50376 1993 155 UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

> Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé présentée à l'université de Lille I

50376

199

155

Nº d'ordre 1102

Laurence LECORDIER

ş.e. .

# CARACTERISATION MOLECULAIRE D'UN ANTIGENE DES GRANULES DENSES DE *TOXOPLASMA GONDII* (GRA5) ET D'UNE PROTEINE APPARENTEE



Présentée le 12 mars 1993 devant la commission d'examen :

Membres du Jury :

Président : P

Pr. M. Porchet

Rapporteurs : [

Dr. J. F. Dubremetz Dr. C. Locht

Examinateurs : Pr. A. Capron Pr. A. Tartar Dr. M. F. Cesbron-Delauw L'ensemble de ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité Mixte INSERM U167-CNRS 624) à l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Professeur A. Capron.

Le laboratoire de Chimie des Biomolécules (CNRS URA 1309) de l'Institut Pasteur de Lille, dirigé par le Professeur A. Tartar, a collaboré à ces travaux.

· .

.

A Monsieur le Professeur A. Capron,

Vous m'avez accueillie avec bienveillance dans votre laboratoire ; vous m'avez soutenue et encouragée tout au long de ces quatre années. Que ce travail soit le témoignage de ma profonde admiration et de ma sincère reconnaissance.

A Messieurs les Docteurs Dubremetz et Locht,

Vous avez accepté de juger ce travail et c'est avec un grand plaisir que je vous compte parmi les membres de ce jury. Je tiens à vous exprimer aujourd'hui mes très sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur Porchet,

C'est avec grand plaisir que je vous accueille parmi les membres du jury de cette thèse, et je vous remercie très sincèrement d'en avoir accepté la présidence.

A Monsieur le Professeur Tartar,

Cette thèse n'aurait pu être envisagée sans votre collaboration. Je vous remercie de l'intérêt porté à ce travail depuis le début, ainsi que de votre présence dans ce jury.

A Madame le Docteur Marie-France Cesbron-Delauw,

Je te remercie Marie-France de m'avoir accueillie au sein du groupe que tu diriges. C'est toi qui m'as initiée à la Biologie Moléculaire et tu as suivi tout ce travail avec la plus grande attention. Ta grande disponibilité et ton enthousiasme m'ont été autant d'encouragements.

Que ce mémoire soit le témoignage de ma reconnaissance et de toute l'amitié que je te porte.

Je voudrais associer Madame le Docteur Béatrice Tourvieille à ces remerciements, Tu as accepté avec gentillesse Béatrice, de relire ce mémoire mais bien plus encore, tu as suivi ce travail depuis le début, m'apportant toujours de précieux conseils. Sois assurée de ma sincère reconnaissance.

J'adresse également mes plus vifs remerciements,

-à Monsieur le Docteur Gérard Torpier pour m'avoir aimablement fourni les clichés de microscopie électronique illustrant l'introduction de ce mémoire.

-à Madame le Docteur Irina Moleon pour sa contribution lors du séquençage de l'un des gènes isolés lors de ce travail.

-à Mademoiselle Corinne Mercier, pour sa sympathie, son aide et sa grande disponibilité, ainsi que pour nos nombreux échanges quotidiens au cours de ces quatre années.

4

Ce travail a fait l'objet d'une collaboration avec le groupe "Chimie des Biomolécules" (CNRS URA 1309) dirigé par le Professeur A. Tartar. Je tiens donc à remercier tout particulièrement Mesdames les Docteurs Hélène Gras-Masse et Pierrette Maes, ainsi que Monsieur Eric Diesis.

Mesdames Josette Fontaine, Marie-Pierre Fourmaux et Monsieur Didier Deslée ont par leur aide technique et leurs conseils toujours avisés, participé pour une part non négligeable à ce travail. Je voudrais ici les remercier très chaleureusement.

Je ne voudrais pas oublier Monsieur le Docteur Jean-Pierre Kursnierz ni Monsieur Christian Drolez. Bien plus que des oligonucléotides et les supports iconographiques illustrant ce travail, c'est votre gentillesse et votre amitié que je garderai.

# Je tiens également à remercier

. .

les personnels des secrétariats, de la bibliothèque et de la production des parasites, pour avoir toujours répondu à mes requêtes avec amabilité et dévouement,

tous ceux enfin qui ont contribué à la réalisation de ce travail, qui m'ont encouragée et soutenue.

Introduction	р.	8
Résultats	p.	46
Discussion	p.	85
Matériels et Méthodes	p.	104
Bibliographie	p.	120
Sommaire	n	146

# Abréviations

AES : Antigènes Excrétés-Sécrétés

AIF : Adjuvant incomplet de Freund

CHAPS : (3-(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio)-propansulfonate)

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

kDa: kiloDalton

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

PMSF : fluorure de phényl méthyl sulfonyle

RP-HPLC : Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography

SDS-PAGE : Sodium dodécyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

TLCK : N-a-p-tosyl-L-Lysine chlorométhyl cétone

TPCK : N-tosyl-L-Phénylalanine chlorométhyl cétone

# INTRODUCTION

۰.

# I - GENERALITES

*Toxoplasma gondii* est observé pour la première fois à Tunis en 1908 par Nicolle et Manceau chez un rongeur nord-africain, le gondi (Nicolle and Manceaux 1908). Ce nouveau parasite se différencie nettement de *Pyroplasma quadrigeminum*, autre parasite infestant le gondi par les lésions qu'il provoque dans la rate, le foie, les ganglions, par la forme de son noyau et son mode de division par bipartition. De plus, bien que nettement intracellulaire, il n'est jamais observé dans les globules rouges. Ces auteurs le rapprochent alors des Leishmanies et le nomment provisoirement *Leishmania gondii*. L'absence de centrosome et des expériences infructueuses de culture en milieu acellulaire indiquent que ce nouveau protozoaire en forme d'arc ("toxon" en grec) est bien différent des Leishmanies et la dénomination *Toxoplasma gondii* est proposée (Nicolle and Manceaux 1909).

Le Toxoplasme est découvert simultanément au Brésil par Splendore chez un lapin. La ressemblance avec les Leishmanies est à nouveau observée mais après comparaison avec le parasite découvert par Nicolle et Manceaux, Splendore décide de le nommer *Toxoplasma cuniculi* (Splendore 1909). Les deux parasites étaient cependant identiques (Nicolle and Manceaux 1909) et à l'heure actuelle, il n'existe toujours que l'espèce *Toxoplasma gondii.* 

*Toxoplasma gondii* est classé en 1980 selon Levine dans le phylum des *Apicomplexa*, la classe des *Sporozoea*, la sous-classe des *Coccidia*, l'ordre des *Eucoccidiida* et le sous-ordre des *Eimeriina*, aux côtés de *Isospora* et *Sarcocystis* (Levine, Corliss et al. 1980; Levine 1982). Des critères tels que la quantité d'ADN nucléaire de la phase haploïde (Cornelissen, Overdulve et al. 1984) ou la séquence des gènes d'ARN ribosomique (Johnson 1987) semblent pouvoir être utilisés dans la comparaison de parasites très voisins. Le clonage et le séquençage d'ARN ribosomique, étendu aux protistes, permet de montrer que, parmi les *Apicomplexa*, seuls *Sarcocystis* et *Toxoplasma* sont monophylétiques (Johnson and Baverstock 1989). La caractérisation de gènes de plus en plus nombreux chez ces différents organismes devrait permettre de définir des critères taxonomiques plus précis dans les années à venir.

