de la même souche (Figure 19). Les sérums ont été analysés de J0 à J300 pour le rat et de J0 à J110 pour la souris, par une technique d'immunoempreinte.

*Chez le rat*, une réponse anticorps d'isotype IgA est détectée quelle que soit la voie d'infection dès le 7<sup>ème</sup> jour après l'infection, atteint un plateau vers le 40<sup>ème</sup> jour puis décroît par la suite. Cette réponse est toutefois plus importante lors de l'infection par voie orale que lors de l'infection par voie intrapéritonéale (Figure 19A).

*Chez la souris*, on observe une évolution comparable de la réponse anticorps IgA. Cette réponse est également plus élevée après une infection par voie orale que lors d'une infection par voie intrapéritonéale (Figure 19B).

Bien qu'il soit difficile de comparer des résultats de tests utilisant des réactifs différents, la réponse anticorps IgA que nous avons observé chez la souris semble néanmoins plus importante que chez le rat.

A



B

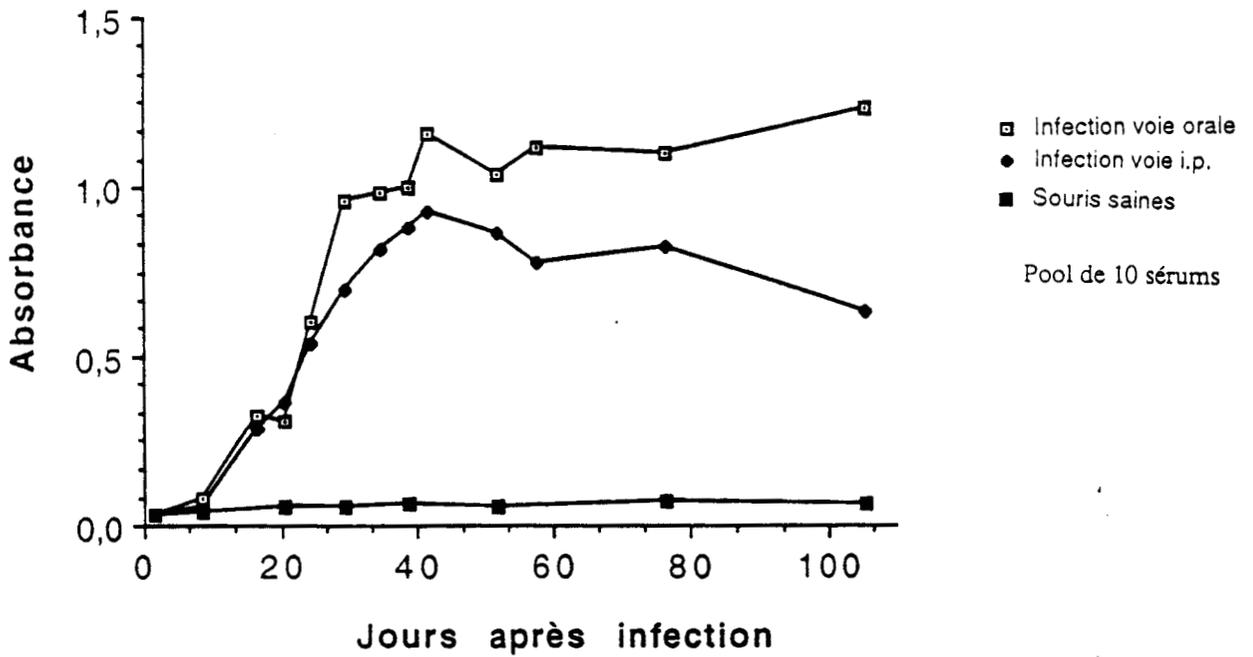


FIGURE 19

CINETIQUE DE LA REPOSE ANTICORPS D'ISOTYPE IgA CHEZ LE  
RAT ET LA SOURIS AU COURS DE L'INFECTION

## **II.2. Etude cinétique comparée des différentes réponses anticorps d'isotype IgG, IgM, IgA, IgE chez le rat infecté par voie orale**

L'évolution de la réponse anticorps IgA par rapport aux autres réponses anticorps a été étudiée dans le cas de l'infection du rat par voie orale (Figure 20A). En effet, le comportement de ces animaux face à l'infection peut être rapproché du comportement observé chez l'homme ce qui constitue l'intérêt particulier de ce modèle.

La réponse IgM apparaît très rapidement dès le 7<sup>ème</sup> jour après l'infection (Figure 20A et 20B), atteint son niveau maximum dès le 9<sup>ème</sup> jour, mais reste néanmoins élevée par la suite. La réponse anticorps IgG s'élève quant à elle progressivement et persiste plus de 110 jours après l'infection. La réponse anticorps d'isotype IgE, également détectée dès le 7<sup>ème</sup> après l'infection suit une évolution parallèle à la réponse IgA.

Afin de préciser plus particulièrement l'évolution de la réponse anticorps IgA par rapport à l'évolution de la réponse IgM, nous avons étudié les cinétiques comparées de ces deux réponses anticorps dès les premiers jours après l'infection chez le rat (Figure 20B).

Nous avons pu constater que l'apparition des deux réponses anticorps étaient pratiquement simultanée (moins d'un jour d'intervalle). Ceci confirme la précocité d'apparition de la réponse anticorps IgA observée en toxoplasmose humaine et valorise sa détection conjointement avec les anticorps IgM dans les cas de toxoplasmoses aiguës.

## **II.3. Induction d'une réponse IgA après immunisation par les antigènes excrétés-sécrétés**

Etant donné le rôle des antigènes excrétés-sécrétés du parasite dans l'immunité, il était intéressant de savoir si certains de ces antigènes sont cibles d'une réponse anticorps d'isotype IgA.

Les résultats obtenus chez le rat immunocompétent immunisé par les antigènes ES (Figure 21) démontrent que ces antigènes peuvent induire même en absence d'adjuvant, une

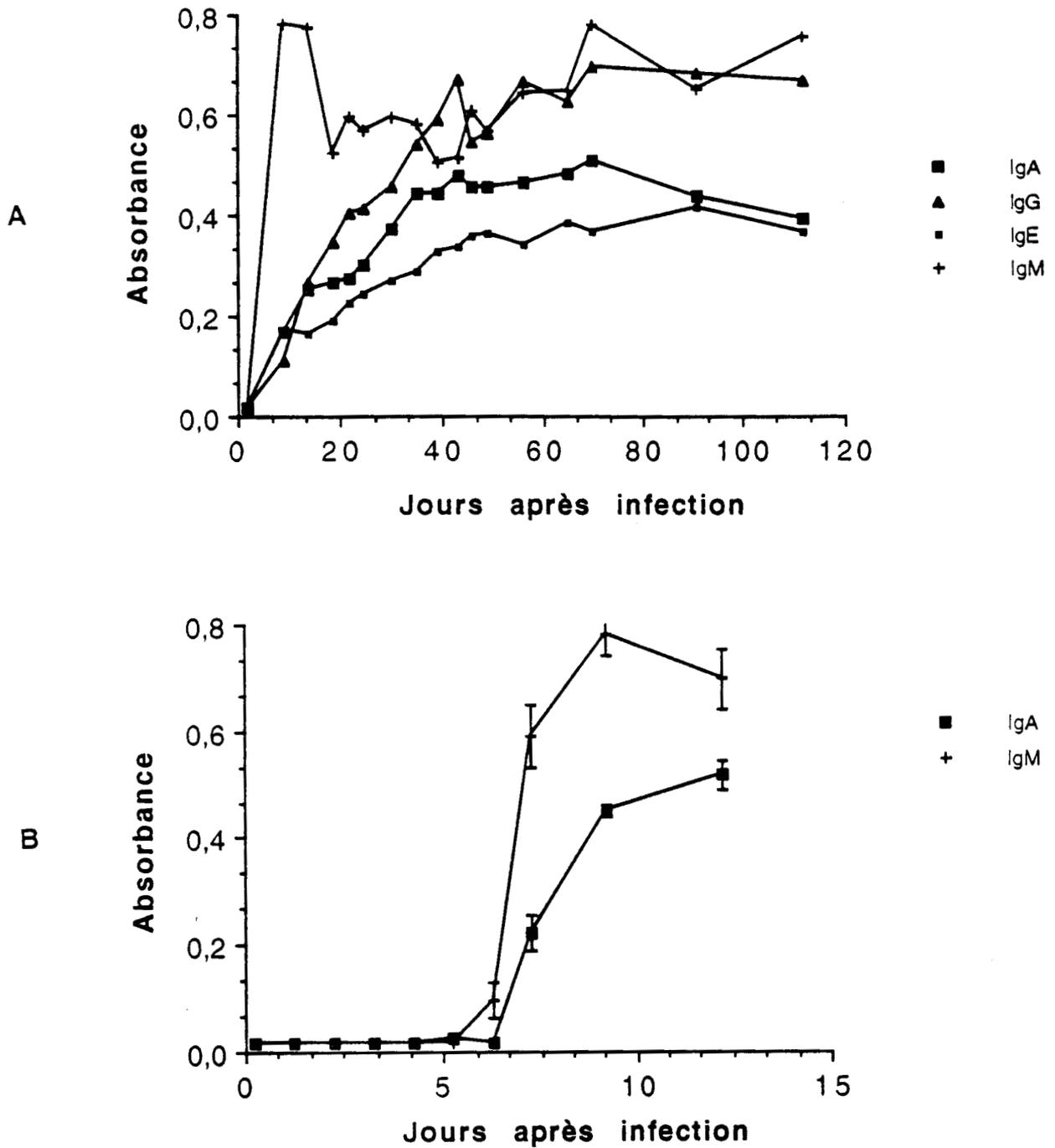


FIGURE 20

CINETIQUE COMPAREE DES ANTICORPS IgG, IgM, IgA, Et IgE CHEZ  
LE RAT INFECTE PAR VOIE ORALE

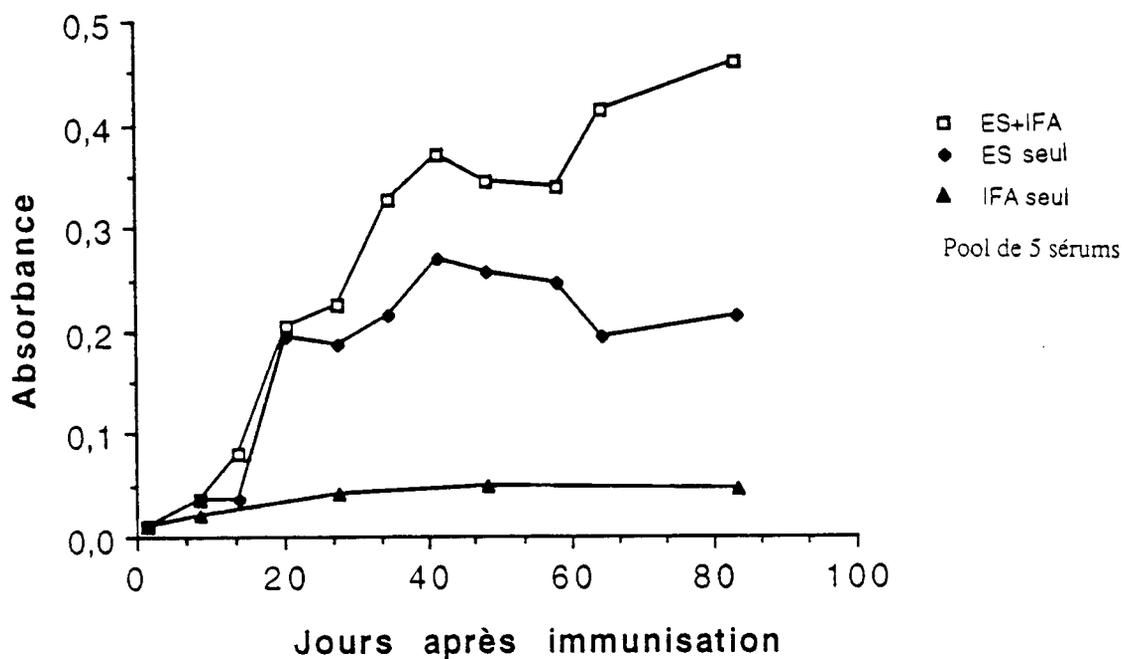


FIGURE 21  
INDUCTION D'UNE REPONSE ANTICORPS IgA APRES  
IMMUNISATION DU RAT PAR LES ANTIGENES  
EXCRETES-SECRETES

réponse anticorps de type IgA notable. Cette réponse anticorps est néanmoins amplifiée en présence d'adjuvant incomplet de Freund et atteint des niveaux comparables à ceux observés lors de l'infection par voie orale.

#### **II.4. Antigènes reconnus par les anticorps IgA et IgE au cours de l'infection et de l'immunisation dans un extrait antigénique total du parasite**

La spécificité antigénique de ces anticorps IgA induits au cours de l'infection expérimentale du rat et de la souris par voie orale, et au cours d'immunisations de rats par les antigènes ES a été déterminée après immunotransfert. Nous avons utilisé pour cette étude des conditions d'électrophorèse permettant une bonne séparation des antigènes de poids moléculaire compris entre 25 à 35 kDa (gel à 13% d'acrylamide) (Figure 22).

Dans la partie A, les pistes 1 à 9 présentent les résultats obtenus avec des pools de sérums de rats collectés à J7, J17, J20, J28, J41, J54, J68, J155, et J301 après infection orale par 1200 kystes de la souche 76K. Les pistes 10 et 11 correspondent au pool de sérums de rats non infectés, et au pool de sérums de rats Fischer ayant reçu un extrait de cerveau de souris non infectée, respectivement. Un anticorps monoclonal IgG (TG17-179) spécifique de l'antigène de 28,5 kDa et un sérum polyclonal dirigé contre un antigène de 30 kDa ont également été utilisés (D, pistes 1 et 2 respectivement) pour préciser le poids moléculaire des antigènes.

Au 17<sup>ème</sup> jour après l'infection, la réponse anticorps IgA des rats est essentiellement dirigée contre des antigènes de 38, 30 et 29 kDa. A partir de J41, on observe la reconnaissance des mêmes molécules, avec toutefois la présence de triplets supplémentaires dans la zone de 90 à 75 kDa ainsi que la présence de bandes à des poids moléculaires apparents de 50, 43, 35 et 28,5 kDa (Figure 22.I.A). Les sérums de rats infectés par la même dose de kystes mais par voie intrapéritonéale présentent le même profil, avec néanmoins une plus faible reconnaissance de l'antigène de 30 kDa.

La figure 22.I.B illustre les résultats obtenus avec des pools de sérums de rats Fischer immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés du parasite en présence d'adjuvant incomplet de FREUND à J57. La réponse anticorps d'isotype IgA est principalement dirigée contre des antigènes de poids moléculaires 29 kDa, 28,5 et 30 kDa.

Les sérums de souris infectées par voie orale possèdent à J75 et J104 après infection (Figure 22.I.C, pistes 1 et 2) des anticorps IgA essentiellement dirigés contre un antigène de 29 kDa. La piste 22. I.C.3 correspond au pool de sérums de souris non infectées.

Les anticorps d'isotype IgE des sérums de rats infectés par voie orale et prélevés à J63 et J89 (figure 22 II. pistes E et F) reconnaissent majoritairement l'antigène P30 dans un extrait total de tachyzoïtes. Une réponse beaucoup plus faible vis-à-vis d'autres antigènes peut être néanmoins détectée. La piste G correspond au pool de sérums de rats non infectés. L'ensemble de ces résultats souligne l'importance de la réponse polyisotypique IgG, IgM, IgA et IgE induite par l'antigène majeur du parasite P30.

#### **II.5. Antigènes excrétés-sécrétés reconnus par les anticorps IgA de rats infectés et immunisés**

Nous n'avons pas pu, pour cette étude, utiliser la préparation d'antigènes solubles employée précédemment pour l'analyse des sérums humains, en raison du trop grand nombre d'animaux nécessaires à sa préparation (voir matériel et méthodes). En conséquence, nous avons utilisé les préparations d'antigènes excrétés-sécrétés. Cependant, ces préparations contenant 10% de sérum provoquent une grande déformation du gel au niveau de la zone de migration de l'albumine et des immunoglobulines et empêchent la détection par immunotransfert d'antigènes parasitaires dans la zone comprise entre 45 à 80 kDa.

Dans ces conditions, nous avons pu observer que la réponse anticorps IgA de rats infectés est préférentiellement dirigée contre un antigène de 34 kDa, bien que des antigènes de 39

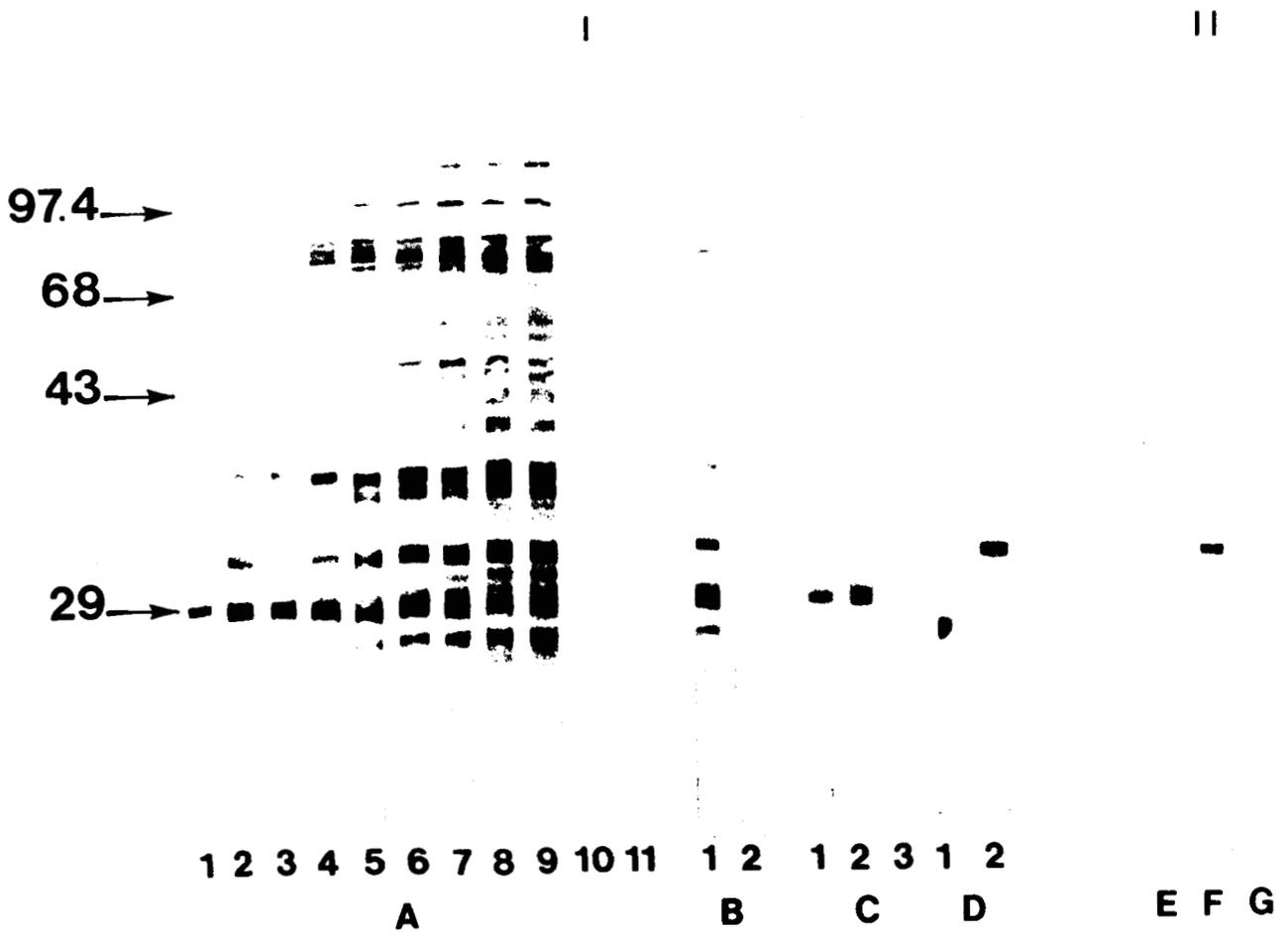
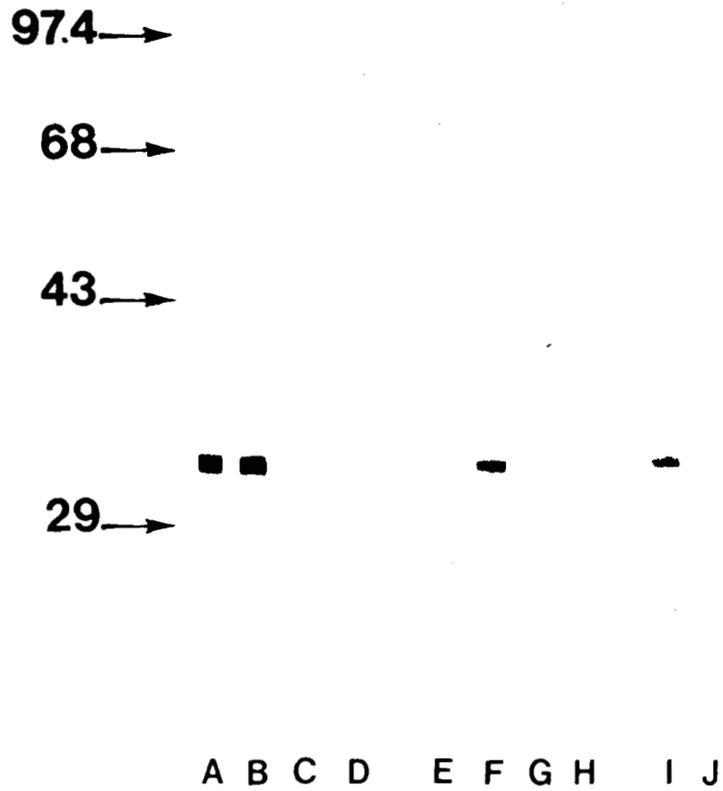


FIGURE 22

ANTIGENES RECONNUS PAR LES ANTICORPS IgA DANS UN  
EXTRAIT ANTIGENIQUE TOTAL DU PARASITE



**FIGURE 23**  
**ANTIGENES RECONNUS PAR LES ANTICORPS IgA DANS UN**  
**EXTRAIT D'ANTIGENES EXCRETES-SECRETES**

et 28,5 kDa soient également reconnus (Figure 23). On ne note pas de différences entre les résultats obtenus lors de l'infection par voie orale (piste A) et par voie intrapéritonéale (piste B). Les pistes C et D correspondent au pool de sérums de rats non infectés et au pool de sérums de rats ayant reçu un extrait de cerveau de souris saine, respectivement.

La réponse anticorps IgA de souris infectées est également dirigée contre le même antigène de 34 kDa, mais est plus intense lors de l'infection par voie orale (piste F) que lors de l'infection par voie intrapéritonéale (piste E). Les pistes G et H correspondent aux pools de sérums de souris saines et de sérums de souris ayant reçu l'extrait de cerveau de souris saine, respectivement.

Enfin, des sérums de rats immunisés par les antigènes ES en présence d'adjuvant incomplet de FREUND, reconnaissent également deux bandes majeures de 34 et 28,5 kDa (piste I). Ces antigènes ne sont pas reconnus par le pool de sérums de rats immunisés uniquement par l'adjuvant incomplet de FREUND (piste J).

### **III. APPROCHE MONOCLONALE DE LA REPONSE IgA AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE**

Afin de pouvoir évaluer la fonction des anticorps d'isotype IgA dans l'immunité au cours de la toxoplasmose, nous avons produit des anticorps monoclonaux de cet isotype chez la souris.

Les animaux utilisés pour l'hybridation cellulaire ont été sélectionnés après analyse de leur réponse anticorps IgA sérique vis-à-vis d'un extrait antigénique total de *T. gondii*. La rate ou les ganglions des animaux présentant la plus forte réponse anticorps IgA ont alors été prélevés. Par contre, les plaques de Peyer de toutes les souris initialement infectées ou immunisées ont été prélevées et ont été utilisées pour l'hybridation cellulaire.

#### **III.1. Protocoles d'hybridation cellulaire et sélection des clones producteurs d'IgA**

Le nombre de puits ayant présenté des clones viables au bout de 2 mois environ a été très variable selon les expériences.

Les surnageants des différents hybridomes ont été analysés par une technique radioimmunologique détectant les IgA et sélectionnés vis-à-vis de l'extrait antigénique total de *T. gondii* sur la base d'une réponse de 2 à 3 fois supérieure à celle observée pour le témoin négatif SP<sub>2</sub>O (surnageant du myélome non sécrétant, utilisé pour l'hybridation cellulaire).

Le tableau 5 montre le pourcentage de clones IgA spécifiques sélectionnés au cours des différentes hybridations réalisées en fonction du type de protocole utilisé.

Aucune information n'étant alors disponible sur la manière d'obtenir un anticorps monoclonal IgA spécifique, nous avons choisi de réaliser dans un premier temps deux hybridations cellulaires à partir de souris infectées par voie orale (voie induisant un taux élevé d'IgA spécifiques, sériques et sécrétoires) et ceci à deux moments différents au

cours de l'infection, J18 et J32. Le 18<sup>ème</sup> jour d'infection correspond à l'augmentation du taux des anticorps IgA sériques chez la souris et le 32<sup>ème</sup> jour au maximum de cette réponse anticorps. Nous avons alors prélevé les cellules spléniques et ganglionnaires pour ces fusions.

En utilisant les hybridations cellulaires TG23 / TG25 (cellules ganglionnaires à J18 et J32) et TG24 / TG26 (cellules spléniques à J18 et J32), on peut constater qu'aucun clone spécifique producteur d'IgA n'a été détecté lors des hybridations avec les cellules spléniques (Tableau 5A). Un faible pourcentage (maximum 3%) a néanmoins été obtenu dans le cas des hybridations de cellules ganglionnaires. Nous avons aussi pu remarquer que les clones hybrides produisant des IgA faisaient souvent partie des derniers clones qui proliféraient, les premiers étant souvent constitués par des hybridomes produisant des IgG et des IgM, ce qui semblerait indiquer que la croissance des clones producteurs d'IgA est plus lente que celle des clones producteurs d'anticorps d'isotypes différents.

Les faibles pourcentages obtenus dans les premiers protocoles nous a conduit à élaborer d'autres protocoles d'optimisation de cette réponse. Une substance adjuvante (la toxine cholérique) ainsi qu'une substance immunostimulante (le MDP, muramyl dipeptide), qui permettent d'augmenter les réponses anticorps IgA sériques et sécrétoires lorsqu'elles sont administrées par voie orale, ont ainsi été utilisées lors de l'infection ou de l'immunisation. Des animaux ont ainsi été immunisés par voie orale, soit avec un extrait antigénique total du parasite, soit avec les antigènes ES (hybridations cellulaires TG29 et TG30) ou infectés par voie orale avec des kystes de la souche 76K (hybridation cellulaire TG31), en présence de toxine cholérique.

Enfin, nous avons réalisé un dernier protocole d'immunisation par voie sous-cutanée avec les antigènes ES, suivi d'une stimulation par voie orale par le MDP.

D'autre part, la rate et les ganglions ne semblant pas être les organes de choix pour favoriser l'obtention d'anticorps monoclonaux de cet isotype nous avons prélevé les plaques de Peyer, source importante de cellules précurseurs d'anticorps IgA.

En utilisant ces différents protocoles, nous avons constaté une augmentation du



pourcentage de clones produisant des IgA (spécifiques et non spécifiques). Bien que l'administration de la toxine cholérique ait provoqué dans certains groupes d'animaux une assez forte mortalité, ce qui a limité le nombre de plaques de Peyer disponibles pour l'hybridation cellulaire, les hybridations TG29 et TG30 ont conduit à l'obtention d'un plus grand nombre de clones hybrides sécrétant des IgA (entre 7 et 9% de clones producteurs d'IgA spécifiques)(Tableau 5B). Malheureusement, l'hybridation cellulaire TG31, correspondant à l'infection en présence de toxine cholérique n'a pas pu être pleinement exploitée en raison de la quantité limitée de cellules récupérées lors du prélèvement des organes.