9

# 1-CYCLE EVOLUTIF DE TOXOPLASMA GONDII

Le Toxoplasme, parasite intracellulaire obligatoire, possède de nombreux hôtes intermédiaires (animaux à sang chaud) mais un seul hôte définitif, le chat (ou plus généralement, les félidés) (Joyner 1982) (figure 1).

Chez les hôtes intermédiaires, deux stades de différenciation sont retrouvés,

-le stade tachyzoïte, stade invasif que l'on retrouve durant la phase aiguë,

-le stade bradyzoïte, enkysté et quiescent, qui persiste durant la phase chronique de la maladie.

Les tachyzoïtes peuvent infecter toutes les cellules nuclées. A l'intérieur d'une vacuole parasitophore formée dans le cytoplasme de la cellule-hôte, les parasites se multiplient par endodyogénie, mécanisme au cours duquel les deux individus fils se forment dans la cellule mère (Vivier and Petitprez 1969). Après plusieurs cycles de division et rupture de la cellule-hôte, les parasites envahissent les cellules voisines. Leur dissémination dans l'organisme s'effectue par voie sanguine et lymphatique. La suite de l'infection est caractérisée par l'enkystement des parasites. Les kystes contenant les bradyzoïtes sont retrouvés dans de nombreux organes, et en particulier dans le système nerveux central et les muscles.

Ce n'est que vers 1969 que la phase sexuée du cycle de *Toxoplasma gondii* est découverte chez le chat, seul hôte définitif. Une nouvelle forme kystique du Toxoplasme est observée dans les fecès de chats infestés. Par filration, elle est séparée des oeufs de *Toxocara cati*, autre parasite des chats. L'infectivité de ces "kystes" est démontrée chez le chat et la souris, les auteurs postulant que le chat s'infeste par carnivorisme (Frenkel, Dubey et al. 1969). Des sporozoïtes infectants se différencient alors dans ces oocystes (Sheffield and Melton 1970).

L'infectivité des trois stades (tachyzoïtes, bradyzoïtes, oocystes) a été établie et comparée chez le chat. L'ingestion par le chat d'oocystes, de bradyzoïtes ou de tachyzoïtes conduit à la production d'oocystes dans un délai d'environ 22, 4 et 9 jours respectivement (Frenkel, Dubey et al. 1970) (figure 1). La phase sexuée se produit dans l'épithélium intestinal du chat (Chobotar and Scholtyseck 1982). La fécondation des macrogamètes par les microgamètes donne naissance aux oocystes, libérés dans la lumière intestinale.



# Figure 1 : Cycle de Toxoplasma gondii

•••

Cycle proposé par Frenkel (Frenkel, Dubey et al. 1970), chez le chat et chez les différents hôtes intermédiaires. (Chez l'Homme, la toxoplasmose congénitale survient en cas de primoinfection, c'est-à-dire de phase aiguë, et non pas lorsque la mère est en phase chronique, comme cela est représenté).

Le cycle non sexué peut également se produire chez le chat. Inversement, le cycle peut se poursuivre chez les hôtes intermédiaires sans passage chez le chat, ce qui différencie le Toxoplasme de *Isospora* (Deblock and Biguet 1971).

# 2-LA TOXOPLASMOSE

# 2.1 La maladie

La toxoplasmose est contractée par ingestion soit de viande peu ou pas cuite contenant des kystes, soit d'oocystes/sporocystes libérés par le chat dans la terre (figure 1). La différenciation des sporocystes ou des bradyzoïtes en tachyzoïtes, stade invasif, permet la dissémination rapide des parasites par voie lymphatique et sanguine et leur multiplication.

Chez les individus immunocompétents, la toxoplasmose est une infection bénigne généralement inapparente. Dans quelques cas, les symptômes observés lors de phase aiguë rappellent ceux de la mononucléose infectieuse (Ambroise-Thomas and Garin 1984).

Parallèlement à l'installation d'une réponse immune, les parasites s'enkystent dans divers organes tels que le système nerveux central, les muscles striés et le muscle cardiaque, les yeux. Ces kystes, dans lesquels les parasites se divisent très lentement, sont caractéristiques de la phase chronique et persistent toute la vie de l'hôte.

A l'inverse de ce qui est observé chez les sujets immunocompétents, la toxoplasmose est particulièrement grave lorsque le système immunitaire est déficient ou immature (toxoplasmose congénitale).

# *Immunodéficience*

Dans le cas de l'immunodéficience, la toxoplasmose est provoquée par une primoinfection ou, plus fréquemment, par la réactivation d'une toxoplasmose chronique par rupture de kystes. La réactivation d'une toxoplasmose latente conduisant à des pathologies a été observée dans un premier temps chez des patients atteints de la maladie de Hodgkin ou d'un myelome (Frenkel, Nelson et al. 1975), ou encore après transplantation. Le nombre de patients immunodéprimés touchés par une telle réactivation a considérablement augmenté des suites du nombre croissant de personnes atteintes par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Le tropisme nerveux du parasite conduit souvent à des encéphalites toxoplasmiques (Holliman 1988; Luft and Remington 1988; Leport and Remington 1992). La séroprévalence de la toxoplasmose, de 16% aux Etats Unis, peut atteindre 60% en France (Leport and Remington 1992). Dans le cerveau, les lésions provoquées sont le plus souvent nécrotiques et décelables par imagerie, mais quelques cas d'encéphalites toxoplasmiques diffuses et non nécrotiques sont beaucoup plus difficiles à diagnostiquer (Gray, Gherardi et al. 1989). Les yeux (Garcher, Bron et al. 1990; Bloch-Michel, Couvreur et al. 1992), la moelle épinière (Herskowitz, Siegel et al. 1989) ainsi que les poumons peuvent également être atteints (Leport and Remington 1992).

La coinfection par un virus et le Toxoplasme a été étudiée dans des modèles expérimentaux murins. Pomeroy et coll. ont montré que l'infection par le cytomégalovirus de souris chroniques provoque une réactivation pulmonaire de la toxoplasmose (Pomeroy, Kline et al. 1989). Dans le modèle MAIS (mouse AIDS), l'infection rétrovirale entraine la réactivation de la toxoplasmose chronique, ou empêche le contrôle de la phase aiguë (Gazzinelli, Hartley et al. 1992).

#### Toxoplasmose congénitale

La toxoplasmose congénitale résulte de la transmission du parasite au foetus par voie transplacentaire. Ce passage à l'enfant, bien que non systématique, est observé uniquement en cas de primo-infestation de la mère pendant sa grossesse. La transmission congénitale du Toxoplasme est démontrée en 1941 par Sabin. Deux cas sont décrits chez des enfants. L'un, mortel, est à l'origine de l'isolement de la souche virulente RH, étudiée aujourd'hui dans la plupart des laboratoires. L'identification du Toxoplasme est réalisée par inoculation de tissus nerveux à des souris et cochons d'Inde. Chez l'autre enfant, la toxoplasmose congénitale se manifeste par une choriorétinite (Sabin 1941).

La probabilité de transmission augmente avec l'âge du foetus à la date de l'infection. Une infestation du foetus en fin de grossesse conduit à des atteintes essentiellement oculaires, souvent inapparentes à la naissance mais pouvant se réactiver ultérieurement. Inversement, les atteintes les plus graves, en particulier cérébrales, sont généralement observées pour des infections contractées précocément au cours de la grossesse (Ambroise-Thomas and Garin 1984; Fortier and Ajana 1992)

# 2.2 Le diagnostic

# Diagnostic sérologique

La recherche de méthodes de diagnostic sérologique fiables est à la base des études de la réponse humorale chez l'homme. En effet, en l'absence de signes cliniques propres à une toxoplasmose aiguë, le diagnostic de la toxoplasmose est essentiellement basé sur la recherche des anticorps anti-Toxoplasme.

La recherche d'anticorps spécifiques a été effectuée dans un premier temps grâce à un test de lyse des parasites en présence du complément ou "Dye-Test" (Sabin 1949). L'activation de la voie classique du complément, à la base du Dye-test, est démontrée en 1980 par Schreiber et Feldman (Schreiber and Feldman 1980). La voie alterne n'est activée que transitoirement et de manière inefficace (Fuhrman and Joiner 1989).

L'immunofluorescence indirecte sur parasites fixés a également été largement utilisée. La présence à la surface du Toxoplasme d'un récepteur pour les fragments Fc humains permet d'expliquer la détection de sérums faux positifs par cette méthode (Budzko, Tyler et al. 1989).

La recherche d'anticorps spécifiques d'isotype IgM comme marqueurs de phase aiguë a fait l'objet de diverses méthodes diagnostiques. L'utilisation de réactifs plus spécifiques et mieux caractérisés tels que l'antigène majeur de surface des tachyzoïtes (P30 ou SAG1) purifié par affinité (Santoro, Afchain et al. 1985) ou un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène (Cesbron, Capron et al. 1985) permet de mieux standardiser ces méthodes.

De nombreux tests sérologiques existent aujourd'hui (Fortier and Ajana 1992). Récemment, l'intérêt diagnostique d'une réponse précoce IgA a été mis en évidence. En effet, les IgA spécifiques sont synthétisées *in utero* chez les enfants atteints de toxoplasmose congénitale (Cederquist-Facog, Kimball et al. 1977) et apparaissent être de meilleurs marqueurs de phase aiguë que les IgM qui peuvent persister très longtemps chez certains patients (Decoster, Darcy et al. 1988). De plus, l'isotype IgM n'est pas toujours détecté (Decoster, Darcy et al. 1988; Stepick-Biek, Thulliez et al. 1990). Ce type de tests permet, en parallèle avec la recherche des IgM, un diagnostic fiable de la toxoplasmose aiguë chez la mère et le nouveau-né, mais également chez les patients infectés par le VIH (Stepick-Biek, Thulliez et al. 1990; Decoster, Slizewicz et al. 1991; Darcy, Fourdrinier et al. 1992)

. .

Les immunoglobulines spécifiques d'isotype IgE sont également impliquées lors de la phase précoce de la maladie (Pinon, Toubas et al. 1990) et semblent être de bons marqueurs d'une infection récente ou congénitale, que ce soit à la naissance ou en cas de réactivation ultérieure.

Les problèmes rencontrés lors du diagnostic de la toxoplasmose prennent une importance considérable chez les patients atteints par le VIH. La présence d'anticorps spécifiques dans le liquide céphalorachidien serait le reflet d'une encéphalite car non observée chez les patients chroniques (Potasman, Resnick et al. 1988). Diverses études mettent l'accent sur l'absence de fiabilité des méthodes diagnostiques existantes, que ce soit par détection d'anticorps (Carrazana, Rossitch et al. 1989; Hassl and Aspöck 1990; Tixier, Goullier-Fleuret et al. 1990) ou d'antigènes circulants (Hassl and Aspöck 1990; Tixier, Goullier-Fleuret et al. 1990). La recherche des lgA spécifiques chez les patients atteints du SIDA permet cependant une bonne sensibilité (Darcy, Fourdrinier et al. 1992), que ce soit lors d'une phase aiguë ou d'une réactivation de toxoplasmose chronique.

Plusieurs méthodes (sérologie, radiographie, biopsie..) sont le plus souvent nécessaires pour l'obtention d'un diagnostic fiable (Wanke, Tuazon et al. 1987; Holliman 1988; Luft and Remington 1988; Leport and Remington 1992).

Dans un avenir proche, la standardisation des tests de diagnostic sérologique devrait être améliorée par l'utilisation de molécules recombinantes. En effet, l'étude moléculaire des antigènes du Toxoplasme a permis la caractérisation de plusieurs protéines potentiellement utilisables en diagnostic sous forme recombinante produite chez *E. coli* (Burg, Perelman et al. 1988; Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Johnson, Illana et al. 1989; Prince, Auer et al. 1990; Johnson and Illana 1991; Parker, Smith et al. 1991; Parmley, Sgarlato et al. 1992; Mercier, Lecordier et al. 1993).

### Détection directe du parasite : de la culture de parasites à la détection par PCR

La présence du Toxoplasme dans les prélèvements biologiques est mise en évidence soit par la culture de parasites *in vitro* ou après injection des prélèvements à des souris. Cette méthode de diagnostic est cependant assez lourde et demande des délais parfois incompatibles avec l'urgence du traitement.

La détection microscopique peut également être employée, notamment en ce qui concerne les lavages broncho-alvéolaires effectués pour diagnostiquer les toxoplasmoses pulmonaires (Derouin, Sarfati et al. 1989; Dumon, Herin et al. 1990).

15

# Antigènes circulants

La détection d'antigènes parasitaires dans le sang a été envisagée, et notamment de la NTPase parasitaire (Asai, Kim et al. 1987). La Nucléoside triphosphate hydrolase représente en effet environ 3% des protéines cytosoliques (Asai, O'Sullivan et al. 1983). Son abondance est confirmée par sa détection dans les antigènes circulants dès le premier jour d'une infestation par la souche RH chez la souris (Asai, Kim et al. 1987).

Cependant, l'origine des antigènes circulants reste incertaine, cytoplasmiques et secrétés (Hughes 1981; Hughes and Van Knapen 1982) ou libérés par la lyse spécifique des parasites (Hassl and Aspöck 1990).

# Détection par PCR

. .