Enfin, les premiers résultats obtenus lors de l'utilisation du MDP laissent présager un pourcentage de clones spécifiques beaucoup plus élevé que celui obtenu lors des hybridations précédentes (3 clones IgA spécifiques sur 7 analysés; Tableau 5C), ce qui valorise pleinement l'utilisation de cette substance comme immunostimulant des réponses anticorps IgA.

### **III.2. Analyse isotypique des différents clones positifs**

Afin de vérifier l'isotype des différents clones après clonage cellulaire, nous avons utilisé la technique d'immunodiffusion en gel (méthode d'OUCHTERLONY) (Figure 24). Un sérum de souris de référence (A) (Sigma) dont la concentration des différents isotypes d'anticorps est connue et un sérum de souris infectée par 300 kystes de la souche 76K (B) ont été utilisés comme témoins positifs. Le surnageant du myélome SP<sub>2</sub>O non sécrétant a été utilisé comme témoin négatif (C). L'isotype IgA d'un clone sécrétant des IgA monoclonales non spécifiques de *T. gondii* et produit par D. GREZEL dans le laboratoire a aussi été confirmé (D). Les différents isotypes d'anticorps ont été déposés dans le sens des aiguilles d'une montre comme suit: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM. Nous avons pu vérifier qu'après clonage cellulaire, nos clones produisaient effectivement toujours des IgA monoclonales et uniquement celles-ci.

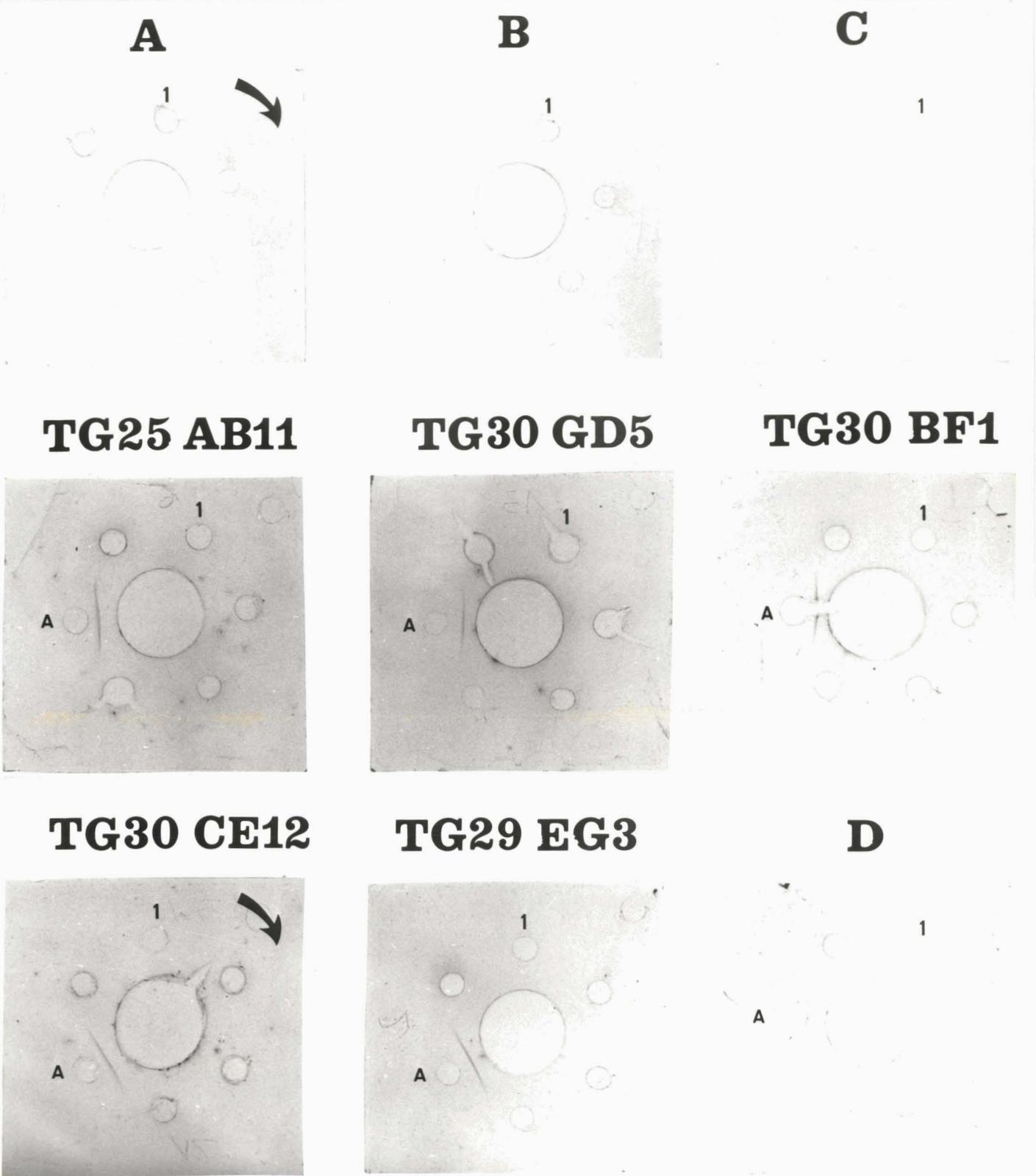


FIGURE 24

VERIFICATION DE L'ISOTYPE DES ANTICORPS PRODUITS LES  
DIFFERENTS CLONES POSITIFS

### **III.3. Spécificité antigénique des anticorps monoclonaux**

#### **III.3.a. Analyse par une technique radioimmunologique**

Après avoir sélectionné les clones producteurs d'anticorps IgA spécifiques sur un extrait antigénique total de *T. gondii*, ceux-ci sont évalués par la même technique vis-à-vis d'un extrait d'antigènes membranaires ("Chaps"), et d'un extrait antigénique soluble (S2).

Les témoins négatifs sont constitués par le matériel (surnageant de culture et liquide d'ascite) correspondant au myélome témoin SP<sub>2</sub>O et au clone producteur d'IgA irrelevante. Le témoin positif est constitué par un sérum de souris infectée par 300 kystes de la souche 76K par voie orale et dilué au 1/100. Les surnageants sont utilisés purs, les liquides d'ascites sont par contre dilués au 1/1000 et au 1/2000. Les résultats d'une expérience représentative sont présentés dans les tableaux 6 et 7 et sont exprimés en cpm.

Les résultats du tableau 6 démontrent que les différents surnageants des clones retenus sont tous nettement positifs vis-à-vis de l'extrait antigénique total. Néanmoins, une dilution au 1/10 des surnageants de culture entraîne généralement une moins bonne détection des anticorps IgA spécifiques. L'absence de réaction positive vis-à-vis d'un antigène irrelevant, l'antigène P28 de Schistosome, a également été vérifiée à titre de contrôle. D'autre part, l'étude de ces surnageants sur les extraits membranaires précise que l'anticorps monoclonal IgA TG25 AB11, négatif vis-à-vis de la fraction soluble, est dirigé contre une protéine membranaire du parasite. Les autres clones reconnaissent apparemment des épitopes d'antigènes présents dans les deux types d'extraits antigéniques.

Le tableau 7 résume les résultats obtenus avec les liquides d'ascites. Nous avons constaté que le liquide d'ascite correspondant au clone IgA irrelevante induit une réaction non spécifique de loin beaucoup plus importante que celle observée avec le témoin négatif SP<sub>2</sub>O, alors que le sérum de souris saine est sans conteste négatif et rejoint les valeurs du témoin SP<sub>2</sub>O. Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs impliquant, peut-être la nature

	Extrait total		Extrait membranaire		Extrait soluble	
	Pur	1/10	Pur	1/10	Pur	1/10
TG25 AB11	5380 5091	4427 3996	4660 4624	4599 5165	437 320	258 117
TG29 EG3	2041 1975	553 403	1399 1069	277 443	1387 1195	510 412
TG30 BF1	3847 3367	937 1033	2221 2203	2527 2641	2203 2419	2173 2467
TG30 GD5	2527 2355	1218 1076	1599 1506	510 589	1359 1629	400 739
TG30 CE12	1912 1746	492 571	824 649	553 343	1131 739	325 469
IgA irrelevante	333 383	210 250	401 444	203 210	530 444	348 301
SP20	31 43	105 175	68 145	217 233	31 97	85 229
Sérum d'infection 1/100	3037 2899		3148 3325		797 751	
Souris saine 1/100	74 117		145 157		175 180	

TABLEAU 6

ANALYSE DES SURNAGEANTS DE CULTURE VIS-A-VIS DES  
DIFFERENTS EXTRAITS ANTIGENIQUES DU TOXOPLASME PAR  
RADIOIMMUNOLOGIE

	Extrait total		Extrait membranaire		Extrait soluble	
	1/1000	1/2000	1/1000	1/2000	1/1000	1/2000
TG25 AB11	12547 12289	8269 7591	10255 8959	7339 7051	4903 4597	3475 3229
TG29 EG3	1627 1007	691 685	3099 3427	1921 1735	3265 2971	2005 1411
TG30 BF1	4488 4309	1891 1927	4593 4107	2275 2419	4728 4451	2478 2743
TG30 GD5	9481 9308	6087 6415	4963 5011	2496 2546	5155 4729	2927 3173
TG30 CE12	4199 4470	3373 3315	2619 2478	1445 1420	2226 2140	1273 1310
IgA irrelevante	2270 1579	2215 2137	2922 2830	1219 807	2270 2424	1501 1133
SP20	451 460	271 178	86 31	129 105	92 80	154 178
Sérum d'infection 1/100	3037 2899		3148 3325		797 751	
Souris saine 1/100	74 117		145 157		175 180	

TABLEAU 7

ANALYSE DES LIQUIDES D'ASCITES VIS-A-VIS DES DIFFERENTS  
EXTRAITS ANTIGENIQUES DU TOXOPLASME PAR  
RADIOIMMUNOLOGIE

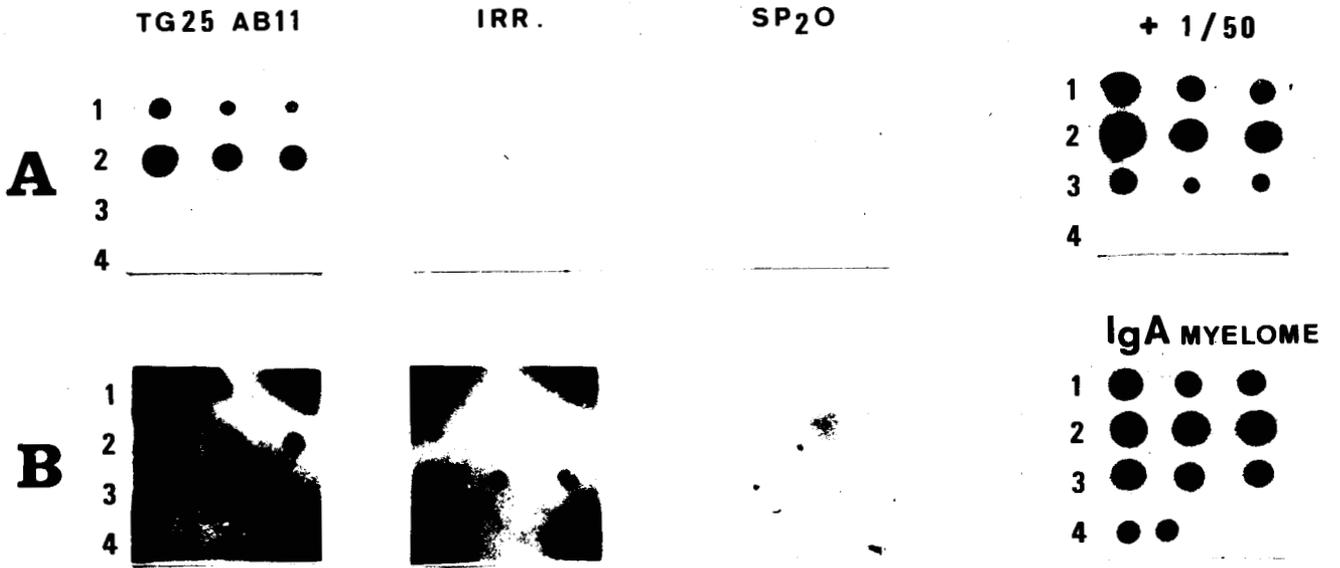
même des anticorps IgA qui se fixeraient de façon non spécifique par des interactions de type lectine. Les autres hypothèses seraient soit la possibilité de réactivités croisées entre des antigènes de parasites différents mais présentant néanmoins des épitopes communs, soit l'intervention d'autres facteurs présents dans les liquides d'ascites. Nous avons en effet pu constater que l'emploi d'une IgA myélomateuse purifiée commerciale k MOPC 315 non spécifique induisait une réponse intense sur les différentes fractions antigéniques du parasite, tandis que l'emploi d'une autre IgA myélomateuse (l MOPC 315) différente par la nature des chaînes légères, induisait une réaction moins importante (non illustré). Comme nous n'avons pas pu apporter une explication précise à ce phénomène, nous avons focalisé notre étude sur deux clones présentant des résultats sans équivoque avec les surnageants et les ascites, les clones TG25 AB11 et TG30 GD5. Cette observation est néanmoins importante car elle souligne la difficulté du choix d'un bon témoin négatif IgA considéré comme irrelevant .

### III.3.b. Immunoempreinte et électroimmunotransfert

Afin de visualiser la cible de la réponse anticorps IgA que nous avons détectée par la méthode radioimmunologique, nous avons employé les techniques d'immunoempreinte (Figure 25.I.) et d'immunotransfert (Figure 25.II).

Les surnageants (A) et les liquides d'ascites (B) des anticorps monoclonaux ont été analysés par immunoempreinte vis-à-vis de différents extraits antigéniques: l'extrait antigénique total (1), l'extrait membranaire (2), l'extrait soluble (3), et les antigènes d'excrétion-sécrétion (4). Les témoins négatifs sont constitués par l'IgA irrélèvante (irr.), et par le témoin SP<sub>2</sub>O. Les témoins positifs sont constitués par un sérum de souris infectée par 300 kystes de la souche 76K (au 1/50) comme précédemment et par l'IgA myélomateuse purifiée du commerce k MOPC 315 ayant démontré une réactivité non spécifique par la technique radioimmunologique.

# I. Immunoempreinte



# II. Immunotransfert

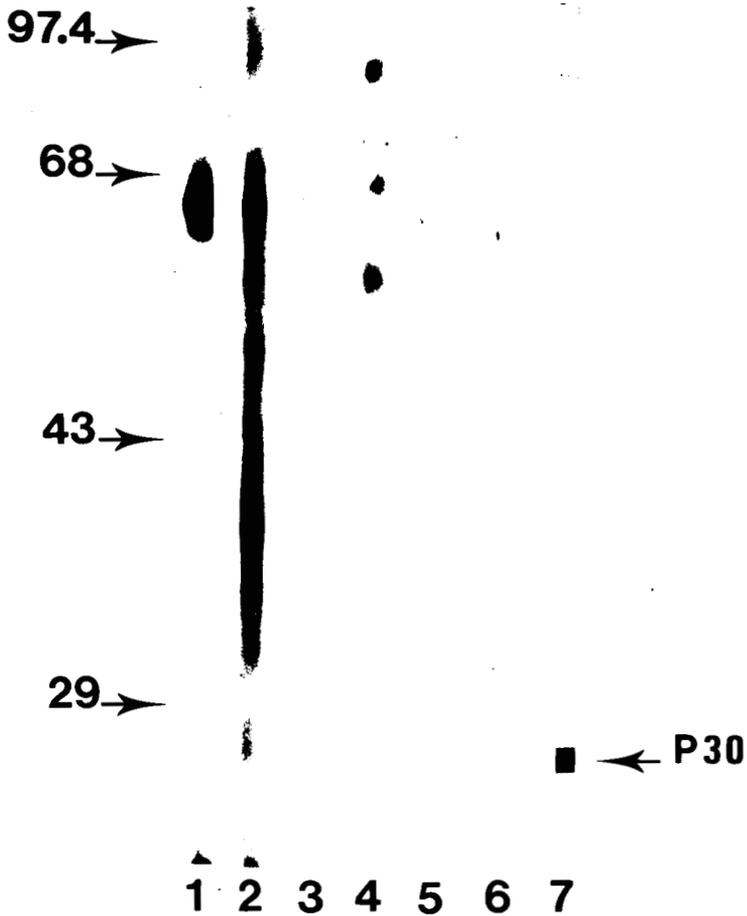


FIGURE 25

ANALYSE DES ANTICORPS MONOCLONAUX IgA PAR  
IMMUNOEMPRESANTE ET ELECTROIMMUNOTRANSFERT

Seuls le surnageant et le liquide d'ascite du clone IgA TG25 AB11 ont présenté une réponse claire dirigée contre l'extrait membranaire (Figure 25A) confirmant par là-même les premiers résultats obtenus lors de l'étude par la méthode radioimmunologique. Cependant, aucune réponse positive n'a été détectée avec les surnageants des autres clones (non illustré).

Le surnageant et le liquide d'ascite du clone TG25 AB11 ont alors été analysés après immunotransfert d'un extrait antigénique membranaire du parasite en conditions non réductrices. Cette méthode a permis de visualiser une bande à environ 60 kDa (Figure 25. II) avec le surnageant de culture (piste 1) et le liquide d'ascite (piste 2). La piste 3 correspond au liquide d'ascite SP<sub>2</sub>O négatif, la piste 4 correspond, par contre, à l'IgA myélomateuse  $\kappa$  MOPC 315 du commerce. Celle-ci révèle plusieurs bandes, confirmant la possibilité d'une interaction non spécifique de type lectine. Un autre témoin constitué par des IgA purifiées dirigées contre un virus murin (MMTV: mouse mammary tumor virus) n'a d'ailleurs révélé aucune bande (piste 6). La piste 7 montre la réaction obtenue avec l'anticorps monoclonal IgG (TG05-54) dirigé contre P30.

Il est à noter cependant que l'utilisation d'un gel en conditions réductrices semble entraîner une moins bonne reconnaissance des antigènes par les anticorps IgA (comme cela a été observé pour les IgA humaines) et, effectivement, il nous a été très difficile d'obtenir un résultat convainquant avec les différents surnageants de culture dans ces conditions.

Ces résultats suggèrent que l'anticorps monoclonal IgA TG25 AB11 reconnaît un épitope d'une molécule de poids moléculaire d'environ 60 kDa présente dans l'extrait membranaire du parasite, ou d'une molécule pouvant se dimériser à un poids moléculaire de 60 kDa. Comme il était connu que l'antigène majeur de surface P30 et l'antigène sécrété GP28,5 pouvaient se dimériser, nous avons émis l'hypothèse que cet anticorps monoclonal IgA pouvait être dirigé contre un épitope de l'une ou de l'autre de ces molécules.

### III.3.c. Techniques d'immunocapture IgA spécifiques d'antigènes

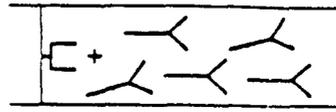
Afin de déterminer si l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal IgA TG25 AB11 pouvait être l'antigène P30, nous avons adapté au modèle souris le test d'immunocapture IgA anti-P30 mis au point par le Dr. A. DECOSTER dans le laboratoire pour l'analyse des sérums humains et utilisant l'anticorps monoclonal IgG TG05-54 (DECOSTER *et al.*, 1988). Le principe de cette méthode est schématisé dans la Figure 26. Parallèlement, nous avons adapté le même test d'immunocapture en utilisant cette fois-ci un anticorps monoclonal TG17-179 dirigé contre l'antigène de 28,5 kDa.

Bien qu'aucune information n'ait été jusqu'alors obtenue concernant les antigènes reconnus par les autres anticorps monoclonaux IgA, tous les surnageants de culture correspondant aux différents clones sélectionnés ont toutefois été analysés par cette technique.

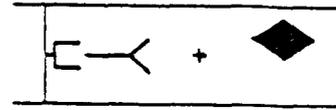
Les résultats obtenus lors d'une expérience représentative, par le test d'immunocapture IgA anti-P30, sont présentés dans le Tableau 8A. Les densités optiques présentées dans la colonne du témoin sérum correspondent aux valeurs obtenues en absence de tout antigène. Seul l'anticorps monoclonal IgA TG25 AB11 présente une réponse franchement positive. Il faut néanmoins souligner qu'un résultat positif dans ce test suggère que l'anticorps monoclonal IgA TG25 AB11 reconnaît un épitope différent de celui reconnu par l'anticorps monoclonal IgG TG05-54. Les résultats obtenus pour l'anticorps monoclonal TG29 EG3 sont cependant plus difficilement interprétables.

Etant donné que l'IgA myélomateuse que nous avons testée précédemment, réagissait vis-à-vis de l'antigène de toxoplasme, nous en avons utilisé une autre, l'IgA  $\lambda$  MOPC 315, dont la réactivité vis-à-vis de cet extrait antigénique était faible (non illustré). On peut néanmoins observer que dans ce test, les valeurs obtenues pour le surnageant négatif correspondant à l'IgA irrelevante et pour cette autre IgA myélomateuse sont relativement élevées ce qui semble à nouveau indiquer une fixation non spécifique de l'antigène. Ceci n'est pas dû à un problème de concentration des surnageants par rapport à l'IgA commerciale purifiée  $\lambda$  MOPC 315, car celle-ci a été diluée afin d'obtenir des

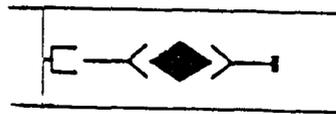
A. Première incubation des surnageants 1 heure à 40°C en incubateur sec



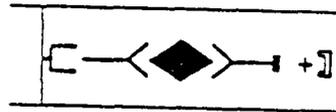
B. Seconde incubation en présence de l'antigène 1 heure à 40°C en incubateur sec



C. Troisième incubation en présence du conjugué anti-P30 ou P28,5 marqué (\*)



D. Développement de la réaction 30 minutes et lecture de la densité optique à 492nm.



#### LEGENDE

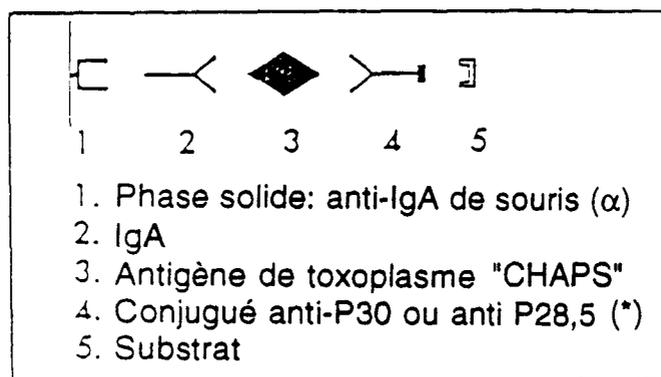


FIGURE 26

PRINCIPE DU TEST D'IMMUNOCAPTURE IgA CHEZ LA SOURIS

Surnageant ou échantillon	DO de la réaction	DO du témoin sérum	DO effective
TG25 AB11	2,991	0,353	2,638
TG29 EG3	2,032	1,021	1,011
TG30 BF1	0,836	0,619	0,217
TG30 GD5	0,838	0,520	0,318
TG30 CE12	0,791	0,329	0,462
IgA irrelevante	1,019	0,309	0,710
SP20	1,311	1,002	0,309
IgA de myélome λ MOPC 315	1,000	0,284	0,716
Sérum d'infection 1/100	> 3	0,389	> 3
Souris saine 1/100	1,052	0,544	0,508

A. TEST D'IMMUNOCAPTURE IgA ANTI P30 CHEZ LA SOURIS

Surnageant ou échantillon	DO de la réaction	DO du témoin sérum	DO effective
TG25 AB11	0,439	0,103	0,336
IgA irrelevante	0,418	0,097	0,321
SP20	0,563	0,107	0,456
IgA de myélome λ MOPC 315	0,726	0,132	0,594

B. TEST D'IMMUNOCAPTURE IgA ANTI-P28,5 CHEZ LA SOURIS

**TABLEAU 8**

**TESTS D'IMMUNOCAPTURE IgA SPECIFIQUES D'ANTIGENES**

concentrations en anticorps IgA comparables à celles observées dans les différents surnageants de culture. Il est possible qu'un épitope voisin de celui reconnu par ces anticorps IgA puisse être présenté par l'antigène P30 dans cette réaction et permettre ainsi la fixation de cet antigène, où que ces anticorps IgA possèdent des résidus oligosaccharidiques capables de se fixer à certains sites de l'antigène P30, puisque ce phénomène ne s'observe pas avec d'autres anticorps monoclonaux IgA étudiés dans les mêmes conditions. La même méthode d'immunocapture IgA a été adaptée à la détection d'anticorps dirigés contre l'antigène GP28,5 afin de vérifier la spécificité de reconnaissance de l'anticorps monoclonal TG25 AB11. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8B. Aucune réactivité n'a pu être détectée pour l'anticorps monoclonal TG25 AB11, ce qui confirme sa reconnaissance de l'antigène de surface P30.

#### III.3.d. Réactions d'inhibition par les peptides de la molécule P30

Les résultats de l'analyse précédente ayant confirmé que l'anticorps monoclonal TG25 AB11 était dirigé contre l'antigène P30, nous avons recherché si l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal figurait parmi les peptides de P30, synthétisés par l'équipe du Pr. A. TARTAR, dont nous disposons. Ces différents peptides ont été utilisés non couplés à une protéine porteuse ("carrier") et sont appelés 48-67, 82-102, 213-230, 237-256, et 279-295 selon la séquence décrite par BURG *et al.*, en 1988. Ces différents peptides ainsi qu'un peptide témoin synthétisé à partir de la structure d'un antigène de *Schistosoma mansoni*, ont été préincubés avec 0,1ml des surnageants des différents clones producteurs d'IgA, TG25 AB11, TG30 GD5, et l'IgA irrelevante. Différentes quantités de peptides 10, 5, 2.5, et 1 µg ont été utilisées. L'inhibition vis-à-vis d'un extrait antigénique membranaire du parasite a été évaluée en présence de ce mélange anticorps-peptide. Le tableau 9 présente les résultats obtenus par radioimmunologie avec une quantité de 10µg de peptide par essai lors d'une expérience représentative.

Etant donné la difficulté de définir un témoin positif de la réaction, nous avons préincubé le surnageant TG25 AB11 avec le même extrait antigénique membranaire que celui

Peptides	Surnageant TG25 AB11 cpm $\pm\sigma$	Surnageant TG30 GD5 cpm $\pm\sigma$	Surnageant IgA irrelevante cpm $\pm\sigma$
Aucun	3688 $\pm$ 280	2259 $\pm$ 99	176 $\pm$ 34
48-67	3962 $\pm$ 261	2170 $\pm$ 60	99 $\pm$ 39
82-102	4187 $\pm$ 55	2160 $\pm$ 235	226 $\pm$ 10
213-230	4012 $\pm$ 335	1916 $\pm$ 134	224 $\pm$ 4
237-256	3916 $\pm$ 338	2392 $\pm$ 78	195 $\pm$ 2
279-295	4743 $\pm$ 119	2277 $\pm$ 317	198 $\pm$ 9
Peptide irr	3833 $\pm$ 322	2044 $\pm$ 150	133 $\pm$ 13

TABLEAU 9

REACTIONS D'INHIBITION PAR LES DIFFERENTS PEPTIDES DE LA  
MOLECULE P30

adsorbé sur la plaque. Dans des conditions, en utilisant 10µg d'antigène par essai, nous avons pu obtenir une inhibition vis-à-vis de ce même antigène de 60 à 80% (résultat non présenté). A titre de comparaison, nous avons aussi analysé le surnageant du clone TG30 GD5 qui ne semble pas dirigé contre l'antigène P30 dans le test d'immunocapture précédent.

Aucune inhibition n'ayant pu être observée (quelle que soit la quantité de peptide utilisée) avec le surnageant du clone TG25 AB11 dirigé contre P30, ceci suggère que, soit l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal ne figure pas parmi ces peptides, soit l'épitope reconnu est un épitope conformationnel, soit l'affinité de cet anticorps pour l'antigène natif est beaucoup plus importante que l'affinité pour le peptide.

#### **III.4. Evaluation de l'activité biologique des anticorps monoclonaux**

Après ces différentes tentatives de caractérisation de nos anticorps monoclonaux IgA, nous avons essayé d'évaluer leur rôle dans l'immunité au cours de la toxoplasmose, grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo*.