La connaissance de certains gènes du Toxoplasme a été récemment employée pour la détection du parasite par PCR. Contrairement à la culture, cette technique permet de détecter des parasites non viables ou morts. Divers fragments géniques ont été amplifiés expérimentalement. Le gène B1, présent en 35 copies conservées dans le génome parasitaire a permis la détection de 10 parasites mélangés à 10<sup>5</sup> leucocytes humains (Burg, Grover et al. 1989). Des résultats similaires ont été obtenus avec un autre gène répété, codant cette fois pour l'ARN ribosomal (Cazenave, Bessières et al. 1990). Des expériences réalisées par amplification du gène P30, gène non répété, ont montré une sensibilité moins grande (Savva, Morris et al. 1990; Weiss, Udem et al. 1991).

Sur prélèvements humains, le diagnostic de toxoplasmose congénitale par PCR a été réalisé par amplification du gène répété B1 et a permis de détecter des infections négatives en sérologie IgM (Grover, Thulliez et al. 1990). Par contre, l'amplification de ce même gène sur des prélèvements de patients infectés par le VIH n'a révélé que 4 patients positifs sur les 9 présentant une encéphalite toxoplasmique (Parmley, Goebel et al. 1992). Une bonne fiabilité de cette technique sur prélèvements humains reste donc à démontrer. L'utilisation d'une séquence répétée de 800 à 1000 fois a également été évaluée en dot blot sur l'ADN extrait de tissus (Blanco, Angel et al. 1992).

# 2.3-Les traitements

Les molécules les plus employées chez les patients immunodéprimés et les femmes enceintes sont la Sulfadiazine en combinaison avec la Pyriméthamine (Fortier and Ajana 1992; Leport and Remington 1992). Ces drogues sont efficaces dans la mesure où elles permettent de faire chuter la parasitémie. Cependant, aucune de ces molécules utilisées chez l'homme (Fortier and Ajana 1992) n'est capable d'éliminer les formes enkystées.

De nombreuses molécules ont été testées *in vitro* ou *in vivo* contre le Toxoplasme (Luft and Remington 1988). La majorité de ces drogues n'agit que sur les formes prolifératives, en inhibant la multiplication. Les tachyzoïtes restent viables (Chang and Pechere 1988; Chang and Pechere 1988) et les kystes ne sont pas touchés. C'est le cas pour la sulfadiazine et la pyriméthamine, dont les effets secondaires sont non négligeables (Fortier and Ajana 1992; Leport and Remington 1992). De plus, un mutant résistant aux sulfonamides a été isolé expérimentalement (Pfefferkorn, Borotz et al. 1992).

Une autre molécule, l'Emimycine, est également capable d'inhiber la multiplication des parasites en s'incorporant à leurs acides nucléiques. L'isolement d'un mutant mille fois plus résistant à cette drogue (Pfefferkorn, Eckel et al. 1989) a permis de montrer qu'une simple mutation (expérimentale) est à l'origine de ce nouveau phénotype, mutation affectant l'activité de l'enzyme qui métabolise l'Emimycine. Cette molécule ne semble donc pas un bon candidat dans la recherche de nouveaux traitements.

Dans des modèle murins, un effet synergique est observé entre l'Interférony (IFN $\gamma$ ) et la Pyriméthamine ou la Clindamycine, à des doses cette fois compatibles avec les traitements humains (Israelski and Remington 1990). Cet effet est observé avec plusieurs drogues utilisées chez l'homme, ainsi qu'avec l'Interleukine 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) et l'IL1 $\beta$  (Beaman, Wong et al. 1992). L'IFN $\gamma$  joue de plus un rôle important dans la prévention de l'encéphalite toxoplasmique dans les modèles animaux (Beaman, Wong et al. 1992; Sher and Coffman 1992; Sher, Gazzinelli et al. 1992; Suzuki and Remington 1993). Plusieurs auteurs estiment qu'un traitement par l'IFN $\gamma$  devrait être envisagé (Leport and Remington 1992; Suzuki and Remington 1993). Le modèle des souris SCID (Johnson 1992; Sher, Gazzinelli et al. 1992) ou de coinfection rétrovirale (Gazzinelli, Hartley et al. 1992) devraient permettre de définir de nouvelles stratégies propres à l'immunodéficience.

# **II - LE TACHYZOITE**

# **1-ULTRASTRUCTURE**

# 1.1-Membranes

Le Toxoplasme est entouré d'un complexe membranaire composé de trois feuillets (figure 2) (Vivier and Petitprez 1969). La membrane la plus externe, le plasmalemme, entoure totalement le parasite. Elle s'interrompt au niveau de micropores et semble former des microvillosités à l'extrémité postérieure du parasite. Les deux membranes internes sont assimilables à un alignement de vésicules aplaties (Dubremetz and Torpier 1978), formant des sortes de "plaques" ajustées les unes aux autres (Porchet and Torpier 1977). Des interruptions de ce "complexe interne" sont observées au niveau des micropores, mais également aux extrémités antérieures et postérieures du parasite. Des enroulements membranaires internes (Vivier and Petitprez 1972; Charif, Torpier et al. 1990) ainsi qu'une sécrétion de membranes par le parasite ont été rapportés (Sibley, Lawson et al. 1986). Les études ultrastructurales réalisées par cryodécapage ont révélé la présence de nombreuses particules alignées au niveau des membranes du complexe interne (Porchet and Torpier 1977; Torpier, Dardé et al. 1991).

# 1.2-Cytosquelette et mouvement

Les Apicomplexa sont caractérisés par la présence au pôle antérieur d'un complexe apical constitué d'anneaux polaires, de rhoptries, du conoïde, de micronèmes, de microtubules sous-pelliculaires et de micropores (Vivier and Petitprez 1972; Chobotar and Scholtyseck 1982).

Sous la membrane du tachyzoïte sont présents 22 microtubules dont l'arrangement en spirale rappelle le mouvement de torsion des parasites mobiles (Nichols and Chiappino 1987). La présence de microtubules internes a également été rapportée (Vivier and Petitprez 1972; Nichols and Chiappino 1987). Les microtubules sous pelliculaires semblent ancrés à l'anneau le plus postérieur du conoïde, situé au pôle antérieur du parasite. Les microtubules sont constitués d'une molécule reconnue par un anticorps dirigé contre la  $\beta$ -tubuline de mammifères (Schwartzman, Krug et al. 1985). Le clonage des  $\alpha$ - et  $\beta$ -tubulines du parasite (Nagel and Boothroyd 1988) a montré la présence d'un domaine conservé dans les séquences des tubulines d'autres espèces. Les mouvements du conoïde entraineraient donc les filaments, provoquant la torsion du parasite (Nichols and Chiappino 1987). Cette torsion ne représente cependant qu'un seul type de mouvement parmi les observations variées décrites dans la littérature (Nichols and Chiappino 1987). Une interprétation des mouvements de "glissade" et de "capping" des *Apicomplexa* est proposée par King en 1988. Les particules intramembranaires fixées par exemple à une cellule-hôte ou à des anticorps seraient mobiles dans la membrane sous l'effet du cytosquelette sous-jacent, provoquant ainsi le déplacement du parasite par rapport à la cellule, ou le rassemblement des anticorps fixés à un pôle du parasite (King 1988). La mobilité du parasite peut être induite par une variation externe de la concentration de certains ions ou du pH (Endo, Tokuda et al. 1987; Endo, Yagita et al. 1988).