##### **III.4.a. Test de lyse dépendante du complément "Dye test"**

Bien que les anticorps IgA soient connus pour être de faibles activateurs du complément (uniquement par la voie alterne), nous avons néanmoins testé les potentialités cytotoxiques intrinsèques des différents anticorps monoclonaux IgA produits en collaboration avec le Dr. J.E. SMITH. Les premiers résultats obtenus avec les différents liquides d'ascites des clones producteurs d'IgA sont présentés dans le tableau 10, et démontrent l'absence de lyse complément-dépendante des parasites avec une dilution au 1/80. Néanmoins des dilutions plus faibles que celles utilisées ici seraient nécessaires pour vérifier effectivement l'absence totale de lyse par les anticorps IgA. A titre de comparaison, l'anticorps monoclonal IgG TG05-54 anti-P30 est positif de 1/80 jusqu'au 1/25600 et l'anticorps monoclonal IgG 17-179 est positif au 1/80.

### III.4.b. Transfert passif chez le rat nude

Les premières expériences de notre laboratoire ont démontré l'intérêt du modèle expérimental du rat Nude lors de l'étude par transfert passif du rôle protecteur d'un anticorps monoclonal TG05-54 dirigé contre P30 (SANTORO *et al.*, 1985) ou de sérums de rats euthymiques immunisés par les antigènes ES (DARCY *et al.*, 1988). C'est pourquoi, le rôle de deux anticorps monoclonaux IgA au cours de l'infection a été étudié chez cet animal (Figure 27). Le transfert passif par voie intraveineuse de 1,5ml de liquide d'ascite correspondant à l'anticorps monoclonal IgG TG05-54 dirigé contre P30 prolonge notablement la survie des rats infectés par  $5 \times 10^4$  tachyzoïtes de la souche RH (mortalité en 25-31 jours), contrairement aux rats témoins qui meurent entre 15 et 21 jours.

Afin de pouvoir comparer les effets produits par le transfert passif des différents liquides d'ascites IgA (correspondant aux clones TG25 AB11, TG30 GD5, et au clone producteur de l'IgA irrelevante), nous avons suivi le même protocole; les liquides d'ascites ont été dosés en IgA totales et la même quantité d'IgA (soit environ 28,5 mg d'IgA totales) a été transférée par voie intraveineuse pour chaque rat de ces différents groupes.

Alors que les rats contrôle meurent entre 15 et 21 jours après l'infection, les rats ayant reçu le liquide d'ascite IgG anti-P30 utilisé comme témoin positif sont protégés à 100% au 24<sup>ème</sup> jour d'infection et meurent ensuite entre le 25<sup>ème</sup> et le 31<sup>ème</sup> jour après l'infection. Les rats ayant reçu les liquides d'ascites IgA TG25 AB11 et TG30 GD5 ne sont pas protégés et meurent le 23<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour respectivement. Curieusement, les rats ayant reçu le liquide d'ascite IgA TG25 AB11 anti-P30 commencent à mourir dès le 12<sup>ème</sup> jour après l'infection, contrairement aux rats témoins dont certains commencent à mourir à partir du 16<sup>ème</sup> jour. Il est à noter que les rats ayant reçu le liquide d'ascite correspondant à l'IgA irrelevante meurent également un peu plus tôt (J14) que les témoins d'infection.

Si l'on compare les résultats obtenus après transfert passif des deux anticorps monoclonaux dirigés contre P30, l'anticorps monoclonal IgG induit une protection transitoire, contrairement à celui d'isotype IgA qui semble exercer un effet négatif sur la

	1/80
TG25 AB11	-
TG 29 EG3	-
TG30 BF1	-
TG30 GD5	-
TG30 CE12	-
SP2O	-
IgA irrelevante	-
IgA de myélome	-
IgG anti P30	+
IgG anti 28,5	+

TABLEAU 10

TEST DE LYSE-DEPENDANTE DU COMPLEMENT  
(DYE-TEST)

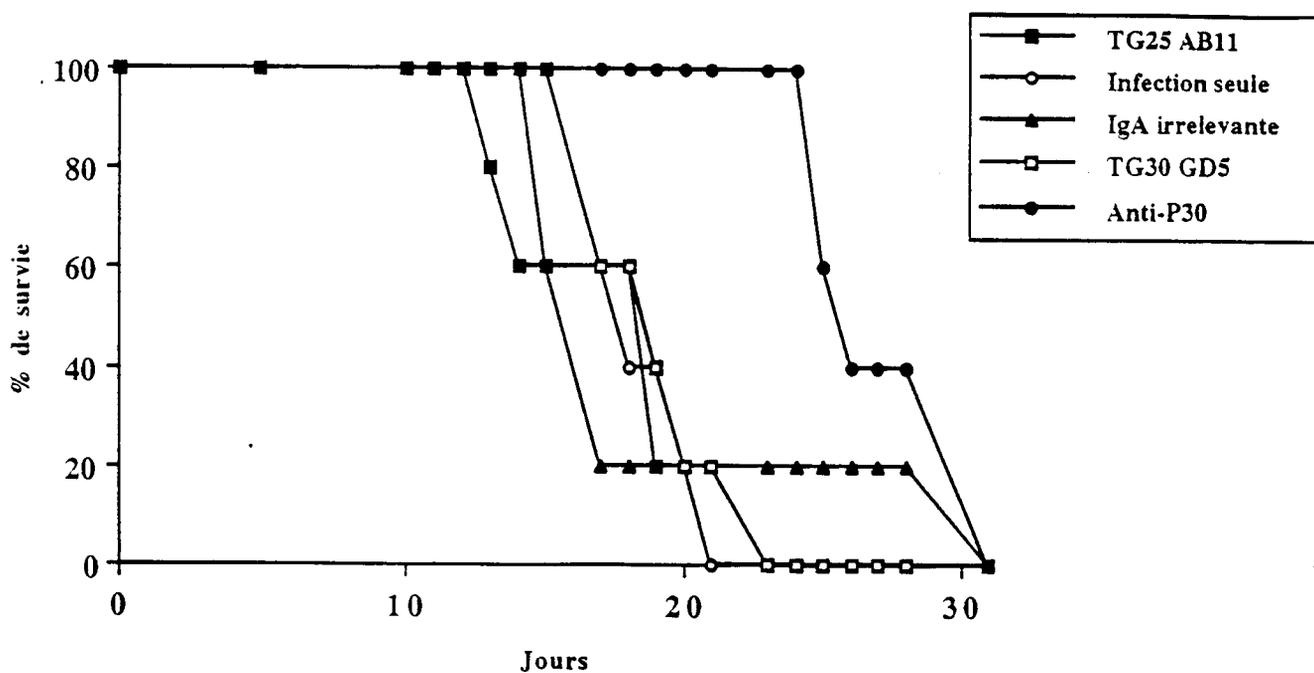


FIGURE 27

TRANSFERT PASSIF DES ANTICORPS MONOCLONAUX IgA CHEZ LE  
RAT NUDE

protection. Cependant, les épitopes reconnus par les deux anticorps monoclonaux étant différents, on ne peut pas exclure la possibilité du comportement différent d'un anticorps monoclonal IgA dirigé contre le même épitope que celui de l'anticorps monoclonal IgG.

#### III.4.c. Transfert passif chez la souris

Les résultats obtenus dans ce modèle, où l'infection est réalisée par voie orale ne sont pas illustrés car ceux-ci sont similaires à ceux décrits pour le modèle du rat "Nude". Les mêmes liquides d'ascites que ceux cités ci-dessus ont été transférés par voie intraveineuse chez la souris OF1 (0,2ml soit 3,8 mg d'anticorps IgA totales) un jour avant l'infection orale par 1200 kystes de la souche 76K. Les résultats obtenus ont montré que les souris témoins seulement

infectées meurent de J7 à J12 post-infection. Par contre 50% des souris ayant reçu l'ascite IgG anti-P30 (0,2ml) sont protégées plus de 20 jours après l'infection. Les souris ayant reçu les liquides d'ascites IgA TG25 AB11 et TG30 GD5 meurent entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour après l'infection, soit également plus précocément que les témoins d'infection.

**Ainsi**, dans nos conditions expérimentales, et d'après les résultats obtenus par transfert passif, il semble que cet isotype n'exerce pas de rôle protecteur, mais jouerait peut-être un rôle néfaste au cours de l'infection. Néanmoins, ceci devrait être confirmé en modifiant certains paramètres, notamment le moment de l'infection et la dose d'anticorps injectée.

#### III.4. d. Réalisation de tumeurs sous-cutanées ("backpack") chez la souris

Afin de pouvoir induire des IgA sécrétoires de façon continue au niveau de l'intestin, (grâce à la synthèse d'IgA par les tumeurs et au transport de ces anticorps à travers les cellules épithéliales de l'intestin), des tumeurs sous-cutanées ont été réalisées par injection de cellules hybrides sur le dos des souris de différents groupes.

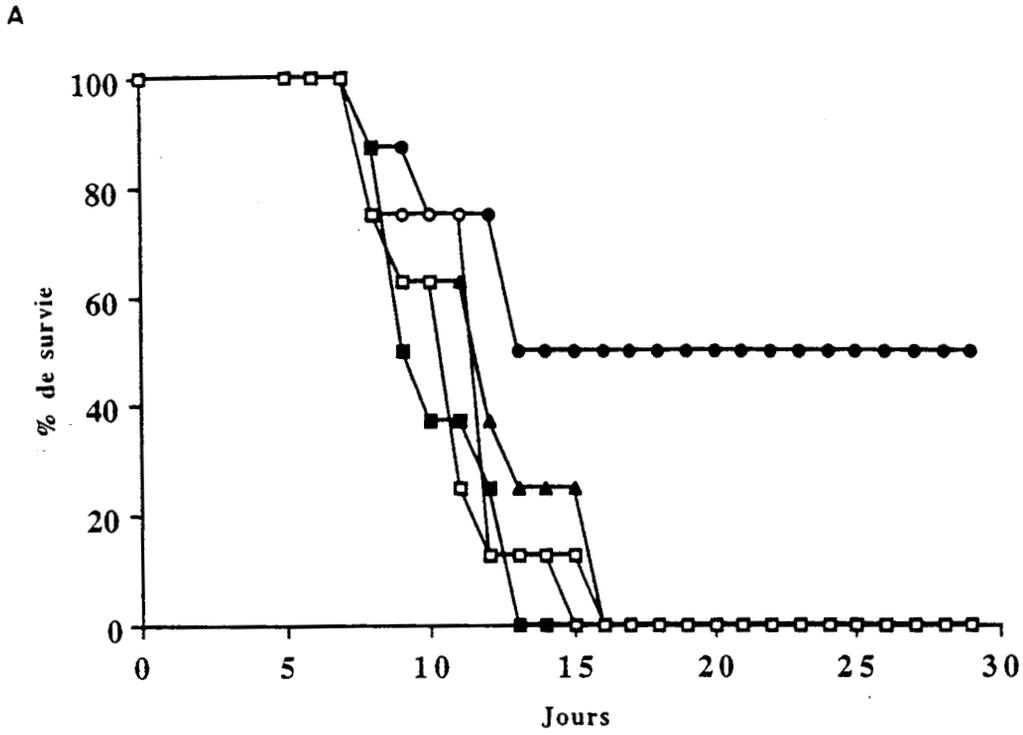
Les IgA sériques peuvent être détectées dès la troisième semaine après l'injection de cellules hybrides. Comme on ne connaissait pas le meilleur moment pour réaliser

l'infection et que les souris meurent de leur tumeur après 42 jours, deux protocoles d'infection au 7<sup>ème</sup> et au 21<sup>ème</sup> jour après l'induction de la tumeur ont été réalisés (Figure 28A et B, respectivement).

Des lots de 10 souris ont été initialement utilisés, mais étant donné la très grande hétérogénéité individuelle concernant l'évolution des tumeurs (plus ou moins grosses ou plus ou moins nécrosées), seules 8 souris de chaque lot ont été infectées afin de maintenir une certaine homogénéité.

Dans le premier protocole (28A, infection à 7 jours), 50% des souris ayant reçu l'anticorps monoclonal IgG anti-P30 (TG05-54) survivaient plus de 30 jours après l'infection. Dans une période comprise entre J7 et J16 post-infection, les autres souris sont toutes mortes, quel que soit le liquide d'ascite IgA transféré. Il est néanmoins possible que la quantité d'IgA produite par la tumeur au moment de l'infection ne soit pas suffisante pour provoquer un effet très net. D'autre part, on ne connaît pas le stade de l'infection où ces anticorps sont susceptibles d'intervenir.

Dans le second protocole (28B, infection à 21 jours), le liquide d'ascite IgG anti-P30 protège encore 62,5% des souris plus de 30 jours après l'infection. Les témoins d'infection meurent à partir de J9. Dans ce protocole, les souris ayant reçu les liquides d'ascites IgA spécifiques et irrelevant meurent plus tôt que les souris témoins. Ainsi, d'après les résultats obtenus, les deux anticorps monoclonaux IgA spécifiques ne reconnaissent pas dans ces conditions un épitope impliqué pour la protection des souris, cet épitope pouvant lui même être bloquant. Néanmoins, il est possible que l'effet observé soit dû à l'isotype, ou à la combinaison des deux (épitope et isotype), puisque même le liquide d'ascite IgA irrelevant provoque une mortalité précoce des souris.



LEGENDE

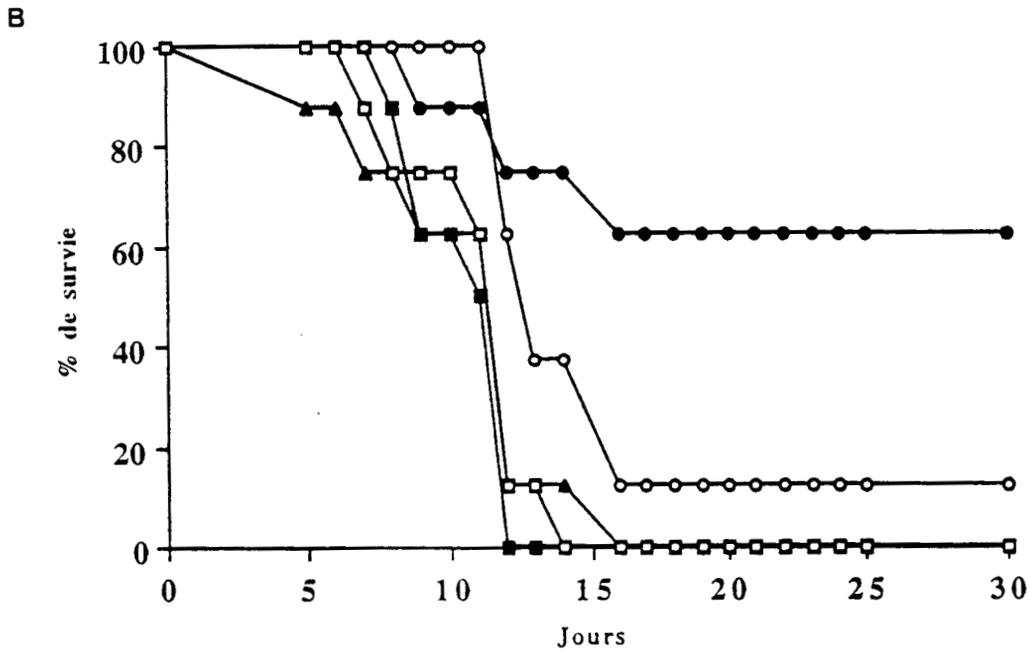
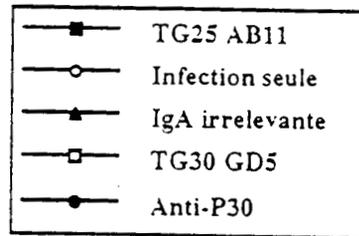


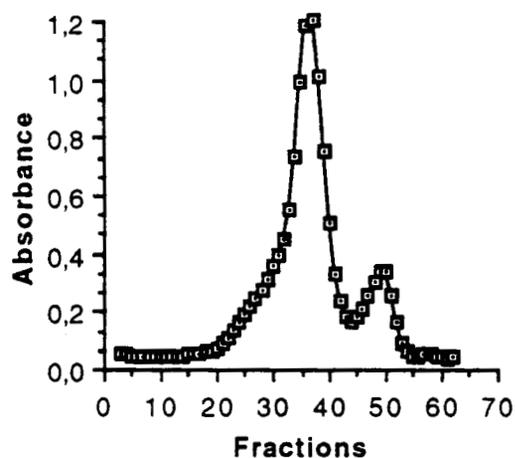
FIGURE 28

ROLE DES ANTICORPS MONOCLONAUX IgA CHEZ LA SOURIS  
(TECHNIQUE DU "BACKPACK")

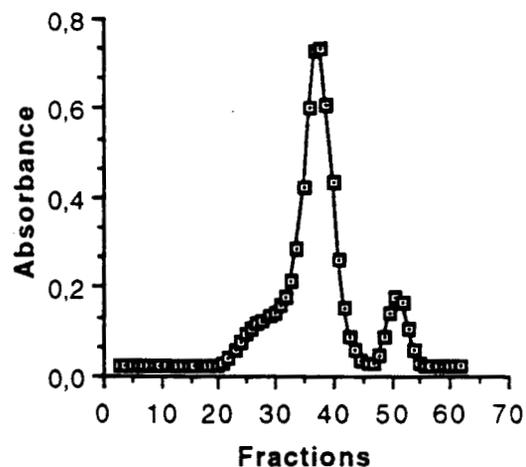
#### **IV. PURIFICATION DES ANTICORPS IgA (FORMES DIMERIQUES)**

Afin de pouvoir étudier plus finement l'activité biologique des différents anticorps monoclonaux produits, et de pouvoir éliminer toute interaction éventuelle de facteurs non spécifiques des liquides d'ascites, nous avons purifié, en collaboration avec Odile POULAIN dans le laboratoire, ces anticorps monoclonaux par une technique de gel filtration. L'analyse préalable des surnageants et des ascites sur gel de polyacrylamide nous a permis de constater que ceux-ci contenaient des formes moléculaires correspondant à des IgA dimériques et des IgA monomériques (non illustré). Il est difficile, à partir des liquides d'ascites, de séparer les formes IgA monomériques produites des IgG monomériques de la souris puisqu'elles possèdent un poids moléculaire voisin (160 kDa). Cependant, les formes dimériques des IgA (environ 320 kDa) peuvent être purifiées sur une colonne de Sépharose 4B. Ces formes possèdent de plus un intérêt non négligeable, puisqu'elles sont impliquées dans le transport de la pièce sécrétoire. Ainsi ces IgA dimériques pourraient être utilisées dans l'avenir dans un système *in vitro* de transport de la pièce sécrétoire afin d'obtenir des IgA sécrétoires. Le liquide d'ascite IgA TG25 AB11 et le liquide d'ascite témoin SP<sub>2</sub>O ont été purifiés sur la colonne de sépharose 4B dans les mêmes conditions. Les résultats sont présentés sur les Figures 29 et 30.

La détection de protéines dans les différentes fractions a été réalisée par la lecture de la densité optique à 280nm (Figure 29). Les deux ascites révèlent un profil protéique à peu près superposable. Cependant, le dosage en IgA totales des différentes fractions et l'étude par radioimmunologie de leur spécificité vis-à-vis d'un extrait total antigénique du toxoplasme révèle la présence d'IgA spécifiques en quantités importante dans les fractions 19 à 33, les fractions 23 à 27 en étant d'ailleurs particulièrement enrichies. Les fractions 19 à 27 sont pures, comme le montre la Figure 30 et contiennent les IgA dimériques de haut poids moléculaire. Les fractions suivantes possèdent également des IgA correspondant essentiellement aux formes monomériques (Fractions 29 à 41), les IgG de la souris et une partie non négligeable d'albumine. Il est à noter que chez la souris BALB/c



Ascite SP20

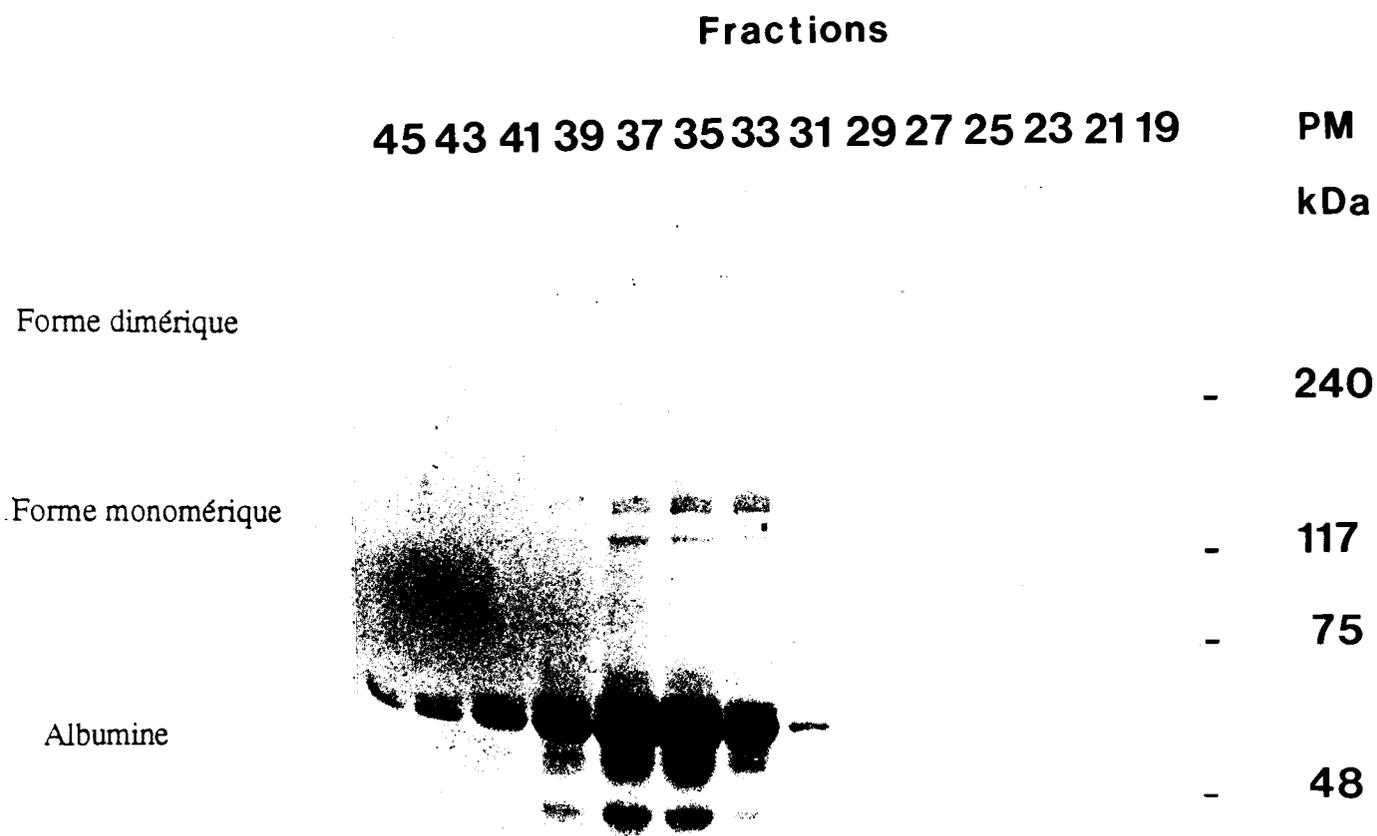


Ascite TG25 AB11

N° de la fraction	IgA spécifiques en cpm		IgA totales en µg/ml	
	TG25 AB11	SP20	TG25 AB11	SP20
17	ND	90	ND	0,02
19	6011	355	2,4	0,09
21	8643	456	7,6	0,28
23	9980	584	12	0,38
25	10500	763	38	0,86
27	10005	649	47	1,00
29	6379	757	56	0,85
31	3682	745	94	0,82
33	1795	353	84	0,80
35	761	173	28	0,42
37	527	35	4,6	0,10
39	493	124	1,6	0,04
41	468	79	0,64	traces
43	456	100	0,60	traces
45	352	145	0,44	traces

FIGURE 29

PURIFICATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX IgA ET ANALYSE  
DES DIFFERENTES FRACTIONS



**FIGURE 30**

**PROFIL SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE DES DIFFERENTES  
FRACTIONS DE PURIFICATION DU LIQUIDE D'ASCITE IgA TG25**

**AB11**

on peut obtenir des dimères de chaînes lourdes puisqu'il n'y a pas de liaisons par ponts disulfure entre les chaînes lourdes et légères contrairement à celles produites chez la souris NZB (WARNER et MARCHALONIS, 1975). Les dernières fractions ne contiennent plus d'IgA monomériques et dimériques détectables et correspondent uniquement à des fractions riches en albumine (41 à 45).

Les différentes fractions de l'ascite SP<sub>2</sub>O témoin, ont également été dosées en IgA totales et l'absence de réactivité vis-à-vis de l'antigène de toxoplasme a été contrôlée. Le maximum d'IgA totales est retrouvé dans les fractions 25 à 33, avec un maximum de 1µg/ml pour la fraction 27. Ces anticorps correspondent aux immunoglobulines de la souris.

En conclusion, par cette méthode, il est possible d'obtenir des quantités purifiées d'IgA dimériques, qui permettraient dans l'avenir des études *in vitro* et *in vivo* plus aisées et plus reproductibles.

## **V. ETUDE DU ROLE DE DIFFERENTS EPITOPES DE L'ANTIGENE P30 AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTALE A L'AIDE DE PEPTIDES DE SYNTHESE**

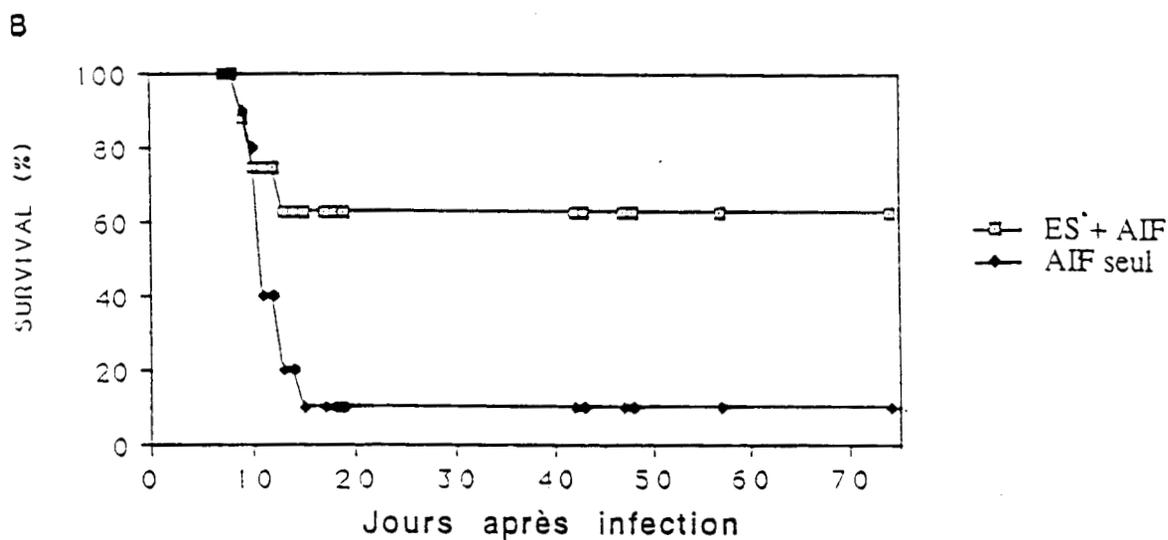
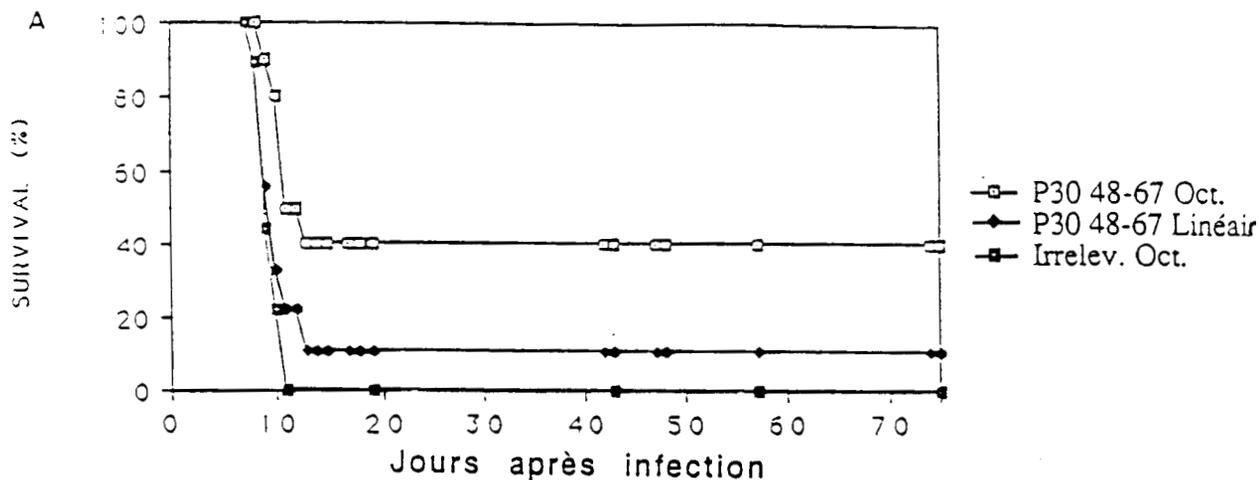
Nous avons ainsi démontré qu'une des cibles majeures de la réponse anticorps d'isotype IgA est l'antigène P30. Sachant que P30 est capable d'activer des lymphocytes T de patients infectés, et que la réponse anticorps d'isotype IgA est fortement régulée par les lymphocytes T, nous avons suivi deux approches complémentaires nous permettant de définir certains épitopes de l'antigène P30 pouvant être impliqués dans l'immunité.