La partie antérieure du Toxoplasme contient des molécules détectées par des anticorps dirigés contre l'actine d'Ascaris (Endo, Yagita et al. 1988; Yasuda, Yagita et al. 1988) et la myosine d'oiseau ou de criquet (Schwartzman and Pfefferkorn 1983). L'association d'actine, vraisemblablement monomérique car non détectée en filaments, avec les microtubules sous-pelliculaires favoriserait la liaison avec la myosine, et permettrait donc le mouvement (Endo, Yagita et al. 1988). Une molécule de 46-47 kDa, spécifique des stades invasifs de plusieurs *Apicomplexa* et marquant la région antérieure et le cytosquelette des parasites a également été décrite (Taylor, Evans et al. 1990). Cette molécule pourrait selon ces auteurs correspondre à l'actine, la mobilité étant l'une des caractéristiques du stade invasif.

#### 1.3-Invasion de la cellule-hôte

Le Toxoplasme est un parasite intracellulaire obligatoire pouvant potentiellement envahir tous les types cellulaires. Les deux organites de sécrétion du Toxoplasme, les rhoptries et les granules denses, semblent jouer un rôle primordial respectivement lors de la pénétration active et dans les mécanismes de survie du parasite dans la cellule-hôte.

Le mécanisme d'entrée du Toxoplasme a été longtemps controversé, en particulier dans les macrophages, capables de phagocytose. Bien que l'existence d'un facteur augmentant le taux de pénétration du parasite dans les cellules ait été montrée ("penetration enhancing factor" ou PEF), (Lycke and Norrby 1966), Jones et coll. suggèrent que le parasite pénètre dans les macrophages uniquement par phagocytose, activée par le PEF (Jones, Yeh et al. 1972). La pénétration active du parasite dans les macrophages est cependant démontrée par la suite : lorsque le Toxoplasme entre en contact avec la cellule par sa partie apicale, une structure cylindrique (le conoïde) émerge du plasmalemme au pôle antérieur. Au contraire, si une autre partie du parasite est en contact avec la cellule, la structure cylindrique décrite n'est pas observée et la pénétration s'effectue par phagocytose (Aikawa, Komata et al. 1977). Le Toxoplasme peut pénétrer en 30 secondes dans un macrophage après sortie du conoïde, et ce, même si la phagocytose est inhibée (Nichols and O'Connor 1981). Une étude microcinématographique décrit, après le contact pôle antérieur-cellule-hôte, un ajustement du parasite par rapport à la cellule, et des mouvements rythmiques qualifiés de "twist and rock" lors de la pénétration (Rondanelli, Senaldi et al. 1986).

L'intervention des rhoptries dans ce mécanisme a été suggérée par le changement de forme de ces organelles qui paraissent se vider pendant l'invasion (Nichols and O'Connor 1981). L'observation d'une fusion des rhoptries avec le plasmalemme du parasite permet d'envisager un phénomène de sécrétion (Nichols, Chiappino et al. 1983). Des structures tubulaires observées dans les rhoptries sont également présentes dans la vacuole parasitophore en formation. Ces tubules sont caractéristiques des vacuoles contenant des parasites en division (Nichols, Chiappino et al. 1983).

L'étude de la composition lipidique des rhoptries (Foussard, Leriche et al. 1991) indique un rapport cholestérol/phospholipides particulièrement élevé. L'insertion de cholestérol dans la membrane de la vacuole parasitophore permettrait à la fois une augmentation de sa surface et une diminution de sa perméabilité, favorisant la protection des parasites (Foussard, Leriche et al. 1991). La présence dans les rhoptries d'acide phosphatidique et de lysophospholipides indique qu'un phénomène de "flip-flop" exacerbé pourrait favoriser la formation de la vacuole parasitophore (Joiner 1991).

Au contraire des rhoptries, la membrane du parasite possède un rapport cholestérol/phospholipides faible (Gallois, Foussard et al. 1988). La composition lipidique de ces membranes indiquant une grande fluidité, les auteurs suggèrent que cette fluidité serait le reflet de la grande capacité d'adaptation du parasite. La fluidité membranaire de la cellule-hôte parait également importante dans le mécanisme d'invasion, puisque une diminution ou une augmentation de sa fluidité influencent le taux de pénétration du Toxoplasme (Werk 1985). Selon cet auteur, la cellule-hôte participe activement à l'invasion, car ce mécanisme est énergie-dépendant, pour le Toxoplasme comme pour la cellule-hôte. De plus, le taux d'invasion est influencé par l'âge de la cellule et la phase du cycle cellulaire (Werk 1985).

L'origine de la membrane délimitant la vacuole parasitophore qui entoure les tachyzoïtes intracellulaires n'est pas totalement élucidée. Il pourrait s'agir soit d'une membrane d'origine cellulaire modifiée par des molécules parasitaires, soit d'une membrane synthétisée entièrement par le parasite. Lors de sa formation, la membrane de la vacuole est dépourvue de particules intramembranaires, et parait de nature uniquement lipidique (Porchet-Hennere and Torpier 1983). Ces particules apparaissent lorsque la membrane entoure totalement le parasite.

# 2-DIFFERENCIATION DES STADES

Des différences morphologiques majeures sont observées entre les deux stades rencontrés chez les hôtes intermédiaires, les tachyzoïtes (figure 2A) et les bradyzoïtes enkystés (figure 2B). Les rhoptries, d'aspect glandulaire au stade invasif tachyzoïte, apparaissent très opaques au stade bradyzoïte. Les bradyzoïtes, au contraire des tachyzoïtes contiennent également de nombreux micronèmes et granules d'amylopectine. De plus, leurs granules denses peuvent être présents sous plusieurs aspects, leur matrice apparaissant plus ou moins relachée.

Une étude réalisée en cryofracture a permis de montrer que le plasmalemme des tachyzoïtes contient un nombre plus important de particules intramembranaires qu'au stade bradyzoïte (Torpier, Dardé et al. 1991).

Le réseau membranaire entourant les parasites est beaucoup plus différencié lorsque les parasites sont enkystés (voir figure 3C). La paroi du kyste, très résistante, apparait composée de plusieurs strates. La membrane externe délimitant le kyste possède de nombreuses invaginations rappelant la structure des surfaces d'échanges.

Les trois stades parasitaires possédent des antigènes spécifiques (Kasper 1989). En particulier, trois antigènes de 190, 67 et 25 kDa semblent spécifiques du stade oocyste-sporozoïte (Kasper, Bradley et al. 1984).

Les bradyzoïtes de la souche 76K possèdent 4 antigènes de surface non détectés au stade tachyzoïte (Tomavo, Fortier et al. 1991). Inversement, les antigènes P30 et P22 présents à la surface des tachyzoïtes ne sont détectés ni au stade oocyste-sporozoïte, ni au stade bradyzoïte (Kasper, Bradley et al. 1984; Kasper 1989; Woodison and Smith 1990).