La première approche a concerné l'étude particulière du peptide 48-67 (peptide N-terminal de l'antigène P30) et de sa construction octamérique dont la séquence en acides aminés avait été établie par l'équipe du professeur TARTAR avant la publication de la séquence du gène de P30 (BURG *et al.*, 1988). Ce peptide constitue le peptide N-terminal puisque lors de la maturation le peptide signal est clivé ce qui place la sérine 48 en position terminale.

A partir de la séquence génomique de P30, d'autres peptides ont ensuite été synthétisés et ont permis une seconde approche concernant l'étude des épitopes T de cette molécule reconnus au cours d'une infection du rat par voie orale.

### **V.1. Etude particulière du peptide 48-67 de l'antigène P30**

Le rôle du peptide 48-67 a été étudié dans le modèle d'infection de la souris OF1 par 1200 kystes de la souche 76K par voie orale. Dans ce modèle, le rôle protecteur des antigènes d'excrétion-sécrétion au cours de l'infection avait été préalablement démontré après immunisation par voie sous-cutanée avec ces antigènes. Les souris OF1 ont été immunisées soit par 25 µg de peptide 48-67 sous forme linéaire, soit par 25 µg de la construction octamérique du même peptide, en présence d'adjuvant incomplet de FREUND, puis infectées selon le protocole décrit ci-dessus (Figure 31A). Les témoins négatifs sont constitués par des souris immunisées avec une construction octamérique



RAT

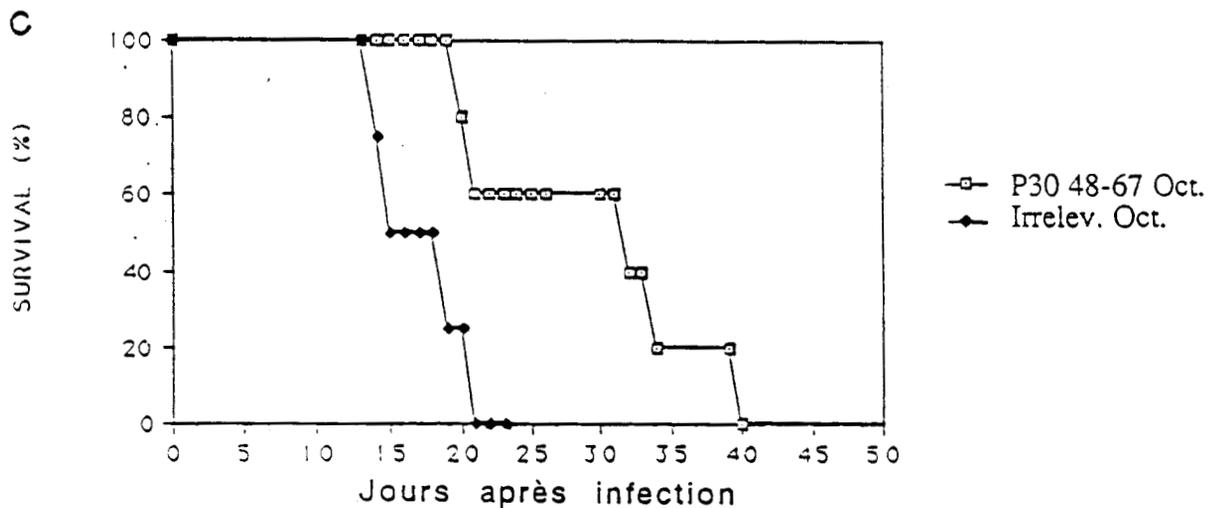


FIGURE 31

**ROLE PROTECTEUR DE LA CONSTRUCTION OCTAMERIQUE DU PEPTIDE N-TERMINAL DE P30 CHEZ LA SOURIS ET LE RAT NUDE**

d'un peptide irrelevante. Aucune protection n'a été obtenue avec le peptide 48-67 sous forme linéaire puisque la mort de l'ensemble des souris est observée dans les 11 jours qui suivent l'infection. Par contre, 40% de protection ont été obtenus chez les souris immunisées avec la construction octamérique de ce même peptide. Ces souris survivent plus de 75 jours après l'infection. Une deuxième expérience similaire a confirmé ce résultat.

A titre de témoin positif de protection, l'immunisation de souris par voie sous-cutanée par les antigènes excrétés-sécrétés en présence d'adjuvant incomplet de FREUND a permis d'obtenir, dans cette expérience, la protection habituelle (67,5% ) (Figure 31B).

La Figure 31C présente les résultats obtenus lors du transfert passif chez le rat Nude de cellules T ganglionnaires spécifiques provenant de rats Fischer immunisés par la construction octamérique du peptide 48-67. Le transfert de  $5 \times 10^4$  cellules spécifiques un jour avant l'infection par  $5 \times 10^4$  tachyzoïtes de la souche RH prolonge notablement la survie des rats Nude, puisque certains ont survécu jusqu'au 40<sup>ème</sup> jour après l'infection, contrairement aux rats ayant reçu des cellules T spécifiques de la construction octamérique irrelevante (100% de mortalité dès le 21<sup>ème</sup> jour après l'infection).

La réponse anticorps IgG des sérums de rats et de souris immunisés par les deux formes du peptide 48-67 a été étudiée par une méthode E.L.I.S.A vis-à-vis de la forme linéaire et de la forme octamérique. La Figure 32A présente les résultats obtenus avec ces différents sérums d'immunisation. Les résultats démontrent la présence d'une forte réponse anticorps IgG vis-à-vis de ces peptides dans les sérums de rats et de souris immunisés quel que soit l'immunogène utilisé. Par contre, les sérums de rats et de souris immunisés par un octamère irrelevante ne présentent pas d'anticorps IgG spécifiques du peptide 48-67. L'étude des différents sérums a été complétée par leur analyse en électroimmunotransfert vis-à-vis d'un extrait antigénique total de toxoplasme. Le gel a été réalisé en conditions non réductrices (Figure 32B). L'anticorps monoclonal IgG (TG05-54) reconnaissant l'antigène P30 a été utilisé comme contrôle (piste 6). Les sérums de souris immunisées avec la construction octamérique du peptide N-terminal 48-67 reconnaissent fortement

A

	Antigène utilisé pour l'immunisation	réponse vis à vis du peptide 48-67 forme linéaire	réponse vis à vis de la construction octamérique 48-67
Sérums de souris	P30 48-67 Oct.	3,24	3,09
	P30 48-67 linéaire	2,99	3,11
	Oct. Irrelevant	0,21	0,05
Sérums de rats	P30 48-67 Oct.	3,14	2,66
	Oct. Irrelevant	0,32	0,03

B

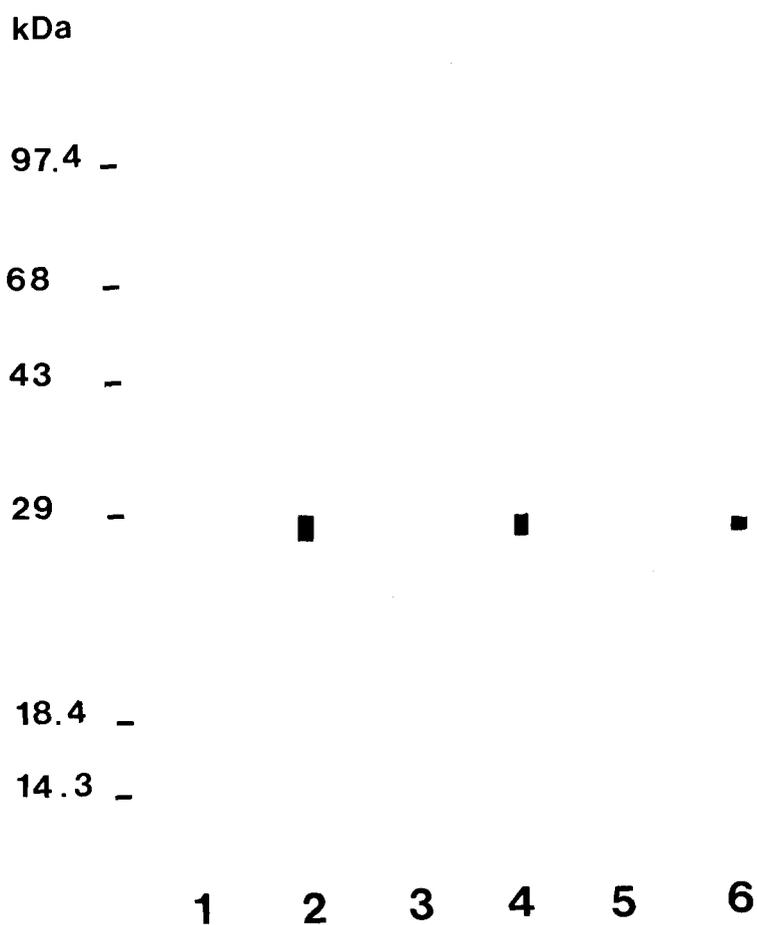


FIGURE 32

ANALYSE DES DIFFERENTS SERUMS D'IMMUNISATION CHEZ LE  
RAT ET LA SOURIS

l'antigène de 30 kDa (piste 2) contrairement aux souris immunisées avec la construction octamérique irrelevante (piste 1). Les sérums de souris immunisées avec le peptide linéaire 48-67 reconnaissent beaucoup plus faiblement l'antigène P30 (piste 3), bien qu'une forte réponse soit observée en E.L.I.S.A. contre le peptide. Les sérums de rats immunisés avec la construction octamérique du peptide 48-67 reconnaissent également fortement l'antigène P30 (piste 4) contrairement aux sérums de rats immunisés par la construction octamérique irrelevante (piste 5).

## V.2. Etude de la réponse proliférative des lymphocytes T au cours d'une infection par voie orale

Des rats Fischer (hôtes résistants à l'infection par *T. gondii* ont été infectés par 1200 kystes de la souche 76K par voie orale. La réponse proliférative T de ces rats a été étudiée vis-à-vis de différents peptides non couplés de l'antigène P30 (NC1:48-67, NC2:82-102, NC3:213-230, NC4:238-256, NC5:279-295, d'une construction octamérique du peptide N-terminal 48-67: Oct., et d'une construction octamérique irrelevante: Oct.irr).

La Figure 33 présente les résultats obtenus lors de la restimulation de  $5 \times 10^5$  cellules T ganglionnaires en présence de  $10^6$  cellules présentatrices d'antigène d'origine thymique, par ces différents peptides, à J8, J15, J29, et J36 après l'infection expérimentale. Les expériences réalisées avec deux concentrations de peptides (25 et 12,5 µg/ml), correspondant à une réponse maximale obtenue avec ces différents peptides, sont présentées sur les figures 33 et 34. Les colonnes "milieu" représentent le témoin cellulaire sans antigène et reflètent l'état initial d'activation des cellules. La prolifération des cellules vis-à-vis d'un mitogène, la concanavaline A, a également été vérifiée comme contrôle interne de l'activation. La partie J0 représente les résultats concernant les lymphocytes T de rats sains, ceux-ci ne proliférant pas vis-à-vis des différents peptides de la molécule P30. Dès J8 post-infection, et jusqu'à J36, on note une réponse proliférative importante vis-à-vis d'un peptide particulier, le NC4:238-256. Les cellules T ganglionnaires ne sont pas restimulées par les autres peptides de l'antigène P30 tout au long de l'infection. En

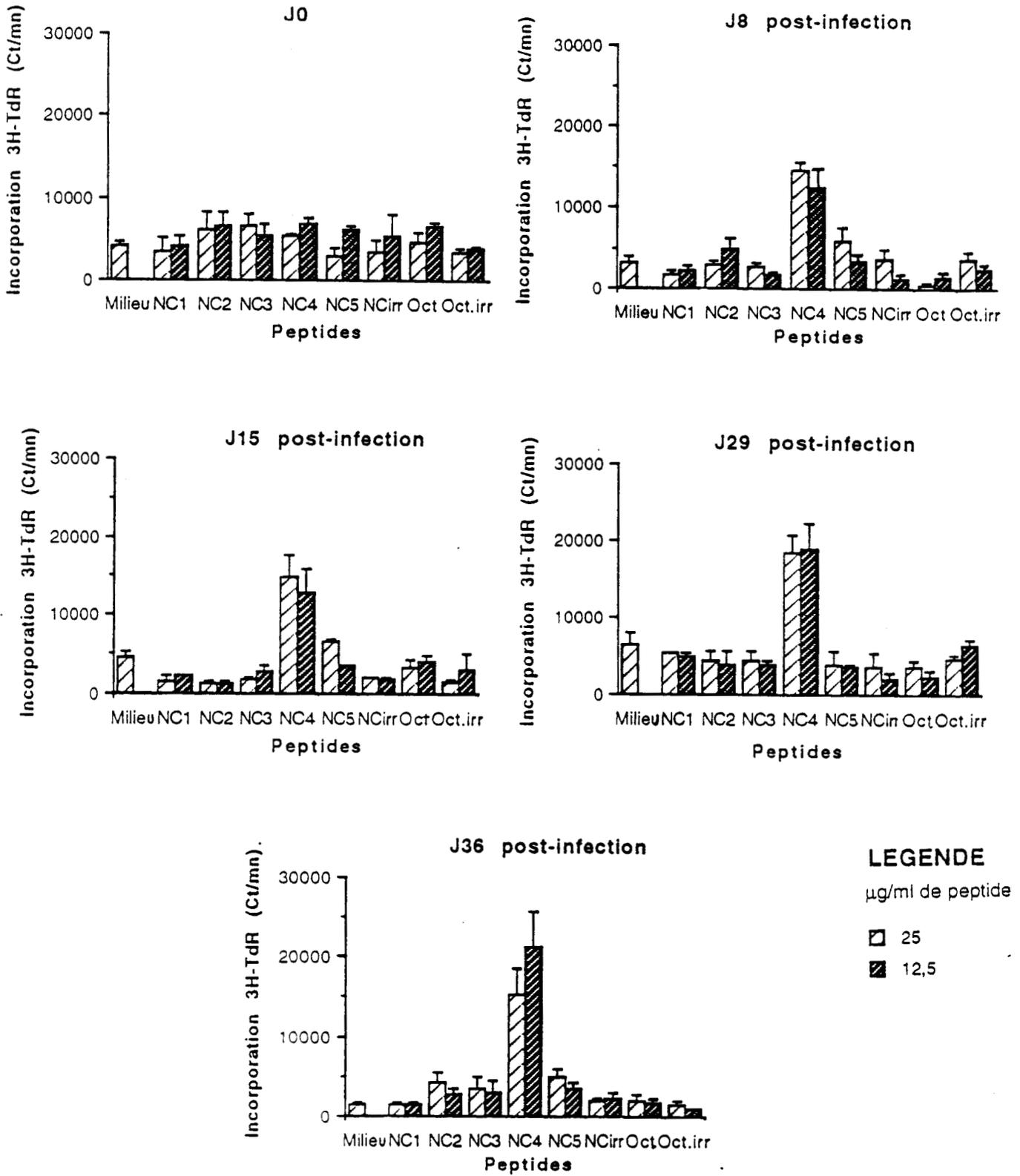
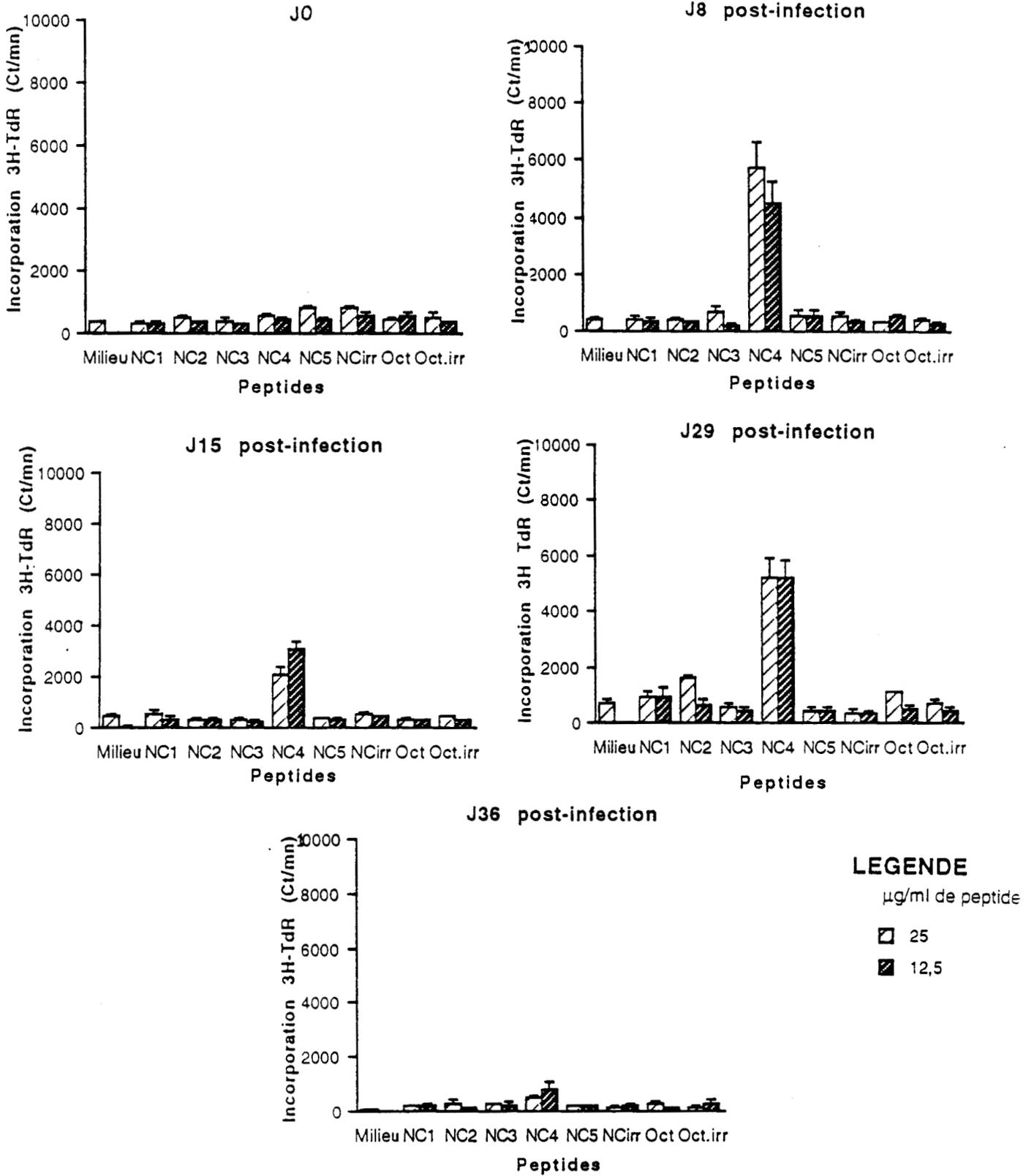


FIGURE 33

REPONSE PROLIFERATIVE DES CELLULES T GANGLIONNAIRES AU COURS D'UNE INFECTION PAR VOIE ORALE



**FIGURE 34**

**REPONSE PROLIFERATIVE DES CELLULES T SPLENIQUES AU COURS D'UNE INFECTION PAR VOIE ORALE CHEZ LE RAT**

particulier, aucune prolifération n'est observée avec le peptide N-terminal et sa construction octamérique quel que soit le jour de l'infection.

La Figure 34 montre la réponse proliférative des cellules T spléniques de rats infectés vis-à-vis des mêmes peptides. Seul le peptide NC4:238-256 entraîne une réponse proliférative des cellules T de J8 à J29 post-infection. Par contre, dès J36 on note une nette chute de cette réponse lymphocytaire. De nouveau, aucune prolifération n'est observée avec les autres peptides de l'antigène P30. Nous avons aussi observé que le bruit de fond (prolifération spontanée) est nettement diminué avec ce type de cellules.

**En conclusion** de cette étude, nous avons donc pu souligner l'importance de deux peptides particuliers de la molécule P30: les peptides 48-67 et le NC4: 238-256. Le peptide 48-67, représente un épitope T capable d'induire par immunisation une réponse protectrice vis-à-vis de l'infection, mais n'est apparemment pas reconnu par les lymphocytes T de rats au cours d'une infection par voie orale. Le peptide 238-256 semble par contre être un épitope important reconnu par les lymphocytes spléniques et ganglionnaires au cours de l'infection, mais son rôle dans l'immunité protectrice reste inconnu.

**DISCUSSION-CONCLUSION**

Il est maintenant bien établi que les microorganismes et les divers produits ingérés par l'organisme fournissent une source potentielle de stimulation pour les compartiments systémiques et sécrétoires. Les anticorps d'isotype IgA ont suscité au cours des dernières années un grand intérêt dans de nombreuses maladies parasitaires. En effet, ils constituent des acteurs importants de la défense immunitaire, tant dans les parasitoses à localisation intestinale (protozoaires et helminthes) que dans le cas des parasitoses, comme la toxoplasmose, où la voie d'infestation est constituée essentiellement par l'ingestion de parasites. Dans ce contexte les travaux présentés dans ce mémoire ont d'abord concerné la détection de cette réponse anticorps au cours de la toxoplasmose humaine puis expérimentale. La production d'un anticorps monoclonal IgA spécifique d'un antigène majeur de *T. gondii* a permis, dans un troisième temps, d'apporter un outil complémentaire permettant des études ultérieures des fonctions de cet isotype. Enfin, une approche cellulaire T a été réalisée avec différents peptides de l'antigène P30, majoritairement reconnu par les anticorps d'isotype IgA, et a permis de préciser l'importance de certains épitopes particuliers de cet antigène dans l'immunité.

## **L'ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS D'ISOTYPE IgA AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE**

L'intérêt de la réponse anticorps IgA dans la toxoplasmose humaine concerne à l'heure actuelle essentiellement une approche diagnostique puisque le rôle de ces anticorps au cours de l'infection est encore inconnu.

L'importance de la détection de ces anticorps en diagnostic concerne aussi bien la toxoplasmose acquise que la toxoplasmose congénitale. En effet, les techniques courantes d'immunodétection sont classiquement basées sur la recherche des anticorps IgG et IgM. Actuellement, en raison de l'augmentation de la sensibilité des techniques de diagnostic et de la mise au point de nouveaux tests d'immunocapture IgM, des anticorps IgM résiduels

peuvent être détectés plus d'un an après l'infection initiale, ce qui remet en cause non seulement la cinétique de cette réponse anticorps mais aussi sa validité en tant que marqueur absolu d'une infection récente (KONISHI, 1987). La cinétique de la réponse anticorps IgA étant encore mal connue (SEGUELA, 1982), différents auteurs se sont intéressés à l'induction de cette réponse anticorps au cours de la toxoplasmose acquise et congénitale.

Dans des travaux préliminaires, le premier problème posé, concernait donc essentiellement la comparaison de la cinétique d'évolution des ces anticorps par rapport à celle des anticorps IgM au cours d'une toxoplasmose acquise. Notre étude s'est donc inscrite dans ce contexte particulier et a permis, grâce au suivi de nombreux sérums humains prélevés à différents stades de l'infection, de confirmer par une technique radioimmunologique l'induction de la réponse anticorps IgA au cours des phases aiguë et subaiguë de la maladie, suivie de sa diminution en phase chronique. Ces résultats confirment ainsi les premières données qui constataient par des méthodes E.L.I.S.A. une évolution simultanée des deux réponses anticorps IgA et IgM (VAN LOON *et al.*, 1983; FAVRE *et al.*, 1984). Par la suite, des méthodes d'immunocapture I.S.A.G.A. (immunosorbent agglutination assay) permettant la détection d'anticorps IgA dans les sérums et dans le liquide céphalorachidien ont été élaborées. Les résultats obtenus par ces méthodes ont confirmé une évolution parallèle de la réponse anticorps IgA et de la réponse anticorps IgM, le pic d'anticorps IgA semblant atteint plus tardivement que la réponse maximum des anticorps IgM (PINON *et al.*, 1986). Certains auteurs ont également décrit l'apparition initiale d'une réponse IgM suivie par l'induction d'une réponse IgA (TURUNEN *et al.*, 1983).

L'intérêt de la détection des IgA spécifiques dans le diagnostic pré et postnatal de l'infection congénitale par *T. gondii* avait été souligné dès 1982 par PINON *et al.*, grâce à l'utilisation de la technique des pics E.L.I.F.A. et par LE FICHOUX *et al.*, (1987) grâce à l'utilisation de la technique d'immunocapture I.S.A.G.A. Dans ce dernier cas, un

diagnostic de toxoplasmose congénitale avait pu être porté chez trois enfants par la mise en évidence d'IgA spécifiques sans IgM associées. Enfin, la toxoplasmose constituant une des premières infections opportunistes chez les patients atteints de S.I.D.A., et la néosynthèse des anticorps IgM s'avérant exceptionnelle au cours des réactivations toxoplasmiques, différents auteurs se sont intéressés à la détection des IgA spécifiques chez ces patients. Cependant, les premiers résultats obtenus par des méthodes d'immunocapture ont été décevants et n'ont pas révélé d'anticorps IgA spécifiques (DEROUIN *et al.*, 1987) ou exceptionnellement (1 cas /20; STEPICK-BIEK *et al.*, 1990). Par contre, chez des patients immunodéprimés au cours de transplantations cardiaques, hépatiques ou rénales, il a été démontré que des anticorps IgA et IgE accompagnent et même précèdent une toxoplasmose évolutive patente (PINON *et al.*, 1990).

Néanmoins, l'étude des différents antigènes pouvant être reconnus par les anticorps IgA était peu développée. Nous avons pu montrer grâce à l'utilisation d'un extrait antigénique total du parasite que la cible majeure des anticorps IgA sériques de patients en phase aiguë était constituée par l'antigène de surface P30, bien que de nombreux autres antigènes soient également faiblement reconnus, notamment des antigènes de 35, 43, et d'environ 85 et 97 kDa. Dans notre laboratoire, la reconnaissance précoce de l'antigène P30 avait déjà été soulignée dans le cadre de la réponse anticorps IgA (DECOSTER *et al.*, 1988). Ces résultats ont confirmé les premières données de PARTANEN *et al.*, en 1984 qui décrivaient la reconnaissance en immunoélectrotransfert de bandes de 25, 30, 32, 40 et 50 et de LE FICHOUX *et al.*, en 1987, rapportant des bandes de 25 à 35 kDa chez un laborantin accidentellement infesté par la souche RH de *T. gondii*.