D'autres auteurs ont recherché les antigènes communs aux stades tachyzoïtes et bradyzoïtes. Darcy et coll. montrent la présence de 4 antigènes présentant une réactivité croisée de 63, 43, 39 et 28,5 kDa (Darcy, Charif et al. 1990). Les antigènes des granules denses P24 et P21 sont également communs aux deux stades (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Charif, Darcy et al. 1990; Torpier, Charif et al. 1993).



<u>Figure 2</u> : Ultrastructure comparée des stades tachyzoïte (souche RH) et bradyzoïte (souche 76K) de *Toxoplasma gondii* 

A : Le tachyzoïte est entouré d'un complexe membranaire (M) composé du plasmalemme (externe) et des saccules du complexe interne. L'appareil de Golgi (g) et le réticulum endoplasmique (r) sont visibles de part et d'autre du noyau (N). Les rhoptries (R) présentent plus spécifiquement à ce stade un aspect glandulaire caractéristique du stade tachyzoïte. A noter à proximité d'une mitochondrie (m) des granules denses (Gd) dont la matrice présente généralement un aspect compact. Les micronèmes (mc) sont très peu nombreux. (x13500).



**B** : Le complexe membranaire des deux parasites est visible au centre de la photographie (M). Le stade bradyzoïte est caractérisé par des rhoptries très denses (R) et de très nombreux micronèmes (mc). De plus, la matrice des granules denses (Gd) présente un aspect plus ou moins compact (pointes de flèches) suggérant différents stades de maturation. Des granules d'amylopectine (Ga) caractéristiques du stade bradyzoïte (voir également les figures 3B et 3C) sont visibles à l'extrémité antérieure, à proximité du conoïde (c). Noyau : N. (x 13500).

Fixation : Glutaraldéhyde/OSO4/Acétate d'Uranyle. Inclusion : Araldite. Contraste : Acétate d'Uranyle/Plomb.

# **3-GENETIQUE DU TOXOPLASME**

# 3.1-L'ADN

Le Toxoplasme ne pouvant être cultivé qu'en présence de cellules (généralement de souris), l'étude de son génome n'a pu être véritablement entamée qu'après élimination de l'ADN cellulaire contaminant. L'ADN du Toxoplasme contient en effet environ 50% de G et C, contre 42% pour l'ADN de souris (Johnson, Dubey et al. 1986). L'utilisation d'un colorant fluorescent qui s'intercale au niveau des GC permet donc de séparer les deux ADN sur gradient. Par ailleurs, la technique d'électrophorèse en champ pulsé a permis par la suite d'identifier les chromosomes parasitaires (Candolfi, Arveiller et al. 1988; Sibley and Boothroyd 1992). Sibley et coll. révèlent la présence de 9 chromosomes de 2 à 6 Mb, une partie du génome n'étant pas séparée dans ces conditions. La quantité d'ADN par tachyzoïte, estimée par cytofluorométrie (Cornelissen, Overdulve et al. 1984) serait en effet deux fois plus importante (8x107 bp) que la somme des 9 chromosomes individualisés (Sibley and Boothroyd 1992). L'hybridation de différentes sondes sur ces chromosomes (Sibley and Boothroyd 1992) ou sur l'ADN génomique soumis à l'action de différentes enzymes de restriction (Cristina, Oury et al. 1991; Boothroyd and Sibley 1993) devrait permettre d'établir une carte génétique du Toxoplasme.

L'ADN mitochondrial du Toxoplasme n'a pas été isolé, mais Ossorio et coll. ont montré la présence de séquences répétées dans l'ADN génomique homologues à certains gènes mitochondriaux (Ossorio, Sibley et al. 1991). D'autres séquences répétées ont été découvertes dans l'ADN génomique (Burg, Grover et al. 1989; Cristina, Liaud et al. 1991; Blanco, Angel et al. 1992) et dans l'ADN ribosomique (Guay, Huot et al. 1992). Ce type de séquences présente un grand intérêt dans la détection du Toxoplasme par PCR dans les prélèvements biologiques.

Selon la nomenclature proposée par Sibley, (Sibley, Pfefferkorn et al. 1991), les gènes codant pour les antigènes de surface sont appelés *SAG*, les appellations *GRA*, *ROP* et *MIC* correspondant respectivement aux gènes codant pour des molécules des granules denses, des rhoptries, des micronèmes. Environ quinze gènes du Toxoplasme sont aujourd'hui clonés, codant pour les antigènes de surface P30 (SAG1), P22 (SAG 2) (Burg, Perelman et al. 1988; Prince, Auer et al. 1990; Büllow and Boothroyd 1991) et P43 (SAG3) (M.F. Cesbron-Delauw, en préparation), des rhoptries (ROP1) (Ossorio, Schwartzman et al. 1992), des granules denses, P24 ou GRA1 (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989), GP28,5 ou GRA2 (Mercier, Lecordier et al. 1993; Parmley, Sgarlato et al. 1993) et GRA4 (Mevelec, Chardès et al. 1992), pour l' $\alpha$  et la β tubuline des microtubules (TUB1 et TUB2) (Nagel and Boothroyd 1988) ou encore pour la NTPase (Johnson, Illana et al. 1989). Certains fragments ont été clonés sur la simple base de l'antigénicité de la protéine recombinante vis-à-vis de sérums (Johnson and Illana 1991) ou de clones T humains (Saavedra, De Meuter et al. 1991). Ces deux derniers clones correspondent respectivement à GRA4 (Mévelec, Chardès et al. 1992) et à ROP2 (Dubremetz, communication personnelle).

# 3.2-L'ARN

En présence de sérum, le tachyzoïte est capable durant une courte période de synthétiser des ARN totaux en milieu acellulaire (Remington, Bloomfield et al. 1970). Trois composants majeurs sont révélés par sédimentation, à 24S, 19S et 4 à 5 S. Une étude plus récente montre cependant que les bandes majeures sédimentent à 28S, 18S et 14S (Johnson 1986). Les travaux de Remington révèlent également que le tachyzoïte possède les enzymes nécessaires à la synthèse de ses ARN (Remington, Bloomfield et al. 1970). L'une de ces enzymes, l'Uridine phosphorylase, est présente en quantité cent fois plus importante que chez la cellule-hôte (Pfefferkorn and Pfefferkorn 1977), permettant ainsi une incorporation spécifique de l'Uridine dans les acides nucléiques parasitaires. La libération d'uridine marquée dans le milieu peut donc être utilisée pour évaluer la lyse des parasites, par des anticorps monoclonaux par exemple.

Il est possible de réaliser *in vitro* la traduction des ARN messagers parasitaires en utilisant soit un lysat de réticulocytes, soit un extrait de germes de blé. De plus, la maturation des transcrits et l'épissage des introns peuvent être effectués par un extrait nucléaire de cellules HeLa (Nagel and Boothroyd 1988), les séquences requises étant conservées.

# 3.3-Mutants

Les souches mutantes de *Toxoplasma gondii* ont toutes été obtenues par mutagénèse chimique. Des expériences récentes de transfection du Toxoplasme devraient permettre de générer des souches mutantes pour les différents gènes connus.

Parmi plusieurs mutants thermosensibles obtenus par action de la nitrosoguanidine (Pfefferkorn and Pfefferkorn 1976), le mutant ts4 semble le meilleur candidat pour des expériences de vaccination et d'étude de la réponse immune (Waldeland and Frenkel 1983). Ce mutant, non persistant chez la souris, a été utilisé par plusieurs équipes (Mc Leod, Frenkel et al. 1988; Gazzinelli, Hakim et al. 1991). La nature de la mutation est inconnue, mais le comportement des parasites permet d'envisager plusieurs mécanismes : la température inhibe la synthèse d'une molécule,

et le mutant ne peut croître que quelques heures, grâce à ses réserves, ou bien la protéine elle-même est sensible à la température, et l'inhibition est alors immédiate (Pfefferkorn and Pfefferkorn 1976).

L'isolement d'un mutant n'exprimant plus à sa surface la protéine P22 (SAG2) a été réalisé sur la base de sa résistance à la lyse par un anticorps monoclonal anti-P22 (Kasper, Crabb et al. 1982). La même méthode de sélection a permis l'isolement d'un mutant présentant une diminution importante de l'expression de la protéine de surface P30 (SAG1) (Kasper 1987).

Des mutants résistants aux drogues anti-Toxoplasme ont été obtenus expérimentalement (Pfefferkorn and Pfefferkorn 1977; Pfefferkorn, Eckel et al. 1988; Pfefferkorn, Eckel et al. 1989; Pfefferkorn, Borotz et al. 1992). La résistance à l'Emimycine est apportée par une simple mutation de l'enzyme qui permet son incorporation aux acides nucléiques du parasite (Pfefferkorn, Eckel et al. 1989). Le même mécanisme est envisagé chez les mutants résistants aux Sulfonamides (Pfefferkorn, Borotz et al. 1992), concernant l'enzyme dihydroptéorate synthétase qui participe au métabolisme de l'acide folique (Allegra, Boarman et al. 1990).

## 3.4-Souches de Toxoplasme

۰.

La variabilité de la résistance à l'infection a amené plusieurs équipes à s'intéresser à la comparaison de souches de Toxoplasmes. La notion de souche correspond dans un premier temps à des isolats différents, caractérisés par leur virulence dans les modèles animaux. Jacobs montre en 1957 une nette différence de virulence parmi plusieurs isolats de Toxoplasmes provenant de mammifères (Jacobs and Lunde 1957). Ces travaux, poursuivis *in vitro* (Kaufman, Melton et al. 1958) confirment que la souche peu virulente ne détruit pas le tapis cellulaire et se multiplie lentement. Les auteurs suggèrent que de telles souches sont celles rencontrées chez l'Homme.

Cette variation de la virulence est confirmée pour le stade oocyste (Dubey and Frenkel 1973). Parmi les 4 souches testées, 2 entraînent la mort des souris avec un inoculum faible d'oocystes (1 à 10) alors que les deux autres souches permettent l'installation d'une phase chronique avec une infestation par 1000 oocystes. De la même façon, Suzuki et coll. montrent une différence de virulence entre deux souches kystogènes (Suzuki, Joh et al. 1991). L'une des souches, mortelle pour la souris, entraîne l'apparition de deux fois plus de kystes intracérébraux et de calcifications intracraniennes, ainsi qu'une réponse inflammatoire généralisée. La réponse anticorps

varie également (Handman and Remington 1980). Une réponse anticorps apparait au bout de 5 jours avec la souche virulente C56, date à laquelle tous les antigènes de surface sont reconnus. La réponse anticorps induite par la souche avirulente C57 apparaît dès le deuxième jour, mais les antigènes membranaires ne sont tous reconnus qu'au bout de 15 jours.

Les premiers travaux entrepris visant à caractériser les souches d'un point de vue antigénique ont montré des résultats divergents (Suggs, Walls et al. 1968; Bloomfield and Remington 1970). Des variations antigéniques ont cependant été démontrées par la suite. Des différences enzymatiques et, plus récemment, génétiques, confortent ces résultats.

# -Antigènes

Une nette différence antigénique entre les souches RH, C et P est montrée en Western blot et immunoprécipitation (Ware and Kasper 1987). Des antigènes propres à chaque souche sont révélés, ainsi que des antigènes communs aux souches P et C mais non détectés sur la souche RH. Cette variabilité antigénique est confirmée par la différence d'activité lytique selon la souche de Toxoplasme de plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines membranaires (Ware and Kasper 1987). Gross et coll. montrent la présence d'un antigène de surface de 23 kDa uniquement sur les souches virulentes (Gross, Müller et al. 1991). Des différences antigéniques sont également observées parmi les antigènes d'excrétion-sécrétion, entre les souches RH et ME49 (Rahmah and Khairul Anuar 1992).

#### -Enzymes

L'étude de 39 isoenzymes de 7 souches de Toxoplasmes permet à Dardé et coll. de définir 3 zymodèmes (Dardé, Bouteille et al. 1988). Le premier zymodème semble relié à la virulence et à la non production d'oocystes, alors que les deux autres contiennent des souches permettant une infection chronique et la production d'oocystes. Ces auteurs mettent également en évidence une variation pour une enzyme selon les cellules hôtes utilisées pour la culture des parasites (cellules d'un sarcome murin ou fibroblastes humains) (Dardé, Bouteille et al. 1990). Une étude plus récente sur 35 isolats parasitaires confirme l'existence des 3 zymodèmes déjà définis et en ajoute deux autres. Alors que le quatrième est à rapprocher des groupes 2 et 3 en terme de virulence modérée et de production d'oocystes, le cinquième zymodème correspond à un seul isolat, très pathogène chez la souris (Dardé, Bouteille et al. 1992).

# -Polymorphisme génétique

Les premières études réalisées sur le génome parasitaire n'ont pas permis de mettre en évidence des différences entre les souches de Toxoplasme, que ce soit par analyse des gènes d'ARN ribosomique (Johnson 1987) ou des chromosomes (Candolfi, Arveiller et al. 1988). Des travaux plus récents ont cependant conforté les différences antigéniques et enzymatiques décrites plus haut. Cristina et coll. montrent un polymorphisme génétique parmi 6 souches de Toxoplasme (Cristina, Oury et al. 1991). Une sonde s'hybridant à une séquence répétée permet de définir 4 profils de restriction de l'ADN génomique, mais sans corrélation apparente avec la virulence.

Au niveau chromosomique, l'hybridation de différentes sondes sur les dix chromosomes parasitaires séparés a montré une variation sur les chromosomes III et V parmi les trois souches testées (Sibley and Boothroyd 1992). Ces auteurs ont étendu leur étude sur l'ADN génomique de 28 souches (Sibley and Boothroyd 1992; Boothroyd and Sibley 1993). Des variations limitées sont observées pour les souches de même provenance d'hôte ou géographique. Les souches virulentes semblent cependant être identiques, c'est-à-dire génétiquement homogènes, alors que les souches modérées sont plus hétérogènes (Sibley and Boothroyd 1992).