La reconnaissance privilégiée de l'antigène de surface P30 a été utilisée pour la mise au point d'un test d'immunocapture IgA anti-P30 (DECOSTER *et al.*, 1988) utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre P30. Ce test a permis de mettre en évidence l'existence

d'anticorps IgA anti-P30 dans les sérums de patients en phase aiguë et leur absence au cours de la phase chronique. La réponse IgA que nous avons pu détecter par notre technique radioimmunologique persiste par contre à taux faible en fin de phase subaiguë et au début de la phase chronique, ce qui peut s'expliquer par le fait que nous avons détecté la réponse anticorps IgA dirigée contre un extrait antigénique total de *T. gondii*, contrairement au test d'immunocapture IgA anti-P30.

L'existence d'une réponse anticorps IgA au cours de la phase aiguë de l'infection, a également permis d'améliorer le diagnostic de la toxoplasmose congénitale, où un diagnostic très précoce de l'infection s'avère indispensable. Les études utilisant le test d'immunocapture IgA anti-P30 ont permis une détection précoce de l'infection chez des enfants dont la mère a fait une séroconversion en cours de grossesse (DECOSTER *et al.*, 1988). Des évaluations récentes de cette méthode, ont permis de souligner l'intérêt fondamental de cette détection, puisque parmi les sérums de 23 enfants infectés, des anticorps IgA anti-P30 ont été détectés dans tous les cas contrairement aux anticorps IgM anti-P30 retrouvés dans seulement 13 cas sur 23. Ces anticorps IgA peuvent ainsi être détectés très précocement lors de prélèvements au cours des périodes anténatale, néonatale, et postnatale (DECOSTER *et al.*, 1991, 1992). Il est aujourd'hui clairement admis que ces anticorps possèdent un intérêt indéniable dans l'élaboration du diagnostic de la toxoplasmose congénitale (PUJOL *et al.*, 1989; STEPICK-BIEK *et al.*, 1990).

Récemment, d'autres auteurs ont de plus démontré en utilisant différents tests d'immunocapture, qu'une réponse anticorps IgA spécifique dirigée soit contre P30 (DARCY *et al.*, 1991) mais aussi contre d'autres antigènes de *T. gondii* (PINON *et al.*, 1991) pouvait être détectée dans les cas de réactivations de toxoplasmose chez les patients atteints de S.I.D.A. contrairement aux premiers résultats obtenus dans ce domaine.

Finalement, HUSKINSON *et al.*, (1990) ont confirmé, en accord avec nos résultats, que les antigènes majoritairement reconnus par les anticorps IgA de sérums de patients en phase aiguë possèdent des poids moléculaires de 30, 35, et 5 kDa bien que d'autres antigènes de poids moléculaires 97, 83 et 45 kDa soient également reconnus. D'autre part, ces auteurs ont montré que seuls les antigènes de 30 et de 35 kDa sont reconnus par les anticorps IgA des enfants congénitalement infectés et ont confirmé, comme nous avons pu l'observer, que l'utilisation d'extraits antigéniques totaux en conditions réductrices entraîne une détection plus délicate de ces antigènes par les anticorps IgA des sérums humains.

Nous avons complété notre analyse par une étude originale plus précise vis-à-vis des antigènes ES, puisque comme nous l'avons déjà souligné, l'hôte infecté est exposé non seulement aux antigènes membranaires et solubles du parasite, mais également aux antigènes sécrétés par celui-ci au cours de l'infection. La préparation antigénique utilisée comportait notamment les principaux antigènes des granules denses du tachyzoïte et probablement quelques antigènes de rhoptries. Nous avons ainsi pu montrer la reconnaissance intense de deux antigènes particuliers, l'antigène de 28.5, et l'antigène de 40 kDa dans des sérums de patients en phase subaiguë. L'antigène GP28,5 constitue un antigène majeur sécrété par le parasite, reconnu par les anticorps IgG de sérums humains chroniques et par les anticorps de rats et de souris infectés ou immunisés par les antigènes excrétés-sécrétés (DARCY *et al.*, 1988; DECOSTER *et al.*, 1988). Cet antigène est localisé au niveau de la vacuole parasitophore et dans les granules denses des tachyzoïtes et des bradyzoïtes (CHARIF *et al.*, 1990). Les travaux réalisés par DARCY *et al.*, dans le laboratoire ont montré que cet antigène pouvait induire un niveau de protection significatif chez la souris léthalement infectée (communication personnelle). L'autre antigène constitué par une molécule de 40 kDa pourrait, bien que nous ne possédions pas de sondes anticorps monoclonales pour le confirmer, correspondre à l'antigène de 40 kDa récemment décrit par ACHBAROU *et al.*, en 1991. Cet antigène est localisé dans les granules denses

et est libéré dans la vacuole parasitophore après l'invasion. L'analyse de sérums prélevés en phase aiguë nous a permis par contre de mettre en évidence une reconnaissance de l'antigène GP28,5 plus faible, mais également la reconnaissance de deux antigènes supplémentaires de 30 kDa et environ 50-55 kDa. L'antigène de 30 kDa pourrait correspondre à l'antigène de granules denses récemment décrit par LERICHE et DUBREMETZ, en 1991, et l'antigène de 50-55 kDa à un antigène de rhoptrie. Néanmoins, des études complémentaires sur un plus grand nombre de sérums humains prélevés en phase aiguë seraient nécessaires pour approfondir ces premiers résultats et permettraient de pouvoir apprécier l'importance respective des antigènes reconnus au cours des différentes phases de l'infection.

Ainsi, tous ces résultats établissent clairement que la contamination par *T. gondii* soit au cours de l'infection naturelle (toxoplasmose acquise et congénitale humaine) soit lors d'infections expérimentales induit une forte réponse anticorps IgA dirigée non seulement contre des antigènes de surface mais également contre des antigènes de sécrétion et de rhoptries. Ceci suggère que des anticorps d'isotype IgA sont dirigés contre des molécules immunogènes présentes en quantités importantes dans l'organisme lors des premières phases d'invasion du parasite. Ces anticorps peuvent ainsi constituer un excellent marqueur d'infection aiguë. A cet égard, l'induction d'anticorps IgA vis-à-vis de l'antigène P30 notamment, est de courte durée et révèle donc une toxoplasmose récente ce qui permet une évaluation précise de l'état immunitaire de la femme enceinte et le dépistage précoce de l'infection congénitale. La recherche de ces anticorps pourrait s'intégrer dans la mise en place d'une surveillance systématique chez les patients immunodéprimés et/ou développant un S.I.D.A. puisque ces anticorps peuvent parfois être détectés avant l'apparition de complications toxoplasmiques graves.

## **II. ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS D'ISOTYPE IgA DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX DU RAT ET DE LA SOURIS. INTERET POTENTIEL DES ANTICORPS IgE.**

Une étude cinétique précise de la réponse anticorps ne peut cependant être réalisée qu'à l'aide de modèles expérimentaux pour lesquels on peut connaître la date exacte de l'infection et grâce auxquels on peut essayer d'appréhender la fonction des différents types d'anticorps au cours de la toxoplasmose. Néanmoins, aucun modèle n'est idéal et chacun possède ses caractéristiques propres. Deux modèles particuliers couramment utilisés dans notre laboratoire, celui du rat et de la souris possèdent un comportement vis-à-vis de l'infection par *T. gondii* ainsi qu'un métabolisme des anticorps IgA, différents.

Le comportement naturellement résistant du rat vis-à-vis de l'infection par *T. gondii*, le rapproche de celui observé lors de l'infection humaine chez les individus immunocompétents, et constitue de ce fait un modèle intéressant pour ce type d'infection. De plus, dans notre laboratoire, le modèle du rat génétiquement athymique (Nu/Nu), rat sensible à l'infection par seulement 1000 tachyzoïtes de la souche RH a été mis au point et a déjà prouvé tout son intérêt dans des études de protection réalisées par RIDEL *et al.*, en 1988. Le rat possède ainsi l'avantage de permettre une approche des mécanismes impliqués dans l'immunité au cours de la toxoplasmose. Cependant, le métabolisme des IgA chez cet animal est radicalement différent de celui observé chez l'homme ce qui est essentiellement lié à la présence d'un transport hépatobiliaire important des IgA sériques (FISCHER *et al.*, 1979). Ce comportement est la conséquence de la présence sur les hépatocytes de ces animaux du poly-Ig récepteur, (récepteur des anticorps IgA polymériques), contrairement aux hépatocytes humains qui ne le possèdent pas (BROWN et KLOPPEL, 1989). Ceci rend la détection des IgA sériques un peu plus délicate dans ce modèle et l'obtention de grandes quantités d'IgA sécrétoires pour des études fonctionnelles, fastidieuse.

La souris, est quant à elle, sensible à l'infection par le parasite et possède l'avantage d'être facilement utilisable dans des expériences de protection. Chez cet animal, le transport hépatobiliaire existe également mais est moins important que chez le rat, ce qui lui confère, à cet égard, un comportement intermédiaire entre celui observé chez le rat et celui observé chez l'homme (DELACROIX *et al.*, 1985).

Au début de notre étude, l'état des travaux sur la réponse anticorps IgA concernait uniquement la toxoplasmose expérimentale de la souris et étaient relativement peu développés. Seules, deux études faisaient état de l'induction d'une réponse IgA sérique dans ce modèle (TAILLIEZ *et al.*, 1974 ; GRENEY *et al.*, en 1985). Nos travaux, dans les deux modèles rat et souris, ont permis d'établir avec précision la cinétique d'apparition de ces anticorps IgA sériques au cours de l'infection par voie orale et intrapéritonéale. Ces résultats ont démontré l'importance de l'induction d'une réponse anticorps IgA lors d'une infection par voie orale comparée à une infection par voie intrapéritonéale et l'apparition précoce de ces anticorps (dès J7) confirmant les premiers travaux de TAILLIEZ chez la souris. Cependant GRENEY *et al.*, avaient observé une réponse anticorps légèrement plus importante par voie intrapéritonéale comparée à la réponse anticorps obtenue lors d'une infection par voie orale. Les différences observées peuvent être attribuées soit à l'utilisation d'un nombre plus important de kystes provenant de souches différentes, soit à l'emploi de souris de souches différentes. L'étude de la cinétique comparée des différents isotypes d'anticorps au cours de l'infection par voie orale chez le rat a permis d'établir la quasi-simultanéité de ces deux réponses anticorps (moins d'un jour d'intervalle) ce qui justifie pleinement l'utilisation de l'isotype IgA dans l'évaluation d'une toxoplasmose aiguë chez l'homme.

La recherche des différents antigènes reconnus dans un extrait total de tachyzoïtes par les anticorps IgA de sérums de rats et de souris infectés ou immunisés par les antigènes d'excrétion-sécrétion nous a permis de mettre en évidence une réponse anticorps

IgA dirigée contre de nombreux antigènes. Ces antigènes cibles sont principalement constitués par les antigènes de 28,5, 29, 30, 35 et 38 kDa chez le rat et d'un antigène majeur de 29 kDa chez la souris 75 jours après l'infection. Nous n'avons pas détecté de réponse majeure contre l'antigène P30 chez ces souris à cette date, mais d'autres études complémentaires utilisant un test d'immunocapture anti-P30 ont démontré la présence d'une réponse intense dirigée contre cet antigène moins d'un mois après l'infection. La détection chez le rat d'une réponse anticorps IgA intense dirigée contre P30 n'est pas surprenante et conforte l'intérêt potentiel de cet antigène. Cette étude a permis de confirmer l'intérêt d'autres antigènes, notamment l'antigène P35 également reconnu par les anticorps IgA de sérums humains et dont l'intérêt a déjà été souligné chez l'homme (POTASMAN *et al.*, 1986). La reconnaissance d'un antigène particulier de 29 kDa par les sérums de rat et de souris infectés mérite néanmoins une étude plus approfondie, cet antigène original ne correspondant à aucun antigène décrit.

Nous avons également pu démontrer l'induction d'une réponse anticorps IgA importante après immunisation par les antigènes excrétés-sécrétés par les tachyzoïtes. La réponse anticorps de rats infectés ou immunisés a souligné la reconnaissance, parmi ces antigènes, d'un antigène particulier de 34 kDa. Il serait intéressant de pouvoir confirmer ou non l'identité de cet antigène avec l'antigène de 32 kDa sécrété par *T. gondii* dans la vacuole parasitophore et décrit par SIBLEY *et al.*, en 1988 ou avec l'antigène ES de 34 kDa décrit par DARCY *et al.*, en 1988.

Enfin, la présence d'anticorps d'isotype IgE ayant été détectée dans les sérums aigus d'infection humaine (BESSIERES-CATHALA, 1982; PINON *et al.*, 1982,1987) ceci nous a conduit à rechercher les anticorps de cet isotype parallèlement aux anticorps IgA chez le rat infecté par voie orale. En effet, d'autres études menées en parallèle dans notre laboratoire ont permis de confirmer non seulement, la présence d'une réponse anticorps IgE sérique chez des rats infectés par voie intrapéritonéale par des tachyzoïtes de

la souche RH ou immunisés par les antigènes ES, mais aussi le rôle important joué par ces anticorps IgE au cours de la protection du rat athymique (RIDEL *et al.*, 1988). Cette étude complémentaire nous a permis de confirmer l'induction d'une réponse anticorps IgE au cours de la toxoplasmose du rat, cette réponse suivant une évolution parallèle à la réponse anticorps IgA dans ce modèle. La cible majeure de ces anticorps s'est avérée être l'antigène de surface P30, confirmant ainsi la large réponse polyisotypique suscitée par cet antigène. Des travaux réalisés chez la souris, n'ont cependant pas permis de mettre en évidence de réponse anticorps IgE spécifique chez cet animal, conformément aux derniers résultats de WATANABE et KOBAYASHI, en 1989.

Récemment PINON *et al.*, (1990) ont développé un test d'immunocapture I.S.A.G.A. pour la détection des IgE humaines et ont montré que ces anticorps sont détectés chez 86% des patients présentant une toxoplasmose aiguë, mais qu'ils ne persistent pas plus de 4 mois après l'infection. Ils peuvent ainsi, en association avec la détection des anticorps IgA, constituer également un marqueur complémentaire pour le diagnostic de la toxoplasmose acquise et congénitale.

Cependant, nos travaux ont concerné majoritairement la réponse anticorps IgA sérique au cours de l'infection par *T. gondii*. Néanmoins, l'induction d'IgA intestinales au cours de certaines maladies parasitaires a déjà été démontré pour de nombreux parasites protozoaires, notamment, *Entamoeba histolytica* (ACOSTA *et al.*, 1983), *Giardia lamblia* (KAPLAN *et al.*, 1985), et plus particulièrement certaines coccidies intestinales telles que *Eimeria falciformis* (DOUGLASS et SPEER, 1985) et *Eimeria tenella* (DAVIS et PORTER, 1978, 1983). Ces derniers auteurs ont d'ailleurs démontré que les anticorps IgA pouvaient jouer un rôle en inhibant la pénétration et le développement des parasites dans la cellule. Dans la toxoplasmose, dès 1986, McLEOD et MACK, ont démontré après récupération des lavages intestinaux, la présence d'IgA intestinales chez des souris Swiss infectées par de fortes doses de kystes de la souche ME49.

Nous nous sommes, pour notre part, davantage intéressés au modèle rat dont nous avons entrepris l'étude précise des réponses anticorps au cours de l'infection orale par *T. gondii*. Cependant, nous n'avons pas pu aborder aisément ce type d'étude chez le rat, étant donné le métabolisme particulier des IgA qui le caractérise, et la difficulté de trouver à cette époque des réactifs de qualité satisfaisante sur le marché. Le transport hépatobiliaire des IgA (ORLANS *et al.*, 1978; LEMAITRE COELHO *et al.*, 1978; FISCHER *et al.*, 1979), dont seule une petite quantité se retrouve ensuite par la suite au niveau des sécrétions intestinales, a rendu la détection de ces anticorps particulièrement délicate dans ce modèle et ne nous a pas permis de mettre en évidence cette réponse anticorps, même après concentration des liquides de lavages intestinaux. D'autre part, le rat ne possédant pas de vésicule biliaire, l'écoulement de la bile est continue et sa récupération aurait nécessité le maintien des rats en cages de contention, après ligature du canal cholédoque de ces animaux, pendant toute la durée de l'infection. Ceci nous a semblé trop fastidieux, d'autant que la purification des IgA biliaires s'avérait alors des plus complexes (ALTAMIRANO *et al.*, 1980).

Parallèlement à ces travaux, d'autres auteurs se sont intéressés à l'étude de la réponse IgA sécrétoire chez la souris. Ainsi, CHARDES *et al.*, en 1990, ont étudié la réponse anticorps IgA dans les sécrétions intestinales et le lait en comparaison avec la réponse anticorps IgA sérique, chez des souris OF1 infectées par 40 kystes de la souche 76K. Ceux-ci ont démontré la présence d'une réponse IgA à partir de deux semaines dans le sérum et le lait, et de trois semaines dans les sécrétions intestinales. Ces anticorps semblent dirigés contre les mêmes antigènes quelle que soit l'origine du liquide biologique étudié. A une infection aiguë, est associée la reconnaissance d'antigènes de 30 kDa (lait, sécrétions intestinales et sérum), de 43 kDa (lait et sérum), et de composants de rhoptries (sécrétions intestinales). Ces travaux confirment l'importance de ces antigènes identiques à ceux reconnus lors de l'infection humaine.

Cependant, les anticorps IgA sont particulièrement difficiles à purifier et à obtenir en grandes quantités. En effet, différents essais utilisant la jacaline, lectine permettant la purification facile des IgA humaines, notamment les IgA1 (GREGORY *et al.*, 1987), n'est pas applicable aux IgA de rat et de souris. D'autres méthodes utilisant la chromatographie d'affinité, n'ont également pas permis d'obtenir des quantités d'anticorps IgA suffisantes pour être compatibles avec leur exploration fonctionnelle. Une approche des fonctions biologiques de ces anticorps au cours de la toxoplasmose s'avérait donc des plus délicate. Nous avons, dans ce contexte, envisagé la production d'anticorps monoclonaux d'isotype IgA spécifiques du parasite, afin d'aborder cette question.

### **III. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX IgA SPECIFIQUES DE T. GONDII**

Les résultats obtenus dans notre modèle sont originaux puisqu'à notre connaissance, la production d'anticorps monoclonaux IgA n'a jusqu'ici pas encore été décrite dans la toxoplasmose. De plus, la production d'autres anticorps monoclonaux obtenus dans des modèles bactériens n'avait pas fait l'objet de recherches particulières permettant d'augmenter les pourcentages de clones hybrides sécrétant spécifiquement des anticorps d'isotype IgA.

Nous avons démontré dans notre étude que le choix des protocoles d'infection ou d'immunisation associés à un type d'adjuvant ou d'immunostimulant donné, ainsi que le type d'organes prélevés pour la fusion cellulaire était fondamental. En effet, l'utilisation de cellules de la rate n'a conduit à aucun clone positif ni dans notre étude ni dans une étude similaire réalisée par Delphine GREZEL dans le laboratoire, et concernant un autre parasite, *Schistosoma mansoni*.

L'emploi de deux types d'adjuvants, la toxine cholérique et le MDP (muramyl-dipeptide) ont permis d'augmenter de façon importante le nombre de clones producteurs d'IgA totales et spécifiques.

Il est en effet bien connu que la toxine cholérique est un excellent immunogène lorsqu'elle est administrée par voie orale (LYCKE et HOLMGREN, 1986); elle stimule de façon très efficace la réponse IgA locale, engendrant une réponse mémoire au niveau de la *lamina propria*. De plus, elle stimule également la production d'une réponse IgG systémique (LYCKE *et al.*, 1987; ELSON, 1989; LYCKE *et al.*, 1989).

Récemment, différents auteurs ont d'ailleurs confirmé que l'emploi de cet adjuvant pouvait induire une réponse IgA sécrétoire, spécifique de *T. gondii*, plus intense que celle observée lors de l'infection naturelle (BOURGUIN *et al.*, 1991). Le mécanisme de stimulation du système muqueux par cette toxine est encore mal connu mais il a été démontré que l'effet de la toxine cholérique *in vitro* conduit à l'augmentation de la synthèse des IgA et des IgG par les cellules B activées (LYCKE et STROBER, 1989).

Nous avons également utilisé comme immunostimulant, le muramyl-dipeptide ou MDP (Nacétyl muramyl-L-alanyl-D-Isoglutamine) qui fait partie des adjuvants synthétiques et représente la plus petite partie soluble de la paroi des mycobactéries ayant une activité adjuvante. Des antigènes excrétés-sécrétés ont été injectés par voie sous-cutanée, puis l'administration de MDP a été réalisée par voie orale. Dans ces conditions, le MDP exerce un effet immunostimulant sur la réponse IgA (CHEDID *et al.*, 1976). Cette substance était par ailleurs connue pour induire une élévation des IgA sériques dans le cas d'antigènes inhalés (BUTTER *et al.*, 1983). Le mécanisme d'action exact du MDP reste encore à définir, bien qu'une action directe au niveau des macrophages soit établie. D'autres mécanismes impliqueraient également une action sur les lymphocytes T et B, peut-être par une action indirecte médiée par diverses lymphokines (BAHR et CHEDID, 1986). Nos premiers résultats ont confirmé la possibilité d'augmenter le nombre de clones IgA spécifiques lors de l'utilisation de cette substance. Ainsi, la capacité du MDP à augmenter

la réponse immune quand il est administré par voie orale, l'efficacité de la voie orale dans la stimulation d'une réponse IgA sécrétoire, suggère que le MDP, administré oralement peut être efficace en tant qu'adjuvant du système immunitaire muqueux.

Des études préliminaires nous ont permis de constater par cytofluorométrie de flux que certains anticorps monoclonaux IgA se fixaient effectivement sur le parasite, mais nous n'avons pas d'explication quant à la fixation sur le parasite du témoin d'IgA myéломateuse irrelevant κ MOPC 315 que nous avons utilisé. Les difficultés que nous avons rencontrées alors quant au choix d'un témoin IgA irrélèvante pourraient cependant s'expliquer par la présence sur le parasite d'un récepteur Fcα pour les IgA. En effet, l'existence d'un récepteur Fc pour les IgG sur *T. gondii* a déjà été démontrée (BUDZKO *et al.*, 1989). D'autre part la présence d'un récepteur Fcα a été observée sur de nombreuses bactéries, notamment certaines souches de Streptocoques de groupe B (RUSSEL-JONES *et al.*, 1986). Une autre hypothèse serait la fixation des IgA sur le parasite par l'intermédiaire de certains de leurs résidus oligosaccharidiques. Il a été récemment démontré que certaines lectines bactériennes pouvaient interagir avec des IgA (WOLD *et al.*, 1990). Ces premiers résultats seraient donc à réévaluer.

Nous avons ainsi obtenu des anticorps monoclonaux IgA spécifiques de *T. gondii* dont la spécificité antigénique précise a pu être déterminée pour l'un d'entre eux. Ainsi, une molécule de 60 kDa reconnue par l'anticorps monoclonal TG25 AB11 et présente dans l'extrait membranaire de tachyzoïtes a pu être identifiée par immunotransfert et immunoempreinte en conditions non réductrices. L'identité avec l'antigène P30 a ensuite été confirmée dans un test d'immunocapture dirigé contre cet antigène. Ceci est compatible avec certaines de nos observations antérieures ainsi que celles d'autres équipes indiquant que l'antigène P30 peut se dimériser et que cette forme peut être reconnue par certains anticorps monoclonaux IgG spécifiques dirigés contre P30 (J. SMITH, communication personnelle). Cet anticorps monoclonal reconnaîtrait donc un épitope de la

molécule P30 lorsque celle-ci se trouve sous forme dimérique, puisque la réalisation de l'immunotransfert en conditions non réductrices n'a pas révélé de bande à 30 kDa. Il est intéressant de noter que la sonde anticorps monoclonale IgG TG05-54 que nous possédions révèle par contre une bande à 30 kDa, mais ne détecte rien à 60 kDa, ce qui suggère que les épitopes reconnus par ces deux anticorps monoclonaux sont différents. De plus, les expériences d'inhibition avec différents peptides de l'antigène P30 n'ont pas permis de préciser l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal IgA ce qui pourrait effectivement s'expliquer si l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal est un épitope conformationnel. Néanmoins, il est également possible que l'épitope reconnu ne fasse pas partie des différents peptides que nous possédions ou que l'affinité pour les peptides soit beaucoup plus faible que celle observée vis-à-vis de l'antigène lui même.

Afin de pouvoir aborder le rôle de ces anticorps au cours de l'infection, une étude à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* a été entreprise pour deux anticorps monoclonaux IgA spécifiques de *T. gondii*, TG25 AB11 et TG30 GD5.

Nos expériences réalisées *in vitro* en collaboration avec J.E SMITH, n'ont pas permis de mettre en évidence d'action lytique directe de ces anticorps vis-à-vis du parasite, en présence de complément. En général, les anticorps IgA sont décrits comme de faibles activateurs du complément, bien que ceci soit assez controversé, il est donc possible que les conditions utilisées dans ce test ne soient pas optimales et qu'une activité lytique puisse être observée dans d'autres conditions.

En effet, dans un modèle bactérien, des IgA monoclonales humaines spécifiques se sont avérées capables de provoquer la lyse directe, en absence de complément, de 95% de pneumocoques de type 8 *in vitro* (STEINITZ, 1986). Certains auteurs, ont également décrit l'existence d'anticorps IgA1 humains purifiés capables d'induire la lyse de *Neisseria meningitidis* par la voie classique du complément (JARVIS et GRIFFIS, 1989). Toutefois, il est plus généralement admis que les anticorps IgA n'interviennent pas seuls,

mais en association avec différentes composantes de l'immunité.

Afin d'évaluer *in vivo* le rôle que pourraient jouer nos deux anticorps monoclonaux IgA TG25 AB11 et TG30 GD5 au cours d'une infestation par le parasite, nous avons utilisé les modèles expérimentaux disponibles dans notre laboratoire. Le transfert passif des anticorps monoclonaux IgA spécifiques et non spécifiques du parasite chez le rat Nude et la souris OF1, nous ont conduit à observer une augmentation de la susceptibilité des différents animaux à l'infection par *T. gondii*. L'induction d'IgA monoclonales sécrétoires en continu au niveau des muqueuses, par la technique du "back-pack", a également souligné le même effet, d'autant plus marqué que l'on avait une production d'IgA sécrétoires monoclonales plus importante.

Ceci pourrait tout d'abord suggérer que les épitopes reconnus par nos deux anticorps monoclonaux ne constituent pas des épitopes protecteurs vis-à-vis de l'infection, ce qui n'explique toutefois pas le phénomène d'exacerbation observé. Ainsi, l'augmentation de la susceptibilité des animaux à l'infection après administration d'anticorps IgA spécifiques ou non du parasite, nous a amené à envisager plusieurs hypothèses pour expliquer ce phénomène.

L'hypothèse la plus probable pourrait être une inhibition des mécanismes de lyse complément-dépendante par les anticorps IgG spécifiques du parasite, suite à la fixation des anticorps IgA (spécifiquement ou non) sur le parasite. Il a en effet été clairement démontré *in vitro* dans un modèle bactérien d'infection par méningocoque que des anticorps IgA1 purifiés provenant de sujets vaccinés pouvaient agir comme anticorps bloquants lorsqu'ils sont fixés spécifiquement à la capsule polysaccharidique du méningocoque de groupe C. La fixation d'IgA spécifiques aurait pour effet de bloquer la lyse complément-dépendante des IgG de spécificité distincte de celle des IgA, et affecterait les deux voies d'activation du complément. D'autre part, les fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub> de ces mêmes IgA peuvent également inhiber la lyse IgG-dépendante, suggérant l'effet Fc-indépendant d'un tel phénomène (JARVIS et GRIFFIS, 1991). La fixation d'IgA non

spécifiques du parasite par l'intermédiaire de mécanismes de type lectine pourrait conduire au même résultat. Une seconde hypothèse pourrait également impliquer la libération par le parasite de protéases clivant les IgA en Fab et Fc, de telles enzymes ayant été mises en évidence chez les bactéries (Revue par MESTECKY et McGHEE, 1987). Ceci aurait d'ailleurs pour effet d'inhiber toutes les fonctions biologiques faisant intervenir la partie Fc, et pourrait protéger le parasite contre la fixation d'autres anticorps intacts, lui permettant ainsi d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte. Néanmoins, aucun élément ne permet à ce jour de conforter une telle hypothèse pour *T. gondii*, mais de telles molécules capables de cliver les IgG fixées en surface du parasite ont été mises en évidence dans d'autres modèles parasitaires (AURIAULT *et al.*, 1986). Quelle que soit l'hypothèse exacte, ceci est d'ailleurs en accord avec nos résultats préliminaires, concernant l'injection simultanée des deux anticorps IgG TG05-54 et IgA TG25 AB11 chez la souris, infectée par la suite par 1200 kystes de la souche 76K. Dans cette expérience, l'injection d'anticorps monoclonal IgA seul a provoqué la mort de 6/8 souris, le transfert de l'anticorps monoclonal IgG anti-P30 ayant protégé 7/8 souris et le transfert simultané de ces deux anticorps ayant conduit à une diminution de la protection (3/8) par rapport à celle observée lors du transfert de l'anticorps IgG seul. Le transfert simultané d'anticorps IgA irrelevants et d'anticorps IgG anti-P30 a également conduit à une diminution de la protection (3/8).

Il serait intéressant de vérifier par la technique du Dye-test, si une préincubation des tachyzoïtes par cet anticorps monoclonal IgA anti-P30 TG25 AB11 inhibe ou non la lyse complément dépendante de l'IgG induite par TG05-54 anti-P30.

D'autres auteurs ont souligné récemment que les anticorps IgA purifiés de colostrum et de sérum pouvaient également avoir un rôle bloquant de la lyse de *Staphylococcus epidermidis*, *in vitro*, ceci semblant s'effectuer par le blocage du récepteur pour le C3b et le Fc des IgG sur les granulocytes, ce qui entraînerait une diminution de l'activité phagocytaire de ces cellules. En effet, les récepteurs pour le Fc des IgG et le C3b seraient

localisés à proximité du récepteur pour l'IgA, ce qui impliquerait que la fixation de l'IgA perturberait la fixation de ces molécules. Il faut néanmoins noter que ces effets inhibiteurs ont été observés avec des cellules provenant de compartiments systémiques (SAITO *et al.*, 1991).

Cependant, la fonction des IgA spécifiques reste encore obscure, puisqu'en fonction du type d'épitope reconnu par les anticorps et du type d'agent infectieux (impliquant des mécanismes de défense différents), il semble que ces anticorps puissent posséder, soit un effet néfaste, soit au contraire un effet protecteur pour l'individu.

En effet, dans d'autres modèles, l'effet protecteur de ces anticorps a été démontré. L'implication possible dans ces mécanismes de protection, de récepteurs Fc $\alpha$  présents sur de nombreuses cellules de différentes espèces (Revue par MESTECKY et MCGHEE, 1987), a été soulignée de nouveau dans un modèle bactérien. En effet, le transfert d'un anticorps monoclonal IgA dirigé contre l'antigène de type III du streptocoque de groupe B s'est avéré capable de protéger des rats nouveaux-nés et des souris adultes contre une infection létale par cette bactérie (EGAN *et al.*, 1983). Les mécanismes par lesquels cette protection s'exercerait suggèrent une action opsonisante des anticorps IgA, cette activité étant augmentée par la fixation du complément. Ainsi, la capacité de ces anticorps à augmenter la phagocytose *in vitro* peut contribuer à leur effet protecteur *in vivo*. Néanmoins, ces auteurs soulignent la possibilité d'observer des mécanismes différents lors de l'étude d'anticorps monoclonaux IgA de spécificité antigénique différente (BOHNSACK *et al.*, 1989).

Confortant ces résultats, une activité de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps IgA a été mise en évidence à l'aide d'IgA sécrétoires polyclonales dans le modèle parasitaire de la giardiose murine (KAPLAN *et al.*, 1985), démontrant que certains anticorps IgA sont capables d'exercer un effet protecteur dans certaines protozooses.

Cependant aucun mécanisme précis n'a encore été à ce jour souligné à l'aide d'anticorps monoclonaux IgA spécifiques de parasites protozoaires.

L'effet protecteur partiel d'anticorps IgA monoclonaux est mieux documenté dans les helminthiases bien que seules deux études soient à notre connaissance, publiées. Celles-ci concernent les infections par *Trichuris muris* et *Schistosoma mansoni*. Dans le premier cas, 5 anticorps monoclonaux IgA ont été produits par hybridation de cellules ganglionnaires de souris (ROACH *et al.*, 1991). Néanmoins, ces auteurs n'ont pas pu établir si la protection, s'illustrant par une diminution de la charge parasitaire était due à l'épitope reconnu par ce monoclonal ou plutôt à l'isotype (ROACH *et al.*, 1991).

D'autre part, une étude réalisée dans la schistosomiase, par Delphine GREZEL dans le laboratoire, a conduit à la production d'anticorps monoclonaux IgA au cours de la schistosomiase murine. Les anticorps IgA obtenus sont dirigés contre l'antigène protecteur Sm28GST recombinant, et possèdent une activité biologique par transfert passif. En effet, ils permettent de réduire non seulement la charge parasitaire, mais aussi la fertilité des parasites. Ces observations sont confortées chez l'homme où la production d'anticorps IgA chez des individus infestés s'avère corrélée à la résistance à la réinfestation (AURIAULT *et al.*, 1989; GRZYCH *et al.*, 1992; GREZEL *et al.*, en préparation).

Ainsi, nous ne pouvons pas exclure un comportement totalement différent d'IgA sécrétoires polyclonales par rapport à celui de nos anticorps monoclonaux. Après l'analyse de toutes ces données, nous ne pouvons donc pas conclure si l'effet que nous avons observé est dû soit à l'épitope reconnu par cet anticorps monoclonal soit à l'isotype lui-même, soit à la combinaison des deux. Il est tout à fait possible comme le laissent supposer certains auteurs (BOHNSACK *et al.*, 1989) qu'une hétérogénéité de comportement soit observée entre différents anticorps monoclonaux dirigés contre un même antigène, mais reconnaissant des épitopes différents et à fortiori avec des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes différents. Cette possibilité ne peut pas à ce jour être évaluée.

Au vu de l'ensemble de ces résultats qui ont concerné tout d'abord l'emploi d'extraits antigéniques complexes, et après avoir évalué différents protocoles permettant une

optimisation de l'obtention d'anticorps monoclonaux IgA, il semble intéressant de poursuivre l'analyse de la fonction de ces anticorps dans la toxoplasmose. Tout d'abord, il serait intéressant dans notre contexte de produire un anticorps monoclonal IgA dirigé contre le même épitope de P30 que celui reconnu par le monoclonal IgG TG05-54 afin de pouvoir comparer les effets obtenus et de mieux évaluer la relevance des mécanismes liés d'une part à la partie Fab de ces anticorps et d'autre part, à la partie Fc. D'autre part, différentes molécules recombinantes de *T. gondii* notamment les antigènes GP28,5, (dont le rôle protecteur au cours de la toxoplasmose a déjà été suggéré par les premiers travaux de DARCY *et al.* ) et P21, actuellement en cours de production dans notre laboratoire, pourraient être utilisées afin de pouvoir étudier l'impact sur l'immunité de ces différents antigènes *via* la réponse isotypique IgA.

#### **IV. IMPLICATIONS AU COURS DE L'IMMUNITE DE CERTAINS EPITOPES PARTICULIERS DE L'ANTIGENE P30**

Nos différents travaux ont permis de confirmer que l'antigène majeur de surface reconnu par les anticorps IgA tant au cours de la toxoplasmose humaine qu'expérimentale, est l'antigène P30. Afin d'induire des réponses appropriées au niveau muqueux, suite à l'infection par le parasite, l'induction de cellules T "helper" CD4<sup>+</sup> et T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> spécifiques de l'antigène P30 doivent être étudiées vis-à-vis d'une infection par voie orale. En effet, l'étude de la réponse T est de première importance puisque la réponse IgA est thymodépendante (DUNKLEY *et al.*, 1990). L'antigène P30 était donc un excellent candidat potentiel pour aborder cette étude.

La molécule P30 a conduit par le passé à des effets de protection non concluants chez des souris BALB/c, lors d'immunisation répétées en présence d'adjuvant de Freund, provoquant même une exacerbation de la susceptibilité à l'infection (KASPER *et al.*, 1985). Dans notre laboratoire nous avons, par contre, obtenu des résultats encourageants.

En effet, nous avons préalablement montré que le transfert passif d'un anticorps monoclonal dirigé contre P30 est capable de conférer au rat Nude une protection notable contre une infection léthale de parasites (SANTORO *et al.*, 1987). Des résultats plus récents obtenus chez la souris après l'infection par 1200 kystes de la souche 76K ont montré que le transfert passif de ce même anticorps monoclonal conduit à une protection supérieure à 50%, plus de 30 jours après l'infection.

Deux approches nous ont permis d'étudier plus précisément l'implication de certains épitopes particuliers de la molécule dans l'immunité au cours de la toxoplasmose. La purification de P30 par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) a permis d'obtenir la séquence de la partie N-terminale de cet antigène. La synthèse d'un peptide correspondant à cette partie a donc été réalisée par l'équipe du Pr. TARTAR à l'Institut Pasteur de Lille. Des études complémentaires réalisées dans notre laboratoire ont par ailleurs démontré que ce peptide pouvait être reconnu par les anticorps IgA de sérums humains (A.DECOSTER, communication personnelle). Nous avons donc entrepris d'explorer l'immunogénicité de ce peptide dans les modèles expérimentaux du rat et de la souris. Généralement, les peptides s'avèrent être peu immunogènes par eux-mêmes et afin d'éviter l'emploi de molécules porteuses "carrier", une construction octamérique de ce même peptide a alors été réalisée. L'intérêt d'une telle construction avait déjà été souligné dans l'étude d'un autre modèle parasitaire, la Schistosomiase, avec le peptide 115-131 de l'antigène Sm28GST de *Schistosoma mansoni* (WOLOWCZUK *et al.*, 1991). Nos résultats ont permis de démontrer l'induction d'une forte réponse anticorps chez les rats et les souris immunisés par les différentes formes du peptide 48-67 de l'antigène P30. En effet, l'immunisation par la construction octamérique de ce peptide a induit dans ces deux modèles expérimentaux une forte réponse IgG dirigée à la fois contre le peptide linéaire et la construction octamérique de ce même peptide. Ces anticorps réagissent fortement en immunotransfert vis-à-vis de l'antigène P30, mais ne reconnaissent néanmoins pas l'antigène natif du tachyzoïte en immunofluorescence ce qui suggérerait que ces anticorps

reconnaissent soit une forme linéaire et non conformationnelle de cet épitope, soit que ce même épitope ne serait pas exposé à la surface du parasite.

Le rôle protecteur des deux formes linéaire et octamérique du peptide 48-67, a été évalué dans les modèles expérimentaux du rat Nude et de la souris.

Le modèle du rat Nude, dont nous avons déjà parlé, nous a permis de démontrer que le transfert passif de seulement  $5 \times 10^4$  lymphocytes T spécifiques de la construction octamérique 48-67 a permis de doubler le temps de survie de ces rats lors d'une infection létale par la souche RH. Ceci confirme que l'immunisation par la construction octamérique du peptide 48-67 est capable d'induire non seulement une forte réponse anticorps, mais également une réponse cellulaire T fonctionnelle. Les mécanismes d'induction de la protection restent cependant à définir chez le rat, mais ces résultats démontrent qu'ils font intervenir des mécanismes T-dépendants. Une étude plus approfondie concernant notamment la production de différentes lymphokines serait dans ce contexte d'un grand intérêt.

Chez la souris infectée par une dose létale de 1200 kystes par voie orale, l'immunisation préalable avec la construction octamérique du peptide 48-67 a conduit à un degré de protection d'environ 40%, tandis que le peptide linéaire n'a entraîné aucune protection. Il est néanmoins intéressant de noter que chez ces souris non protégées, une forte réponse anticorps IgG peut être détectée en E.L.I.S.A. vis-à-vis des deux formes peptidiques, mais que seule une faible réaction anticorps est détectée par immunotransfert vis-à-vis de P30 dans un extrait total de parasites. Les mécanismes de l'immunité à médiation cellulaire étant prépondérants chez la souris, il est donc possible que l'immunisation des souris avec le peptide linéaire ne stimule pas aussi efficacement l'immunité cellulaire que ne le fait la construction octamérique. Parmi les mécanismes induisant cette protection après immunisation par voie sous-cutanée avec la construction octamérique, on peut avancer l'hypothèse de l'induction soit de lymphocytes T cytotoxiques lysant les cellules infectées par le parasite, soit de cellules permettant par un mécanisme indirect l'induction de telles

cellules, par sécrétion indirecte de lymphokines, notamment.

La reconnaissance par le système immunitaire de l'antigène P30 engendre chez la souris, une série de mécanismes particuliers conduisant à l'élimination du parasite. En effet, différents auteurs ont montré que l'antigène P30 est capable d'induire la stimulation de cellules cytotoxiques tuant le parasite *in vitro* (KHAN *et al.*, 1988b et 1991; KASPER *et al.*, 1992). D'autre part, l'immunisation de souris par une protéine de fusion correspondant à l'antigène P30 associée à la glutathion transférase de *Schistosoma japonicum*, induit une activation des macrophages, qui deviennent alors capables de tuer *in vitro* le parasite (MAKIOKA et KOBAYASHI, 1991a).

Le rôle protecteur de l'antigène P30 a d'ailleurs été confirmé très récemment à l'aide de protocoles d'immunisation différents de ceux utilisés par KASPER *et al.*, 1985. En effet, deux immunisations avec l'antigène P30 par voie intrapéritonéale sont capables de protéger des souris Swiss-Webster contre une infection par des tachyzoïtes de la souche C. Cette protection est nettement augmentée lorsque l'antigène P30 est incorporé dans des liposomes (BÜLOW et BOOTHROYD, 1991). D'autre part, KHAN *et al.*, en 1991, ont aussi obtenu une protection très significative chez des souris immunisées deux fois par semaine pendant 15 jours, par l'antigène P30, en association avec une saponine, le quil A, puis infectées par voie orale avec 50 kystes de la souche P. L'étude des mécanismes immunitaires responsables de cette protection a d'ailleurs permis de montrer l'implication de cellules T spécifiques de l'antigène P30. Le transfert adoptif de splénocytes immuns de ces souris a induit un niveau de protection significatif vis-à-vis d'une infection par des doses léthales de parasites. L'élimination des cellules T CD8<sup>+</sup> entraîne la perte de l'immunité, par contre la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> n'a apparemment aucun effet (KHAN *et al.*, 1991).

Ainsi, dans ce contexte, nos résultats apportent la première démonstration qu'une immunisation de souris à l'aide d'une construction peptidique de l'antigène P30 peut également conférer une protection contre la toxoplasmose.

D'autre part, sachant que la protéine P30 purifiée est capable d'induire la prolifération de cellules T de patients en phase chronique de l'infection et que les surnageants d'une culture de cellules mononuclées stimulée par la protéine P30 purifiée sont doués d'une activité antiparasitaire, celle-ci s'opérant par l'intermédiaire de l'interféron  $\gamma$  (KHAN *et al.*, 1988a), il nous a paru intéressant de déterminer, dans notre modèle expérimental du rat, quels étaient les épitopes de cet antigène reconnus lors d'une infection par voie orale. Ceci a été réalisé à l'aide de différents peptides sélectionnés dans le laboratoire du Pr. TARTAR à partir de la séquence de P30 publiée par BURG *et al.*, 1988) de cet antigène. Le rôle important des ganglions mésentériques au cours d'une infection orale par *T.gondii* a été souligné par McLEOD *et al.*, en 1984. Ces mêmes auteurs ont en effet noté la présence des parasites à ce niveau dès le deuxième jour après l'infection et observé leur persistance pendant un mois environ. Ceci suggère que ces ganglions pourraient jouer un rôle fondamental dans la dissémination des parasites. Nos résultats ont permis de mettre en évidence qu'un peptide particulier, le NC4:238-256 est reconnu par les cellules T ganglionnaires et les cellules T spléniques de rats Fischer au cours de l'infection. Il est intéressant de noter que le peptide N-terminal et sa construction octamérique ne sont, par contre, pas reconnus au cours de l'infection du rat Fischer. Ceci n'exclue pas qu'une reconnaissance puisse être observée en utilisant d'autres souches de rats génétiquement différents. Il ressort néanmoins que le peptide N-terminal ne contient pas d'épitopes générant une réponse T majeure au cours de l'infection alors que comme nous l'avons dit précédemment une construction octamérique de ce peptide suscite une réponse cellulaire T protectrice.

A ce stade, il serait intéressant tout d'abord, de pouvoir vérifier si l'immunisation par ce peptide est capable ou non de provoquer une réponse proliférative vis-à-vis de l'antigène P30 lui-même, ce qui serait particulièrement relevant dans notre modèle d'infection.

D'autre part, puisqu'il a été montré dans le modèle de la schistosomiase qu'une même molécule pouvait induire la production d'anticorps protecteurs et bloquants (GRZYCH *et*

*al.*, 1984) il est du plus grand intérêt de définir avec exactitude les différents épitopes d'une molécule capables de susciter spécifiquement une réponse protectrice. Une étude du rôle fonctionnel des lymphocytes T "helper" spécifiques de ce peptide, au cours d'une immunisation par l'antigène P30 serait fondamentale, notamment dans le contexte de la réponse anticorps IgA. Cependant, la présence dans le peptide 238-256 d'un épitope T n'implique pas que celui-ci joue un rôle majeur dans l'induction d'une protection. En effet, il se pourrait que cet épitope de l'antigène P30 puisse être un des épitopes exposés par le parasite, dans le but unique de détourner le système immunitaire et de rendre inefficace toute réponse. Il serait donc intéressant de déterminer si le peptide 238-256 contenant un épitope reconnu par les lymphocytes T de rats peut être un peptide protecteur vis-à-vis d'une infection par le parasite. A cet égard, le rôle protecteur de constructions octamériques de ce peptide et de constructions octamériques incluant le peptide 48-67 et le peptide 238-256 pourrait être évalué dans notre modèle.

## **V. CONCLUSION**

Les approches expérimentales que nous avons développées tant au niveau humoral qu'au niveau cellulaire ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes potentiellement impliqués dans l'immunité au cours de la toxoplasmose. L'intérêt de l'antigène P30 tant dans le diagnostic précoce de l'infection aiguë par le parasite, que dans l'induction d'une immunité protectrice est aujourd'hui bien établi. L'importance au cours de l'infection humaine et expérimentale de la réponse anticorps IgA dirigée spécifiquement contre cette molécule et des mécanismes à médiation cellulaire induits par cet antigène nous ont conduit à aborder d'une part la fonction de cet isotype, et d'autre part à étudier l'implication de certains épitopes de cet antigène dans l'immunité. L'incidence sur l'expression de l'immunité, de la réponse IgA spécifique de l'épitope contenu dans le

peptide N-terminal 48-67 de l'antigène P30 pourrait être évaluée grâce à la réalisation d'anticorps monoclonaux IgA spécifiques de ce peptide présenté sous forme octamérique. Du fait de son importance, la reconnaissance par les lymphocytes T de l'épitope contenu dans le peptide 238-256 de l'antigène P30 serait également à approfondir. Il faut cependant garder à l'esprit que les anticorps ne constituent certainement qu'une composante de l'immunité et que d'autres mécanismes, impliquant notamment l'intervention de lymphocytes T intraépithéliaux à activité cytotoxique induits au niveau du système immunitaire muqueux (GUY-GRAND *et al.*, 1991), pourraient également exercer un rôle important dans l'induction d'une protection. De plus, la possibilité de disposer prochainement sous forme recombinante, d'autres antigènes à potentialité protectrice, notamment les antigènes GP28,5 et P21, laisse entrevoir le développement d'études similaires permettant une dissection précise des mécanismes sous-tendant l'expression de cette immunité protectrice.

Dans le contexte d'une vaccination par voie orale, qui semble actuellement la plus prometteuse, les mécanismes d'une protection locale et l'identification des épitopes protecteurs des antigènes d'intérêt, restent encore à préciser et nécessitent des investigations plus poussées tendant à prévenir l'induction d'une réponse anticorps bloquante. L'association d'épitopes B et d'épitopes T "helper" de différents antigènes protecteurs, dans des nouvelles formes de transport (microsphères, liposomes) permettant leur acheminement jusqu'au niveau des muqueuses semble constituer une voie d'avenir dans la conception d'un vaccin contre la toxoplasmose.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Sadak A., Fortier B., Leriche M.A., Camus D. et Dubremetz J.F.** (1991) Differential targeting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **103**: 321
- Acosta G.R., Campos A., Barranco I. et Kumate J.** (1983) Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **409**: 760
- Aikawa M., Komata Y., Asai T. et Midorikawa O.** (1977) Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Path.* **87**: 285
- Almond N.M. et Parkhouse R.M.E.** (1986) Immunoglobulin class-specific responses to biochemically defined antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasite. Immunol.* **8**: 391
- Altamirano G.A., Barranco-Acosta C., Van Roost E. et Vaerman J.P.** (1980) Isolation and characterization of secretory IgA (sIgA) and free secretory component (FSC) from rat bile. *Mol. Immunol.* **17**: 1525.
- Ambroise-Thomas P. et Garin J.P.** (1984) Toxoplasmose. *Encycl. Méd. Chir. Paris. Maladies infectieuses*, 8098 A<sup>10</sup>, 4.
- Anderson S.E., Bautista S.C. et Remington J.S.** (1976) Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **26**: 375.
- Anderson S.E., Krahenbuhl J.L. et Remington J.S.** (1977) Depression of antigen-specific lymphocyte transformations in acute acquired toxoplasmosis. *Clin. Res.* **25**: 371 A
- Anderson S.E., Krahenbuhl J.S. et Remington J.S.** (1979) Longitudinal studies of lymphocyte response to *Toxoplasma* antigens in humans infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Lab. Immunol.* **2**: 293
- Araujo F.G.** (1991) Depletion of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes prevents development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect. Immun.* **59**: 1614
- Araujo F.G., Williams D.M., Grumet C. et Remington J.S.** (1976) Strain dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* **13**: 1528
- Araujo F.G. et Remington J.S.** (1984) Partially purified antigen preparations protect against lethal infection in mice. *Infect. Immun.* **45**: 122
- Araujo F.G. et Remington J.S.** (1987) Toxoplasmosis in immunocompromised patients. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **6**: 1
- Asai T., O'Sullivan W.J. et Tatibana M.** (1983) A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **258**: 6816
- Asai T., Kim T., Kobayashi M. et Kojima S.** (1987) Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**: 1332.
- Auriault C., Gras-Masse H., Pierce R.J., Butterworth A.E., Wolowczuk I., Ouma J.H., Khalife J., Neyrinck J.L. et Capron A.** (1989) Antibody response of *Schistosoma mansoni* infected human subjects to the recombinant P28GST and synthetic peptides. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1918

- Bahr G.M. et Chedid L.** (1986) Immunological activities of muramyl peptides. *Fed. Proc.* **45**: 2541
- Bazin H.** (1990) Immunité locale dans *Immunologie Animale*. (Pastoret P.P., Govaerts A., Bazin H. eds. Médecine-Sciences Flammarion) Chap.20. p.218
- Beagley K.W., Eldridge J.H., Kiyono H., Everson M.P., Koopman W.J., Honjo T. et McGhee J.R.** (1988) Recombinant murine IL5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA- positive Peyer's patch B cells. *J. Immunol.* **141**: 2035
- Beagley K.W., Eldridge J.H., Lee F., Kiyono H., Everson M.P., Koopman W.J., Hirano T., Kishimoto T. et McGhee J.R.** (1989) Interleukins and IgA synthesis: human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA committed B cells. *J. Exp. Med.* **169**: 2133
- Beauvais B., Derouin F., Grau F., Lorailhere P., Larivière M. et Barrier J.** (1982) Toxoplasmose et mort foetale. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* **77**: 209
- Benedetto N., Auriault C., Darcy F., Lando D., Watier H. et Capron A.** (1991) Effect of rIFN- $\gamma$  and IL2 treatment in mouse and nude rat infections with *Toxoplasma gondii*. *Eur. Cyt. Net.* **2**: 107
- Bessières-Cathala M.H.** (1982) IgE spécifiques et non spécifiques: méthodes d'évaluation dans la toxoplasmose en méthode E.L.I.S.A. *Lyon Med.* **248**: 85
- Bloom B.R.** (1979) Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. *Nature.* **279**: 21.
- Bohnsack J.F., Hawley M.M., Pritchard D.G., Egan M.L., Shigeoka A.O., Yang K.D. et Hill H.R.** (1989) An IgA monoclonal antibody directed against type III antigen on group B streptococci acts as an opsonin. *J. Immunol.* **143**: 3338
- Bourguin I., Chardes T., Mevelec M.N., Woodman J.P. et Bout D.** (1991) Amplification of the secretory IgA response to *Toxoplasma gondii* using cholera toxin. *FEMS Microbiol. Letters.* **81**: 265
- Brinkmann V., Remington J.S. et Sharma S.D.** (1987) Protective immunity in toxoplasmosis: correlation between antibody response, brain cysts formation, T-cell activation, and survival in normal B-cell deficient mice bearing the H-2 k haplotype. *Infect.Immun.* **55**:990
- Brown W.R. et Kloppel T.M.** (1989) The role of the liver in translocation of IgA into the gastrointestinal tract. *Immunol. Invest.* **18**: 269
- Brown C.R. et McLeod R.** (1990) Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cysts number in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* **145**: 3438
- Budzko D.B., Tyler L. et Armstrong D.** (1989) Fc receptors on the surface of *Toxoplasma gondii* trophozoites: a confounding factor in testing for anti-*Toxoplasma* antibodies by indirect immunofluorescence. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 959
- Bülow R. et Boothroyd J.C.** (1991) Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* **147**: 3496
- Burg J.L., Perelman D., Kasper L.H., Ware P.L. et Boothroyd J.C.** (1988) Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3584.

**Butter J.E., Richerson H.B., Swanson P.A., Kopp W.C. et Suelzer M.T.** (1983) The influence of muramyl dipeptide on the secretory immune response. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **409**: 669

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

**Capron M, Tomassini M., Van Der Vorst, Kusnierz J.P., Papin J.P., et Capron A.** (1988) Existence et fonctions d'un récepteur pour l'IgA humaine sur les éosinophiles humains. *C.R.Acad. Sci., Paris*, **307**: Série III p.397

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

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

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

**Cesbron J.Y., Capron A., Ovlaque G. et Santoro F.** (1985) Use of a monoclonal antibody in a double-sandwich ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30) *J. Immunol. Meth.* **83**: 151.

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

**Cesbron-Delauw M.F., Boutillon C., Mercier C., Fourmaux M.P., Murray A., Miquey F., Tartar A. et Capron A.** (1992) Amino-acid sequence requirements for the epitope recognized by a monoclonal antibody reacting with the secreted antigen GP28,5 of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Immunol.* in press.

**Chang H.R., Grau G.E. et Pechere J.C.** (1990) Role of TNF and IL1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunol.* **69**: 33

**Chardes T., Bourguin I., Mevelec M.N., Dubremetz J.F. et Bout D.** (1990) Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. *Infect. Immun.* **58**: 1240

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

**Chedid L., Audibert F., Fefrancier P., Choay J. et Lederer E.** (1976) Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**: 2472

**Chodirker W.B. et Tomasi T.B.** (1963) Gamma-globulins: quantitative relationships in human serum and nonvascular fluids. *Science* **142**: 1080

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

- Chumpitazi B., Ambroise-Thomas P., Cagnard M.Y. et Autheman J.M.** (1987) Isolation et characterization of *Toxoplasma* exo-antigens from *in vitro* culture in MRC5 and Vero cells. *Int. J. Parasitol.* **17**: 829.
- Coleman D.L., Chodakewitz J.A., Barliss A.H. et Mellois J.W.** (1988) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances selective effector functions of tissue derived macrophage. *Blood* **72**: 573
- Couvreur G., Sadak S., Fortier B. et Dubremetz J.F.** (1988) Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **97**: 1.
- Daffos F., Forestier F., Capella-Pavlovsky M., Thulliez P., Aufrant P., Valenti D. et Cox W.L.** (1988) Prenatal management of 746 pregnancies at risk for congenital toxoplasmosis. *N. Engl. J. Med.* **318**: 271
- Damonville M., Auriault C., Verwaerde C., Delanoye A., Pierce R.J. et 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. et Remington J.S.** (1989) Assesment of human natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity against *Toxoplasma gondii* trophozoites and brain cycts. *J. Immunol.* **143**: 2684.
- Darcy F., Deslée D., Santoro F., Charif H., Auriault C., Decoster A., Duquesne V. et Capron A.** (1988) Induction of a protective antibody -dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted-secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **10**: 553
- Darcy F., Charif H., Caron H., Deslée D., Pierce R.J., Cesbron-Delauw M.F., Decoster A. et Capron A.** (1990) Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. *Parasitol. Res.* **76**: 473
- Darcy F., Foudrinier F., Mougeot G., Decoster A., Caron A., Marx-Chemla C., Capron A. et Pinon J.M.** (1991) Diagnostic value of specific IgA antibodies in AIDS patients with *Toxoplasma* infection: a bicentric evaluation. *Immunol. Letters.* **30**: 345.
- Darcy F., Torprier G., Cesbron-Delauw M.F., Decoster A. et Capron A.** (1992) Diagnostic et prévention de la toxoplasmose. Nouvelles approches et perspectives. *Gynécologie internationale*, sous-presse.
- Dardé M.L., Bouteille B. et Pestre-Alexandre M.** (1988) Isoenzymatic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **39**: 551.
- Davis P.J., Parry S.H. et Porter P.** (1978) The role of secretory IgA in anti-coccidial immunity in the chicken. *Immunol.* **34**: 879
- Davis P.J. et Porter P.** (1983) *Eimeria tenella*: control of parasitic behaviour through mucosal immunity and in feed immunization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **409**: 810
- De Carvalho L. et De Souza W.** (1989) Cytochemical localization of plasma membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. *J. Protozool.* **36**: 164.

- Decoster A., Darcy F., Caron A. et Capron A.** (1988a) IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. *Lancet* **II**: 1104.
- Decoster A., Darcy F. et Capron A.** (1988b) Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin. exp. Immunol.* **73**: 376.
- Decoster A., Slizewicz B., Simon J., Bazin C., Darcy F., Vittu G., Boulanger C., Champeau Y., Demory J.L., Duhamel M. et Capron A.** (1991) Platelia-Toxo IgA, a new kit for early diagnosis of congenital toxoplasmosis by detection of anti-P30 immunoglobulin A antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2291.
- Decoster A., Darcy F., Caron A., Vinatier D., Houze de l'Aulnoit D., Vittu G., Niel G., Heyer F., Lecolier B., Delcroix M., Monnier J.C., Duhamel M. et Capron A.** (1992) Anti-P30 IgA antibodies as prenatal markers of congenital *Toxoplasma* infection. *Clin. Exp. Immunol.* **87**: 310.
- Defrance T., Vanbervliet B., Briere F., Durand I., Rousset F. et Blanchereau J.** (1992) Interleukin 10 and transforming growth factor  $\beta$  cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* **175**: 671.
- Delacroix D.L., Malburny G.N. et Vaerman J.P.** (1985) Hepatobiliary transport of plasma IgA in the mouse: contribution to clearance of intravascular IgA. *Eur. J. Immunol.* **15**: 893
- Derouin F., Gluckman E., Beauvais B., Devergie A., Melo R., Monny M. et Larivière M.** (1986) *Toxoplasma* infection after human allogeneic bone marrow transplantation: clinical and serological study of 80 patients. *Bone Marrow. Transpl.* **1**:67
- Derouin F., Sulcebe G. et Ballet J.J.** (1987) Sequential determination of IgG subclasses and IgA specific antibodies in primary and reactivating toxoplasmosis. *Biomed. Pharmacother.* **41**: 429
- Derouin F., Sarfati C., Beauvais B., Iliou M.C., Dehen L. et Larivière M.** (1989) Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1661.
- Desgeorges P.T., Billault X., Ambroise-Thomas P. et Bouttaz M.** (1980) Mise en évidence et cinétique d'apparition d'exo-antigènes produits par *Toxoplasma gondii* en culture *in vitro*. *Lyon Méd.* **243**: 737.
- Desmots G., Couvreur J., Alison F., Baudelot J., Gerbeaux J. et Lelong M.** (1965) Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: de l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* **10**: 952.
- De Titto E.H., Catterall J.R. et Remington J.S.** (1986) Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **137**: 1342
- Douglass Th.G. et Speer C.A.** (1985) Effects of intestinal contents from normal and immunized mice on sporozoites of *Eimeria falciformis*. *J. Protozool.* **32**: 156
- Dubey J.P. et Frenkel J.K.** (1976) Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J. Protozool.* **23**: 537
- Dubey J.P. et Beattie C.P.** (1988) Toxoplasmosis of animals and man. *CRC Press, Inc. Boca Raton, Floride.*

- Dubremetz J.F., Rodriguez C. et Ferreira E.** (1985) *Toxoplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. *Exp. Parasitol.* **59**: 24.
- Dunkley M.L., Husband A.J. et Underdown B.J.** (1990) Cognate T-cell help in the induction of IgA responses in vivo. *Immunol.* **71**: 16
- Duquesne V., Auriault C., Darcy F., Decavel J.P. et Capron A.** (1990) Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigens (ESA) specific helper T cells. *Inf. Immun.* **58**: 2120.
- Egan M.L., Pritchard D.G., Dillon H.C. et Gray B.M.** (1983) Protection of mice from experimental infection with type III group B streptococcus using monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **158**: 1006
- Elson C.O.** (1989) Cholera toxin and its subunit as potential oral adjuvants. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**: 29
- Elson C.O., Heck J.A. et Stober W.** (1979) T cell regulation of murine IgA synthesis. *J. Exp. Med.* **149**: 632
- Evans R.T., Emmings F.G. et Genco R.J.** (1975) Prevention of streptococcus mutans infection of tooth surfaces by salivary antibody in irus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Infect. Immun.* **12**: 293
- Favre G., Bessières M.H. et Seguela J.P.** (1984) Dosage des IgA sériques spécifiques de la toxoplasmose par une méthode E.L.I.S.A.. Application à 120 cas. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **3**: 139.
- Feldman H.A. et Lamb G.A.** (1966) A micromodification of the *Toxoplasma* dye test. *J. Parasitol.* **52**: 415.
- Ferguson D.L.P. et Hutchison W.M.** (1987) An ultrastructural study of the early development and tissue cyst formation of *Toxoplasma gondii* in the brains of mice. *Parasitol. Res.* **73**: 483.
- Ferguson D.L.P., Hutchison W.M. et Pettersen E.** (1989) Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* **75**: 599.
- Fischer M.M., Nagy B., Bazin H. et Underdown B.J.** (1979) Biliary transport of IgA: role of secretory component. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 2008
- Forestier F., Daffos F., Giovangrandi Y., Mac Aleese J. et Thulliez P.H.** (1990) Réponses foetales aux infections maternelles transmises. Immunologie de la reproduction (Voisin G.A., Edelman P., Genetet N., Bach J.F., Sureau C eds., *Medecine - Sciences ; Flammarion, Paris*, p427
- Foster B.G. et McCulloch W.F.** (1968) Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. *Can. J. Microbiol.* **14**: 103.
- Foussard F., Leriche M A. et Dubremetz J.F.** (1991) Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. *Parasitol.* **102**: 367.
- Frenkel J.K.** (1948) Dermal hypersensitivity to toxoplasma antigens (Toxoplasmins). *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* **68**: 634
- Frenkel J.K.** (1967) Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.* **98**: 1309.

- Frenkel J.K.** (1988) Pathophysiology of toxoplasmosis. *Parasitol. Today* **4**: 273.
- Frenkel J.K.** (1990) Toxoplasmosis in human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **196**: 240
- Frenkel J.K., Dubey J.P. et Miller N.L.** (1969) *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science*. **164**: 432.
- Frenkel J.K., Dubey J.P. et Miller N.L.** (1970) *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*. **167**: 893.
- Frenkel J.K. et Taylor D.W.** (1982) Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. *Infect. Immun.* **38**: 360
- Freyre A., Dubey J.P., Smith D.D et Frenkel J.K.** (1989) Oocyst-induced *Toxoplasma gondii* infections in cats. *J.Parasitol* **75**: 750
- Fubara E.S. et Freter R.** (1973) Protection against enteric bacterial infections by secretory antibodies. *J. Immunol.* **111**: 395
- Fuhrman S.A. et Joiner K.A.** (1989) *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement mediated-killing. *J. Immunol.* **142**: 940.
- Fukui Y., Fukui K. et Moriyama T.** (1973) Inhibition of enzymes by human salivary immunoglobulin A. *Infect. Immun.* **8**: 335.
- Gallois Y., Foussard F., Girault A., Hodberg J., Tricaud A., Mauras G. et Motta C.** (1988) Membrane fluidity of *Toxoplasma gondii*: a fluorescence polarization study. *Biol.Cell.* **62**: 11
- Gills H.S. et Prakash O.** (1970) A study on the active and passive immunity in experimental toxoplasmosis. *Indian J. Med. Res.* **58**: 1157.
- Godard I., Darcy F., Deslée D., Dessaint J.P. et Capron A.** (1990) Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. *Infect. Immun.* **58**: 2246
- Goldman M., Carver R.K. et Sulzer A.J.** (1958) Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J.Parasitol.* **44**:161
- Grazzini R.T., Hakim F.T., Hieny S., Shearer G.M. et Sher A.** (1991) Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN  $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol.* **146**: 286
- Gregory R.L., Rundegren J. et Arnold R.R.** (1987) Separation of human IgA1 and IgA2 using jacalin-agarose chromatography. *J. Immunol. Meth.* **99**: 101
- Grenay P., Candolfi E. et Kien T.** (1985) Immunoglobulines A spécifiques dans la toxoplasmose expérimentale de la souris. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **3**: 61
- Grimwood J. et Smith J.E.** (1992) *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion. *Exp. Parasitol.* **74**: 106.
- Grzych J.M., Capron M., Dissous C. et Capron A.** (1984) Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *J. Immunol.* **133**: 998

- Grzych J.M., Grezel D., Xu Chuan Bo, Neyrinck J.L., Capron M., Butterworth A.E. et Capron A.** (1992) IgA antibodies to a protective antigen in human *S. mansoni* schistosomiasis. *J. Immunol.* Soumis pour publication.
- Gustafson P.V., Agar H.D. et Cramer D.I.** (1954) An electron microscope study of *Toxoplasma*. *Ann. J. Trop. Med. Hyg.* **3**: 1008
- Guy-Grand D., Malassis-Seris M., Briottet C. et Vassali P.** (1991) Cytotoxic differentiation of mouse gut thymodependant and independent intraepithelial T lymphocytes is induced locally. Correlation between functional assays, presence of perforin and granzyme transcripts, and cytoplasmic granules. *J. Exp. Med.* **173**: 1549
- Halsey J.F., Johnson B.H. et Cebra J.J.** (1980) Transport of immunoglobulins from serum into colostrum. *J. Exp. Med.* **151**: 767
- Handman E. et Remington J.S.** (1980a) Serological and immunochemical characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Immunology.* **40**: 579.
- Handman E., Goding J.W. et Remington J.S.** (1980b) Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **124**: 2578.
- Harriman G.R., Kunitomo D.Y., Elliott J.F., Paetkau V. et Strober W.** (1988) The role of IL5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.* **140**: 3033
- Hauser W.E. et Remington J.S.** (1981) Effect of monoclonal antibodies on phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Infect. Immun.* **32**: 637.
- Hauser W.E. et Tsai V.** (1986) Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T.gondii* *in vitro*. *J. Immunol.* **136**: 313.
- Heyworth M.F.** (1989) Intestinal IgA responses to *Giardia muris* in mice depleted or helper T lymphocytes and in immunocompetent mice. *J. Parasitol.* **75**: 246
- Holland G.N., Engstrom R.E., Glasgow B.J., Berger B.B., Daniels S.A., Sidikaro Y., Harwon J.A., Fischer D.H., Boyer D.S., Rao N.A., Eagle R.C. jr., Kreiger A.E et Foos R.Y.** (1988) Ocular toxoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **106**: 653
- Hopp T.P. et Woods K.R.** (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3824.
- Hughes H.P.A.** (1988) Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol. Today.* **4**: 340
- Hughes H.P.A. et Van Knapen F.** (1982) Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. *Int. J. Parasitol.* **12**: 433..
- Hughes H.P.A., Gonzales A., Guhl F. et Hudson L.** (1985) Antigen-specific lymphocyte transformation in congenital toxoplasmosis. *Immunol. Letters* **10**: 95.
- Hughes H.P.A., Kasper L.H., Little J. et Dubey J.P.** (1988) Absence of a role for natural killer cells in the control of acute infection by *Toxoplasma gondii* oocysts. *Clin. Exp. Immunol.* **72**: 394
- Huldt G.** (1966) Experimental toxoplasmosis. Studies of the multiplication and spread of *Toxoplasma* in experimentally infected rabbits. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **67**: 401.

- Huldt G.** (1971) Studies on experimental toxoplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **177**: 146.
- Hunter W.H. et Greenwood F.C.** (1962) Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature.* **194**: 495.
- Hutchison W.M.** (1967) The nematode transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **61**: 80.
- Hutchison W.M., Dunachie J.F., Süm J.C. et Work K.** (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br. Med. J.* **1**:142.
- Huskinson J., Stepick-Biek P.N., Araujo F.G., Thulliez P., Suzuki Y. et Remington J.S.** (1989) *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2031
- Huskinson J., Thulliez P. et Remington J.S.** (1990) *Toxoplasma* antigens recognized by human immunoglobulin IgA antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2632
- Israelski D.M. et Remington J.S.** (1988) Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2**: 429.
- Jacobs L., Remington J.S. et Melton M.L.** (1960a) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **46**: 11.
- Jacobs L., Remington J.S. et Melton M.L.** (1960b) A survey of meat samples from swine, cattle and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* **46**: 23.
- Jacquemin P et Jacquemin J.L.** (1980) Abrégé de parasitologie clinique. *Masson Eds.France*
- Jadin J.M. et Creemers J.** (1968) Ultrastructure et biologie des toxoplasmes III. Observations de toxoplasmes intraérythrocytaires chez un mammifère. *Acta Tropica.* **25**: 267
- Jaffe C.L., Grimaldi G. et McMahon-Pratt D.** (1984) The cultivation and cloning of *Leishmania*, dans *Genes and antigens of parasites: a laboratory Manual*, 2ème ed. C. M. Moser, Rio de Janeiro.
- James S.P., Cheung Kwan W. et Sneller M.C.** (1990) T cells in inductive and effector compartments of the intestinal mucosal immune system of nonhuman primates differ in lymphokine mRNA expression, lymphokine utilization and regulatory function. *J. Immunol.* **144**: 1251.
- Janin J.** (1979) Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature.* **277**: 491.
- Janku J.** (1923) Pathogénèse et anatomie pathologique de la macula dans un oeil de dimension normale et dans un oeil microphthalmal avec parasite dans la rétine. *Cas. Lek. Cesk.* **62**: 1021.
- Jarvis G.A. et Griffis J.M.** (1989) Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.* **143**: 1703
- Jarvis G.A. et Griffiss McLeod.** (1991) Human IgA1 blockade of IgG-initiated lysis of *Neisseria meningitidis* is a function of antigen-binding fragment binding to the polysaccharide capsule. *J. Immunol.* **146**: 1962
- Johnson A.M.** (1985) The antigenic structure of *Toxoplasma gondii*: a review. *Pathology.* **17**: 9.

- Johnson A.M.** (1989) *Toxoplasma* vaccines. In *Veterinary protozoan and hemoparasite vaccines* (I.G. Wright, ed) CRC press, Boca Raton, Florida, p177.
- Johnson A.M.** (1990) *Toxoplasma*: biology, pathology, immunology and treatment. In *Coccidiosis of man and domestic animals*, CRC press, Boca Raton, Florida, USA p121
- Johnson A.M., McDonald P.J. et Neoh S.H.** (1983a) Molecular weight analysis of soluble antigens from *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **69**: 459.
- Johnson A.M., McDonald P.J. et Neoh S.H.** (1983b) Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.* **30**: 351.
- Joiner K.A., Furtado G., Mellman I., Kleiman H., Miettinen H., Kasper L.H., Hall L. et Fuhrman S.A.** (1989) Cell attachment and invasion by tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell. Biochem.* **13E**: 64
- Joiner K.A., Fuhrman S.A., Miettinen H.M., Kasper L.H. et Mellman I.** (1990) *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* **249**: 641
- Jones T.C., Yeh S. et Hirsch J.G.** (1972a) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I. Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. *J. Exp. Med.* **136**: 1157
- Jones T.C. et Hirsch J.G.** (1972b) The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II. The absence of lysosomal fusion with the phagocytic vacuoles containing living parasites. *J. Exp. Med.* **136**: 1173
- Jones T.C., Len L. et Hirsch J.G.** (1975) Assessment *in vitro* of immunity against *Toxoplasma gondii*. *J. Exp. Med.* **141**: 466.
- Julius M.H., Simpson E. et Herzenberg L A.** (1973) A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3**: 645.
- Kaplan B.S., Uni S., Aikawa M. et Mahmoud A.A.F.** (1985) Effector mechanism of host resistance in murine giardiasis specific IgG and IgA cell-mediated toxicity. *J. Immunol.* **134**: 1975.
- Kasper L.H.** (1987) Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* **9**: 433.
- Kasper L.H.** (1989) Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **57**: 668.
- Kasper L.H., Crabb J.H. et Pfefferkorn E.R.** (1982) Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **129**: 1694.
- Kasper L.H., Crabb J.H. et Pfefferkorn E.R.** (1983) Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *J. Immunol.* **130**: 2407.
- Kasper L.H., Bradley M.S. et Pfefferkorn E.R.** (1984) Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **132**: 443.

- Kasper L.H., Currie K.M. et Bradley M.S.** (1985) An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **134**: 3426.
- Kasper L.H. et Ware P.L.** (1985b) Recognition and characterization of stage-specific oocyst/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. *J. Clin. Invest.* **75**: 1570.
- Kasper L.H., Khan I.A., Ely K.H., Buelow R. et Boothroyd J.C.** (1992) Antigen-specific (P30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **148**: 1493.
- Kawanishi H., Saltzman L.E et Strober W.** (1983) Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* **157**: 433
- Kerr A.M.** (1990) The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* **271**: 285
- Khan I.A., Eckel M.E., Pfefferkorn E.R. et Kasper L.H.** (1988a) Production of  $\gamma$  interferon by cultured human lymphocytes stimulated with a purified membrane protein (P30) from *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **157**: 979
- Khan I.A., Smith K.A. et Kasper L.H.** (1988b) Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **141**: 3600.
- Khan I.A., Smith K.A. et Kasper L.H.** (1990) Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J. Clin. Invest.* **85**: 1879
- Khan I.A., Ely K.H. et Kasper L.H.** (1991) A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* **147**: 3501
- Kimata I. et Tanabe K.** (1987) Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated within the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. *J. Cell. Sci.* **88**: 231
- Kiyono H., Mosteller-Barnum L.M., Pitts A.M., Williamson S.I., Michalek S.M. et McGhee J.R.** (1985) Isotype-specific immunoregulation. IgA-binding factors produced by Fc $\alpha$  receptor-positive T cell hybridomas regulate IgA responses. *J. Exp. Med.* **161**: 731
- Konishi E.** (1987) A pregnant woman with a high level of naturally occurring immunoglobulin M antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **157**: 832
- Krahenbuhl J.L., Gaines J.D. et Remington J.S.** (1972) Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **125**: 283.
- Kutteh W.H., Prince S.J. et Mestecky J.** (1982) Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J. Immunol.* **128**: 990
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680.

- Lainson R.** (1958) Observations on the development and nature of pseudocysts and cysts of *Toxoplasma gondii*. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* **52**:396
- Laugier M. et Quilici M.** (1970) Intérêt expérimental d'une souche de toxoplasme peu pathogène pour la souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* (Paris) **45**: 389.
- Le Fichoux Y., Marty P. et Chan H.** (1987) Les IgA sériques spécifiques dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Ann. Pédiatr. (Paris)*. **34**: 375.
- Lemaître-Coelho I., Jackson G.D.F. et Vaerman J.P.** (1978) High levels of secretory IgA and free secretory component in the serum of rats with bile duct obstruction. *J. Exp. Med.* **147**: 934
- Lerliche M.A. et Dubremetz J.F.** (1990) Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. *Parasitol. Res.* **76**: 559
- Lerliche M.A. et Dubremetz J.F.** (1991) Characterization of the protein contents of rhoptries and dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites by subcellular fractionation and monoclonal antibodies. *Mol. Biochem. Parasitol.* **45**: 249
- Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honiberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., LON J., Lynn D., Merifield E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J. et Wallace F.G.** (1980) A newly revised classification of the Protozoa. *J.Parasitol.* **27**: 37
- Lindberg R.E. et Frenkel J.K.** (1977) Toxoplasmosis in nude mice. *J. Parasitol.* **63**: 219
- Littlefield J.W.** (1964) Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science.* **145**: 709.
- Luft B.J., Naot Y., Araujo F.G., Stinson B. et Remington J.S.** (1983) Primary and reactivated *Toxoplasma* infection in patients with cardiac transplants. Clinical spectrum and problems in diagnosis in a defined population. *Ann. Intern. Med.* **99**: 27
- Luft B.J., Kansas G., Engleman E.G. et Remington J.S.** (1984a) Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **150**: 761
- Luft B.J., Brooks R.G., Conley F.K., McCabe R.E. et Remington J.S.** (1984b) Toxoplasmic encephalitis in patients with Acquired Immune Deficiency Syndrome. *J.Am.Med.Assoc.* **252**: 913.
- Luft B.J. et Remington J.S.** (1988) Aids commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **157**: 1.
- Luzzati A.L. et Jacobson E.B.** (1972) Serum immunoglobulin levels in nude mice. *Eur. J. Immunol.* **2**: 473
- Lycke E. et Norrby R.** (1966) Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultured hosts cells. *Br. J. Exp. Pathol.* **47**: 248.
- Lycke E., Carlberg K. et Norrby R.** (1975) Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the Penetration-Enhancing Factor of *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* **11**: 853.

- Lycke N. et Holmgren J.** (1986) Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunol.* **59**: 301
- Lycke N., Eriksen L. et Holmgren J.** (1987) Protection against cholera toxin after immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. *Scand. J. Immunol.* **25**: 413
- Lycke N., Bromander A.K., Ekman L., Karlsson U. et Holmgren J.** (1989) Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin *in vitro* with possible association to the adjuvant function *in vivo*. *J. Immunol.* **142**: 20
- Lycke N. et Strober W.** (1989) Cholera toxin promotes B cell isotype differentiation. *J. Immunol.* **142**: 3781
- Maddison S.E., Sleminda S.B. et Teutsch S.M.** (1979) Lymphocyte proliferative responsiveness in 31 patients after an outbreak of toxoplasmosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **28**: 955
- Magnusson K.E. et Stjernström I.** (1982) Mucosal barrier mechanisms. Interplay between secretory IgA (S. IgA), IgG and mucins on the surface properties and association of *Salmonellae* with intestine and granulocytes. *Immunol.* **45**: 239
- Maizels R.M., Kennedy M.W., Meghji M., Robertson B.D. et Smith H.V.** (1987) Shared carbohydrate epitopes on destruct surface and secreted antigens of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J. Immunol.* **139**: 207
- Makioka A. et Kobayashi A.** (1991a) Toxoplasmidal activity of macrophages activated by recombinant major surface protein antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59**: 2851
- Makioka A. et Kobayashi A.** (1991b) Expression of the major surface antigen (P30) gene of *Toxoplasma gondii* as an insoluble glutathione-S-transferase fusion protein. *Jpn. J. Parasitol.*, in press.
- Makioka A., Suzuki Y. et Kobayashi A.** (1991c) Recognition of tachyzoite and bradyzoite antigens of *Toxoplasma gondii* by infected hosts. *Infect. Immun.* **59**: 2763
- McCabe R.E., Luft B.J. et Remington J.S.** (1984) Effect of murine interferon  $\gamma$  on murine toxoplasmosis. *Infect. Immun.* **58**: 3050
- McCabe R.E. et Remington J.S.** (1986) Mechanisms of killing of *Toxoplasma gondii* by rat peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **52**: 151.
- McCabe R.E. et Remington J.S.** (1988) Toxoplasmosis: the time has come. *New. Engl. J. Med.* **318**: 313
- McGhee J.R., Mestecky J., Elson C.O. et Kiyono H.** (1989) Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.* **9**: 175
- McGhee J.R., Mestecky J., Dertzbaugh M.T., Eldridge J.H., Hirasawa M. et Kiyono H.** (1992) The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine.* **10**: 75
- McLeod R., Estes R.G., Mack D.G. et Cohen H.** (1984) Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: A model of *Toxoplasma* infection acquired by ingestion. *J. Infect. Dis.* **149**: 234

- McLeod R., Beem M.O. et Estes R.G. (1985) Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Lab. Immunol.* **17**: 149
- McLeod R et Mack D G. (1986) Secretory IgA specific for *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **136**: 2640
- McLeod R., Mack D. et Brown C. (1991) *Toxoplasma gondii*: New advances in cellular and molecular biology. *Exp. Parasitol.* **72**: 109
- Mestecky J. et Russel M.W. (1986) IgA subclasses. *Monogr. Allergy.* **19**: 277
- Mestecky J. et McGhee J (1987) Immunoglobulin A (IgA): molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. *Adv. Immunol.* **40**: 153
- Mitchell C.D, Erlich S.S., Mastrucci M.T., Hutto S.C., Parks W.P. et Scott G.B. (1990) Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**: 512
- Mosmann T.R. et Coffman R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**: 145
- Murray H.W., Juangbhanich C.W., Nathan C.F. et Cohn Z.A. (1979) Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* **150**: 950
- Murray H.W., Rubin B.Y., Carriero S.M., Harris A.M. et Jaffe E.A. (1985) Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **134**: 1982.
- Nagasawa H., Manabe T., Maekawa Y., Oka M. et Himeno K. (1991) Role of L3T4+ and Lyt2+ T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Immunol.* **35**: 215
- Nagel S.D. et Boothroyd J.C. (1989) The major surface antigen P30 of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* **264**: 5569
- Nakao M et Konishi E. (1991a) Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils in vitro. *Parasitol.* **103**: 23
- Nakao M. et Konishi E. (1991b) Neutrophil chemotactic factors secreted from *Toxoplasma gondii*. *Parasitol.* **103**: 29
- Nichols B.A. et O'Connor G.R. (1981) Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. *Lab. Invest.* **44**: 324.
- Nichols B.A., Chiappino M.L. et O'Connor G.R. (1983) Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. *J. Ultrastruct. Res.* **83**: 85.
- Nichols B.A. et Chiappino M.L. (1987) Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. *J. Protozool.* **34**: 217.
- Nicolle C. et Manceaux L. (1908) Sur un potozoaire nouveau du gondi. *C. R. Acad. Sci.* **148**: 369

**Nussenblatt R.B., Mittal K.K., Fuhrman S., Sharma S.D. et Palestine A. G.** (1989) Lymphocyte proliferative responses of patients with ocular toxoplasmosis to parasite and retinal antigens. *Am. J. Ophth.* **107**: 632

**Ogra P.L., Leibowitz E.E. et Zhao-RI G.** (1989) Oral immunization and secretory immunity to viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**: 73

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

**Orlans E., Peppard J., Reynolds J. et Hall J.** (1978) Rapid active transport of immunoglobulin A from blood to bile. *J. Exp. Med.* **147**: 588.

**Ouaissi M.A., Taibi A., Cornette J., Velge P., Marty B., Loyens M., Esteva M., Rizvi F.S. et Capron A.** (1990) Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigens. *Parasitol.* **100**: 115

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

**Parker S.J., Roberts C.W. et Alexander J.** (1991) CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **84**: 207

**Partanen P., Turunen H.J., Paasivuo R., Forsblom E., Suni J. et Leinikki P.O.** (1983) Identification of antigenic components of *Toxoplasma gondii* by an immunoblotting technique. *Fed. Europ. Biochem. Soc.* **158**: 252

**Partanen P., Turunen H.J., Paasivuo R. et Leinikki P.O.** (1984) Immunoblot analysis of *Toxoplasma gondii* antigens by human immunoglobulins G, M, and A antibodies at different stages of infection. *J. Clin. Microbiol.* **20**: 133.

**Pavesio C.E.N., Chiappino M.L., Setzer P.Y. et Nichols B.A.** (1992) *Toxoplasma gondii*: differentiation and death of bradyzoites. *Parasitol. Res.* **78**: 1

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

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

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

**Pfefferkorn E.R., Pfefferkorn L.C. et Colby E.D.** (1977) Development of gametes and oocysts in cats cysts derived from cloned trophozoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* **63**: 158

**Pfefferkorn E.R., Eckel M. et Rebhun S.** (1986) Interferon  $\gamma$  suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.* **20**: 215

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

- Pinon J.M., Thoannes H. et Gruson N.** (1985) An Enzyme-Linked Immuno-Filtration Assay used to compare infant and maternal antibody profiles in toxoplasmosis. *J. Immunol. Meth.* **77**: 15.
- Pinon J.M., Poirriez J., Leroux B., Thoannes H., Dupouy D., Gari H., Jezierski J. et Quereux C.** (1986a) Diagnostic précoce, surveillance et bilan thérapeutique de la toxoplasmose congénitale. Indications des profils immunologiques comparés E.L.I.F.A. *Rev. Intern. Pediatr.* **157**: 11
- Pinon J.M., Thoannes H., Pouletty P.H., Poirriez J., Damiens J. et Pelletier P.** (1986b) Detection of IgA specific for toxoplasmosis in serum and cerebrospinal fluid using a non-enzymatic IgA-capture assay. *Diagn. Immunol.* **4**: 223.
- Pinon J.M., Poirriez J., Leroux B., Dupouy D., Quéreux C., et Garin J.P.** (1987) Diagnostic précoce et surveillance de la toxoplasmose congénitale: méthodes des profils immunologiques comparés. *Presse. Med.* **16**: 471
- Pinon J.M., Toubas D., Marx C., Mougeot G., Bonnin A., Bonhomme A., Villaume H., Foudrinier F. et Lèpan H.** (1990) Detection of specific Immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 1739.
- Pinon J.M., Foudrinier F., Mougeot G., Niel G., Marx C., Bonnin A., Tirard V., Bessièrès M.H., Danis M., Camerlynck P., Seguela J.P., Remy G. et Frottier J.** (1991) Pic-ELIFA et isotypes spécifiques IgA ou IgE dans l'évaluation des risques toxoplasmiques chez les sujets immunodéprimés. *Rev. Fr. Lab.* **223**: 103
- Porchet-Henneré E. et Torpier G.** (1983) Relations entre *Toxoplasma* et sa cellule hôte. *Protistologica* **3**: 357
- Potasman I., Araujo F.G., Desmots G. et Remington J.S.** (1986) Analysis of *Toxoplasma gondii* antigens recognized by human sera obtained before and after acute infection. *J. Infect. Dis.* **154**: 650
- Prince J.B., Araujo F.G., Remington J.S., Burg J.L., Boothroyd J.C. et Sharma S.D.** (1989) Cloning of cDNAs encoding 28 kilodalton antigen of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **34**: 3.
- Prince J.B., Auer K.L., Huskinson J., Parmley S.F., Araujo F.G. et Remington J.S.** (1990) Cloning, expression and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **43**: 97
- Pujol M., Morel B. et Malbruny B.** (1989) Intérêt de la recherche des IgA dans le diagnostic de la toxoplasmose. *Path. Biol.* **37**: 893.
- Remington J.S. et Cavanaugh E.N.** (1965) Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from skeletal muscle and brain. *New Engl. J. Med.* **273**: 1308.
- Remington J.S. et Krahenbuhl J.L.** (1982) Immunology of *Toxoplasma gondii*. in: *Comprehensive Immunology* (A.J. Nahmias and J.R. O'Reilly, eds) pp 327-371. Plenum Publishing Company, New York.
- Ridel P.R., Auriault C., Darcy F., Pierce R., Leite P., Santoro F., Neyrinck J.L., Kusnierz J.P. et Capron A.** (1988) Protective role of IgE in immunocompromized rat toxoplasmosis. *J. Immunol.* **141**: 978.

- Roach T.I.A., Else K.J., Wakelin D.W., McLaren D.J. et Grencis R.K.** (1991) *Trichuris muris*: antigen recognition and transfer of immunity in mice by IgA monoclonal antibodies. *Parasite. Immunol.* **13**: 1
- Roques C., Bessieres M.H. et Seguela J.P.** (1986) Caractérisation immunochimique des protéines des exo-antigènes provenant de différentes souches de *Toxoplasma gondii*. *Bull. Soc. Fr. Parasitol.* **4**: 79.
- Rougier D. et Ambroise-Thomas P.** (1985) Detection of toxoplasmic immunity by multipuncture skin test with excretory-secretory antigens. *Lancet* **11**: 121
- Russel-Jones G.J., Ey P.L. et Reynolds B.L.** (1980) The ability of IgA to inhibit the complement mediated-lysis of target red blood cells sensitized with IgG antibody. *Mol. Immunol.* **17**: 1173
- Russel-Jones G.J., Ey P.L. et Reynolds B.L.** (1981) Inhibition of cutaneous anaphylaxis and arthus reactions in the mouse by antigen-specific IgA. *Int. Arch. Allerg. Immunol.* **66**: 316
- Russel-Jones G.J. et Gotschlich E.C.** (1986) Identification of protein antigens of group B streptococci with special reference to the 1bc antigens. *J. Exp. med.* **160**: 1476
- Sabin A.B.** (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. Med. Assoc.* **116**: 801.
- Sabin A.B.** (1942) Toxoplasmosis, a recently recognized disease of human beings. *Adv. Pediatr.* **1**: 1.
- Sabin A.B. et Feldman H.A.** (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). *Science.* **108**: 660.
- Sacks D.L. et Rosancela da Silva P.** (1987) The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with cell surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. *J. Immunol.* **139**:3099
- Sadak A., Taghy Z., Fortier B. et Dubremetz J.F.** (1988) Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **29**: 203.
- Saffer L.D., Long-Krug S.A. et Schwartzman J.D.** (1989) The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **40**: 145
- Saffer L.D. et Schwartzman J.D.** (1991) A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J. Protozool.* **38**: 454
- Saito K., Kato C., Katsuragi H. et Komatsuzaki A.** (1991) IgA-mediated inhibition of human leucocyte function by interference with Fc $\gamma$  and C3b receptors. *Immunol.* **74**: 99
- Santoro F., Afchain D., Pierce R.J., Cesbron J.Y., Ovlaque G., et Capron A.** (1986) Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). *Clin. Exp. Immunol.* **62**: 262
- Santoro F., Auriault C., Leite P., Darcy F. et Capron A.** (1987) Infection du rat athymique par *Toxoplasma gondii*. *C. R. Acad. Sc. Paris.* **11**: 297.
- Schoenbeck S., McKenzie D.T. et Kagnoff M.F.** (1989) Interleukin 5 is a differentiation factor for IgA B cells. *Eur. J. Immunol.* **19**: 965

- Schwartzman J.D.** (1986) Inhibition of a Penetration-Enhancing Factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. *Infect. Immun.* **51**: 760.
- Schwartzman J.D. et Krug E.C.** (1989) *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. *Exp. Parasitol.* **68**: 74.
- Schwartzman J.D. Gonias S.L. et Pfefferkorn E.R.** (1990) Murine gamma interferon fails to inhibit *Toxoplasma gondii* in murine fibroblasts. *Infect. Immun.* **58**: 833
- Seguela J.P.** (1982) Cinétique des anticorps IgA, IgG, IgM, dans la toxoplasmose Lyon. *Med.* **248**:21
- Sethi K.K., Endo T. et Brandis H.** (1981) *Toxoplasma gondii* trophozoites pre-coated with specific monoclonal antibodies cannot survive within normal murine macrophages. *Immunol. Letters* . **2**: 343.
- Sharma S.D.** (1990) Immunology of Toxoplasmosis, in *Modern Parasite Biology, Cellular, Immunological and Molecular aspects*, Eds. by D.J.Wyler, W.H. Freeman and Co., N.Y., p184
- Sharma S.D., Mullenax J., Araujo F.G., Erlich H.A. et Remington J.S.** (1983) Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. *J. Immunol.* **131**: 977.
- Sharma S.D., Araujo F.D. et Remington J.S.** (1984) Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **133**: 2818.
- Sharma S.D., Hofflin J.M. et Remington J.S.** (1985) *In vivo* recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **135**: 4160.
- Sheffield H.G. et Melton M.L.** (1969) *Toxoplasma gondii*: transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. *Science.* **164**: 431.
- Sheffield H.G. et Melton M.L.** (1970) *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science.* **167**: 892.
- Shulman M., Wilde C.D. et Köhler G** (1978) A better line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature.* **276**: 269
- Sibley L.D., Weidner E. et Krahenbuhl J.L.** (1985) Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* **315**: 416.
- Sibley L.D., Krahenbuhl J.L., Adams G.M. et Weidner E.** (1986) *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. *J. Cell. Biol.* **103**: 867.
- Sibley L.D. et Sharma S.D.** (1987) Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infect. Immun.* **55**: 2137.
- Sibley L.D. et Krahenbuhl J.L.** (1988) Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. *Eur. J. Cell Biol.* **47**: 81

- Sims T.A., Hay J. et Talbot I.C.** (1988) Host parasite relationship in the brains of mice with congenital toxoplasmosis. *J.Pathol.* **156**:255
- Sonoda E., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishi T., Sugimoto M., Araki M et Tominaga A., Yamaguchi N. et Takatsu K** (1989) Transforming growth factor  $\beta$  induces IgA production and acts additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.* **170**: 1415
- Splendore A.** (1909) Sur un nouveau protozoaire parasite de lapin, 2ème note préliminaire. *Bull. Soc. Path. Exot.* **2**: 462.
- Steinitz M., Tamir S., Ferne M. et Goldfarb A.** (1986) A protective human monoclonal IgA antibody produced in vitro: anti-pneumococcal antibody engendered by Epstein-Barr virus-immortalized cell line. *Eur. J. Immunol.* **16**: 187
- Stepick-Biek P., Thulliez P., Araujo F.G. et Remington J.S.** (1990) IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.* **162**: 270.
- Subauste C.S., Koniaris A.H. et Remington J.S.** (1991) Murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected-cells. *J. Immunol.* **147**: 3955
- Suzuki Y. et Remington J.S.** (1988a) Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2<sup>+</sup> and Lyt-1<sup>+</sup>, L3T4<sup>+</sup> T cells in mice. *J. Immunol.* **140**: 3943.
- Suzuki Y., Orellana M.A., Schreiber R.D. et Remington J.S.** (1988b) Interferon- $\gamma$  the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* **240**: 516.
- Suzuki Y., Thulliez P., Desmots G. et Remington J.S.** (1988c) Antigen(s) responsible for immunoglobulin G responses specific for the acute stage of *Toxoplasma* infection in humans. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 901
- Suzuki Y., Conley F.K. et Remington J.S.** (1989) Importance of endogenous interferon  $\gamma$  in prevention of toxoplasmic encephalitis in mice *J. Immunol.* **143**: 2045
- Suzuki Y. et Remington J.S.** (1989) A method for obtaining large numbers of trophozoites of avirulent strains of *Toxoplasma gondii* using an antibody to interferon gamma. *J. Parasitol.* **75**: 174
- Suzuki Y. et Remington J.S.** (1990a) The effect of anti IFN  $\gamma$  antibody on the protective effect of Lyt -2 immune T cells against toxoplasmosis in mice *J. Immunol.* **144**: 1954
- Suzuki Y., Conley F.K. et Remington J.S.** (1990b) Treatment of *Toxoplasma* encephalitis in mice with recombinant gamma interferon *Infect. Immun.* **58**: 3050
- Tagliabue A., Boraschi D., Villa L., Keren D.F., Lowell G.H., Rappuoli R. et Nencioni L.** (1984) IgA-dependent cell-mediated activity against enteropathogenic bacteria: distribution, specificity and characterization of the effector cells. *J. Immunol.* **133**: 988
- Taguchi T., McGhee J.R., Coffman R.L., Beagley K.W., Eldridge J.H., Takatsu K. et Kiyono H.** (1990) Analysis of TH1 and TH2 cells in murine gut-associated tissues. Frequencies of CD4+ and CD8+ T cells that secrete IFN  $\gamma$  and IL5. *J. Immunol.* **145**: 68

- Tailliez R., Floc'h F., Vernes A. et Biguet J.** (1974) Contribution à l'étude des phénomènes immunologiques dans la toxoplasmose expérimentale. II. Evolution cinétique qualitative et quantitative des constituants sériques chez la souris C.B.A. *Ann. Parasitol.* (Paris). **49**: 291
- Taylor H.P. et Dimmock N.J.** (1985) Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J. Exp. Med.* **161**: 198
- Tomasi T.B., Tan E.M., Solomon A. et Pendergast R.A.** (1965) Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exp. Med.* **121**: 101
- Tomasi T.B.** (1989) Regulation of the mucosal IgA response an overview. *Immunol. Invest.* **18**: 1
- Tomavo S., Schwarz R.T. et Dubremetz J.F.** (1989) Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 4576.
- Tomavo S., Fortier B., Soete M., Ansel C., Camus D. et Dubremetz J.F.** (1991) Characterization of bradyzoite specific stage antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **59**: 3750
- Towbin H., Staehelin T. et Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4350.
- Turunen H., Vuorio K.A. et Leinikki P.O.** (1983) Determination of IgG, IgM and IgA antibody responses in human toxoplasmosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Scand. J. Infect. Dis.* **15**: 307.
- Van Loon A.M., Van der Logt J.T.M., Heessen F.W.A. et Van der Veen J.** (1983) Enzyme-linked Immunosorbent Assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and A antibodies in toxoplasmosis: comparison with indirect Immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 997
- Velge-Roussel F., Verwaerde C., Grzych J.M., Auriault C. et Capron A.** (1989) Protective effects of antiidiotypic IgE antibodies obtained from an IgE monoclonal antibody specific for a 26 kilodalton *Schistosoma mansoni* antigen. *J. Immunol.* **142**: 2527
- Ware P.L. et Kasper L.H.** (1987) Strain-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **55**: 778.
- Warner N.L. et Marchalonis J.J.** (1972) Structural differences in mouse myeloma proteins of different allotypes. *J. Immunol.* **109**: 657
- Watanabe N. et Kobayashi A.** (1989) Regulation of immunoglobulin E in mice immunized with an extract of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **57**: 1405
- Wedrychowicz H., Maclean J.M. et Holmes P.H.** (1984) Secretory IgA responses in rats to antigens to various developmental stages of *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitol.* **89**: 145
- Weiss L.M., Udem S., Tanowitz A. et Willner M.** (1988) Western blot analysis of the antibody response of patients with A.I.D.S. and *Toxoplasma* encephalitis : antigenic diversity among *Toxoplasma gondii* strains. *J. Infect. Dis.* **157**: 7

**Werk R.** (1985) How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev.Infect.Dis.* **7**:449

**Williams R.C. et Gibbons R.** (1972) Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* **177**: 697

**Wilson C.B., Tsai Y. et Remington J.S.** (1980) Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. Possible mechanism for survival of intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* **163**:11

**Wilson C.B., Desmonts G., Couvreur J. et Remington J.S.** (1980) Lymphocyte transformation in the diagnosis of congenital *Toxoplasma infection*. *New. Engl. J. Med.* **302**: 785

**Winner III. L., Mack J., Weltzin R., Mekalanos J.J., Kraehenbuhl J.P. et Neutra M.R.** (1991) New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect. Immun.* **59**: 977

**Wold A.E., Mestecky J., Tomana M., Kobata A., Ohbayashi H., Endo T. et Svanborg-Eden C.** (1990) Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *E.coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* **58**: 3073

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

**Wolowczuk I., Auriault C., Bossus M., Boulanger D., Gras-Masse H., Mazingue C., Pierce R.J., Grezel D., Reid G.D., Tartar A. et Capron A.** (1991) Antigenicity and immunogenicity of a multiple peptidic construction of the *Schistosoma mansoni* Sm-28 GST antigen in rat, mouse, and monkey. I. Partial protection of Fischer rat after active immunization. *J. Immunol.* **146**: 1987

**Yano A., Aosai F., Ohta M., Hasekura H., Sugani K. et Hayashi S.** (1989) Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. *J. Parasitol.* **75**: 411

**Yong E.C., Chi E.Y., Fritsche T.R. et Henderson W.R.** (1991) Human platelet-mediated cytotoxicity against *Toxoplasma gondii*: role of thromboxane. *J. exp. Med.* **173**: 65

**TABLE DES MATIERES**

**RESUME**  
**INTRODUCTION**  
**GENERALITES**

<b>A. TOXOPLASMA GONDII: HISTORIQUE ET CLASSIFICATION</b>	p.17
<b>B. LE PARASITE: STRUCTURE ET EVOLUTION DES DIFFERENTS STADES PARASITAIRES</b>	p.19
<b>B.I. LE TACHYZOITE: FORME PROLIFERATIVE</b>	
<b>B.I.1. Structure</b>	
<b>B.I.2. Biologie du tachyzoite</b>	p.21
<b>B.II. BRADYZOITES ET KYSTES</b>	p.24
<b>B.III. FORMES DE LA PHASE SEXUEE DU CYCLE PARASITAIRE</b>	p.26
<b>B.III.1. Les schizontes</b>	
<b>B.III.2. Les gamétocytes</b>	p.27
<b>B.III.3. Les oocystes et les sporozoïtes</b>	
<b>C. LE CYCLE PARASITAIRE</b>	p.27
<b>C.I. LE CYCLE ASEXUE</b>	p.28
<b>C.II. LE CYCLE SEXUE</b>	
<b>D. LA TOXOPLASMOSE</b>	p.31
<b>D.I. LA TOXOPLASMOSE HUMAINE: ASPECTS CLINIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES</b>	
<b>D.I.1. La toxoplasmose acquise</b>	
<b>D.I.2. La toxoplasmose congénitale</b>	p.32
<b>D.II. LA TOXOPLASMOSE VETERINAIRE</b>	p.33
<b>E. STRUCTURE ANTIGENIQUE DE <i>T. GONDII</i></b>	p.35
<b>E.I. LE TACHYZOITE</b>	

<b>E.I.1. Les antigènes membranaires du tachyzoite</b>	p.38
<b>E.I.2. Les antigènes cytoplasmiques</b>	p.39
<b>E.I.3. Les antigènes sécrétés par le parasite</b>	p.40
E.I.3.a. Les antigènes excrétés-sécrétés (ES)	
E.I.3.b. Les antigènes de rhoptries	p.43
<b>E.II. LES ANTIGENES DES AUTRES STADES PARASITAIRES</b>	p.44
<b>F. LA REPONSE IMMUNE CONTRE <i>T.GONDII</i></b>	p.45
<b>F.I. IMPORTANCE DE LA REPONSE A MEDIATION CELLULAIRE</b>	
<b>F.I.1. Mise en évidence de la réponse à médiation cellulaire</b>	
<b>F.I.2. Implication des différentes cellules et de leurs produits de sécrétion dans l'immunité.</b>	p.46
F.I.2.a. Rôle des cellules à activité phagocytaire: macrophages et neutrophiles	p.48
F.I.2.b. Rôle des lymphocytes et des lymphokines	p.49
F.I.2.c. Rôle des cellules NK	p.51
F.I.2.d. Rôle des plaquettes	
<b>F.II. IMPORTANCE DE LA REPONSE HUMORALE DANS L'IMMUNITE</b>	p.52
<b>F.II.1. Rôle des anticorps dans la protection</b>	
F.II.1.a. Etudes par transferts passifs d'anticorps	
F.II.1.b. Principaux mécanismes d'action des anticorps	p.53
<b>F.II.2. Réponse anticorps et applications diagnostiques</b>	
F.II.2.a. Détection de la réponse anticorps d'isotype IgG et IgM	
F.II.2.b. Détection de la réponse anticorps d'isotype IgE et IgA	p.54
<b>G. LES ANTICORPS D'ISOTYPE IgA DANS L'IMMUNITE</b>	p.55
<b>G.I. STRUCTURE ET PROPRIETES BIOLOGIQUES DES IgA</b>	p.56
G.I.1. Les IgA sériques	
G.I.2. Les IgA sécrétoires	p.58
<b>G.II. LE SYSTEME IMMUNITAIRE MUQUEUX</b>	p.60
<b>G.III. REGULATION DE LA REPONSE IgA PAR LES LYMPHOCYTES T</b>	p.62
<b>G.IV. FONCTIONS CONNUES DES IgA</b>	p.65
G.IV.1. Neutralisation de virus	
G.IV.2. Fonctions antibactériennes	
G.IV.3. Fonctions antiparasitaires	p.66

## **MATERIEL ET METHODES**

<b>I. SOUCHES DE <i>T. GONDII</i></b>	p.68
I.1. La souche RH	
I.2. La souche 76K	
<b>II. PREPARATION DES EXTRAITS ANTIGENIQUES DE <i>T. GONDII</i></b>	
II.1. Préparation de l'extrait antigénique soluble: fraction S2	
II.2. Préparation de l'extrait antigénique membranaire: fraction "chaps"	p.69
II.3. Préparation de l'extrait total de tachyzoïtes	
II.4. Préparation des antigènes d'excrétion-sécrétion des tachyzoïtes (antigènes ES)	p.70
II.5. Préparation d'un extrait d'antigènes libérés par les tachyzoïtes en absence de calcium	
<b>III. ANALYSE IMMUNOCHIMIQUE DES PROTEINES DU TOXOPLASME</b>	p.71
III.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium dodécyl sulfate)	
III.2. Immunoélectrotransfert	
<b>IV. ETUDE DE LA REPONSE IgA DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX</b>	p.72
IV.1. Protocoles d'infection et d'immunisation des animaux	
IV.2. Protocoles d'immunisation par les antigènes excrétés-sécrétés	p.73
IV.3. Analyse par Immuno-empreinte ("Dot-Blot")	
<b>V. REPONSE IgA HUMAINE: ANALYSE DE SERUMS HUMAINS</b>	
V.1. Les sérums humains	
V.2. Le marquage d'anticorps par l'iode <sup>125</sup> I	p.75
V.3. Technique radioimmunologique	
<b>VI. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX IgA SPECIFIQUES DE <i>T. GONDII</i></b>	p.76
VI.1. Protocoles d'infection et d'immunisation	
VI.1.a. Protocoles d'infection	
VI.1.b. Protocoles d'immunisation	
VI.2. Hybridation cellulaire et sélection des hybrides	p.77
VI.2.a. Milieux utilisés	
VI.2.b. Préparation des cellules de myélome	
VI.2.c. Préparation des lymphocytes	
VI.2.d. Préparation des cellules nourricières	p.79

VI.2.e. Fusion cellulaire	
<b>VI.3. Sélection et analyse des clones producteurs d'anticorps d'isotype IgA</b>	p.80
<b>VI.4. Clonage des hybrides producteurs d'anticorps d'isotype IgA</b>	
<b>VI.5. Vérification de l'isotype IgA des anticorps produits</b>	
<b>VI.6. Production massive d'anticorps monoclonaux</b>	p.81
<b>VI.7. Caractérisation des clones</b>	
VI.7.a. Les techniques radioimmunologiques et immunoenzymatiques	
VI.7.b. Immuno-empreinte et électroimmunotransfert	p.82
VI.7.c. Tests d'immunocapture IgA anti-P30 et anti-P28,5 chez la souris	
VI.7.d. Réactions d'inhibition avec les peptides de la molécule P30	p.83
<b>VI.8. Evaluation de l'activité biologique des anticorps monoclonaux</b>	
VI.8.a. Test de lyse dépendante du complément	
VI.8.b. Transfert passif chez le rat "nude"	p.84
VI.8.c. Transfert passif chez la souris	
VI.8.d. Réalisation de tumeurs sous-cutanées chez la souris ("back-pack")	p.85
<b>VI.9. Purification des formes dimériques des monoclonaux IgA</b>	
<b>VII. CARACTERISATION D'EPITOPES T ET B DE LA MOLECULE P30</b>	p.86
<b>VII.1. Construction de peptides synthétiques de P30</b>	
<b>VII.2. Protocoles de protection avec le peptide N-terminal de P30:48-67</b>	p.87
VII.2.a. Immunisation de rats et de souris	
VII.2.b. Transfert de lymphocytes T spécifiques de la construction octamérique du peptide N-terminal 48-67	p.90
VII.2.c. Analyse des sérums par E.L.I.S.A.	
<b>VII.3. Approche cellulaire au cours de l'infection</b>	p.91
VII.3.a. Protocoles d'infection	
VII.3.b. Test de prolifération lymphoblastique	

## RESULTATS

<b>I. ETUDE DE LA REPONSE IgA HUMAINE AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE</b>	p.93
I.1. Mise en évidence de la réponse IgA spécifique au cours de la toxoplasmose	
I.2. Identification des antigènes impliqués dans la réponse IgA au cours de la toxoplasmose humaine	p.95
I.2.a. Immunotransfert de l'extrait antigénique total de <i>T. gondii</i>	p.96
I.2.b. Immunotransfert d'une préparation antigénique soluble	
<b>II. ETUDE DE LA REPONSE IgA SPECIFIQUE DIRIGEE CONTRE <i>T. GONDII</i> AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTALE</b>	p.100
II.1. Cinétique de la réponse anticorps IgA chez le rat et la souris	
II.2. Etude cinétique comparée des différentes réponses anticorps d'isotype IgG, IgM, IgA, IgE chez le rat infecté par voie orale	p.102
II.3. Induction d'une réponse anticorps IgA après immunisation par les antigènes excrétés-sécrétés	
II.4. Antigènes cibles reconnus par les anticorps IgA et IgE au cours de l'infection et de l'immunisation dans un extrait antigénique total du parasite	p.105
II.5. Antigènes excrétés-sécrétés reconnus par les anticorps IgA de rats infectés et immunisés	p.106
<b>III. APPROCHE MONOCLONALE DE LA REPONSE IgA AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE</b>	p.110
III.1. Protocoles d'hybridation cellulaire et sélection des clones producteurs d'anticorps d'IgA	
III.2. Analyse isotypique des différents clones positifs	p.113
III.3. Spécificité antigénique des anticorps monoclonaux IgA	p.115
III.3.a. Analyse par une technique radioimmunologique	
III.3.b. Immuno-empreinte et électroimmunotransfert	p.118
III.3.c Tests d'immunocapture IgA spécifiques d'antigènes	p.121
III.3.d. Réactions d'inhibition avec les peptides de la molécule P30	p.124
III.4. Evaluation de l'activité biologique des anticorps monoclonaux	p.126
III.4.a. Test de lyse dépendante du complément "Dye-test"	
III.4.b. Transfert passif chez le rat Nude	



III.4.c. Transfert passif chez la souris	p.127
III.4.d. Réalisation de tumeurs sous-cutanées ("back-pack") chez la souris	p.128
<b>IV PURIFICATION DES ANTICORPS IgA (FORMES DIMERIQUES)</b>	p.131
<b>V. ETUDE DU ROLE DE DIFFERENTS EPITOPES DE L'ANTIGENE P30 AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTALE A L'AIDE DE PEPTIDES DE SYNTHESE</b>	p.135
V.1. Etude particulière du peptide N-Terminal 48-67 de l'antigène P30	
V.2. Etude de la réponse proliférative de lymphocytes T au cours d'une infection par voie orale	p.139

### *DISCUSSION-CONCLUSION*

<b>I. ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS IgA AU COURS DE LA TOXOPLASMOSE HUMAINE</b>	p.144
<b>II. ETUDE DE LA REPOSE ANTICORPS D'ISOTYPE IgA DANS LES MODELES EXPERIMENTAUX DU RAT ET DE LA SOURIS. INTERET POTENTIEL DES ANTICORPS IgE.</b>	p.150
<b>III. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE <i>T. GONDII</i></b>	p.155
<b>IV. IMPLICATIONS AU COURS DE L'IMMUNITE DE CERTAINS EPITOPES PARTICULIERS DE L'ANTIGENE P30</b>	p.162
<b>V. CONCLUSION</b>	p.168

### *REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES*

### *TABLE DES MATIERES*