# **III-RELATION HOTE-PARASITE**

# 1-L'IMMUNOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE

L'immunité développée lors de l'infection par le Toxoplasme chez un individu immunocompétent est dite de prémunition. Ces mécanismes permettent en effet le contrôle de la phase aiguë et d'une éventuelle réinfestation. Par contre, le passage en phase chronique rend les parasites inaccessibles aux mécanismes effecteurs de l'immunité.

Bien que la nature des mécanismes d'échappement développés par le parasite reste inconnue, l'absence de réponse inflammatoire autour des kystes cérébraux par exemple suggère une immunomodulation induite par le parasite, évoquée également dans d'autres modèles parasitaires.

#### 1.1-Réponse humorale

La réponse humorale est à la base de la majorité des tests diagnostiques, que ce soit par une lyse dépendante du complément ou par des méthodes immunoenzymatiques. L'évaluation du rôle protecteur de la réponse humorale a été réalisée dans différents modèles animaux.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre des protéines membranaires (Johnson, Mc Donald et al. 1983) ou cytoplasmiques (Sharma, Araujo et al. 1984) confèrent une protection à des souris vis-à-vis d'une infestation modérée. La survie est également augmentée lorsque les souris sont infestées par une souche virulente préincubée avec un anticorps dirigé contre une protéine membranaire de 14 kDa (Johnson, Mc Donald et al. 1983).

Les antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) sont d'excellents immunogènes dans la toxoplasmose humaine, induisant une réponse anticorps spécifique précoce et intense (Decoster, Darcy et al. 1988). Chez le rat, Darcy et coll. montrent que le transfert passif d'anticorps dirigés contre les AES protège de façon significative les rats nude (Darcy, Deslée et al. 1988), la déplétion de ces sérums en IgE annulant cet effet protecteur (Ridel, Auriault et al. 1988). L'immunisation par les AES entraine chez le rat une réponse IgA contre trois antigènes de 28,5, 34 et 39 kDa, alors que seul l'antigène de 34 kDa est reconnu par les IgA de souris (Godard, Darcy et al. 1990). Dans un autre modèle murin d'infection orale, la réponse IgA s'est avérée dirigée vers un nombre variable d'antigènes selon la provenance des anticorps, sériques ou présents dans les sécrétions intestinales ou encore dans le lait (Chardès, Bourguin et al. 1990).

#### 1.2-Réponse cellulaire et cytokines

# Lymphocytes T

Les modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'importance de la réponse cellulaire dans la résistance à l'infection par le Toxoplasme. Des hamsters sont protégés par transfert de cellules de la rate ou des ganglions lymphoïdes immuns. Les anticorps seuls ne semblent pas avoir d'effet important mais potentialisent la protection conférée par les cellules (Frenkel 1967). L'injection de cellules thymiques, en induisant la protection de souris nude (Lindberg and Frenkel 1977) ou de cochons d'Inde thymectomisés (Pavia 1987) a permis de confirmer l'importance de la réponse cellulaire.

Chez l'homme, la prolifération T spécifique vis-à-vis d'antigènes du Toxoplasme est démontrée chez les sujets séropositifs pour la toxoplasmose (Krahenbuhl, Gaines et al. 1972). Une absence de réponse proliférative T en présence d'un lysat de parasites (Anderson, Krahenbuhl et al. 1979) ou une altération quantitative des populations T (Luft, Kansas et al. 1984) semble corrélée au développement de signes cliniques de la toxoplasmose acquise, mais également de la toxoplasmose congénitale (Mc Leod, Beem et al. 1985). Hugues suggère que la prolifération spécifique est plus importante et plus reproductible vis-à-vis des antigènes de sécrétion que des extraits totaux de parasites, contenant des molécules normalement non exposées lors de l'infection naturelle (Hughes, Connely et al. 1984).

La caractérisation de marqueurs de différenciation des lymphocytes permet de mieux évaluer les populations cellulaires impliquées. L'étude des cellules circulantes mononuclées d'un patient développant des symptômes d'une toxoplasmose aiguë montre une augmentation du nombre de cellules CD8<sup>+</sup> et NK, et une inversion du rapport CD4/CD8 (Sklenar, Jones et al. 1986). Des cellules T de phénotype CD8<sup>+</sup> sont cytotoxiques vis-à-vis de cellules infectées histocompatibles. L'obtention d'un clone T CD8<sup>+</sup> confirme cette observation (Yano, Aosai et al. 1989).

L'activité cytotoxique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> est confirmée par plusieurs études (Brown and Mc Leod 1990; Hakim, Gazzinelli et al. 1991; Kasper, Khan et al. 1992; Denkers, Sher et al. 1993), d'autres montrant une synergie entre les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (Gazzinelli, Hakim et al. 1991; Parker, Roberts et al. 1991).

L'influence de la réponse cellulaire sur le développement des kystes a également été étudiée. L'injection d'un anticorps anti-CD4 entraîne une réduction des mécanismes inflammatoires de l'encéphalite toxoplasmique (Israelski, Araujo et al. 1989). Le transfert de cellules immunes suivi d'une infestation empêche la formation d'une grande quantité de kystes, la déplétion préalable en cellules CD8<sup>+</sup> annulant cet effet (Parker, Roberts et al. 1991).

#### Macrophages

Plusieurs études notamment ultrastructurales (Jones, Yeh et al. 1972; Nichols and O'Connor 1981) ont révélé que le Toxoplasme était capable de pénétrer activement dans les macrophages et de s'y multiplier dans une vacuole comme dans les autres cellules. Le mécanisme est différent de la phagocytose puisque la vacuole ainsi formée ne fusionne pas avec les lysosomes (Sibley, Weidner et al. 1985; Sibley and Krahenbuhl 1988; Joiner, Fuhrman et al. 1990). A l'appui de ces observations, d'autres travaux ont montré que la composition de la membrane de cette vacuole était différente de celle de la membrane plasmique et des véritables phagosomes (De Carvalho and De Souza 1989; De Carvalho and De Souza 1990).

Les mécanismes mis en oeuvre dans les macrophages alvéolaires humains et de rat seraient non oxydatifs (Catterall, Sharma et al. 1986). La pénétration du Toxoplasme dans les macrophages ne provoque pas le déclenchement des mécanismes oxydatifs, mais de plus, si ce mécanisme est induit par d'autres moyens, le Toxoplasme continue à se multiplier normalement (Chang and Pechere 1989). La présence de Superoxyde dismutase et de Catalase chez le parasite (Sibley, Lawson et al. 1986; Hughes, Boik et al. 1989) semble fortement impliquée dans ses mécanismes de défense. Cependant, pour Hugues et coll., l'activité anti-Toxoplasme maximale est observée avec des macrophages de sujets immuns, ces macrophages libérant de plus grandes quantités de H2O2 (Hughes, Boik et al. 1989).

Parmi les mécanismes pouvant expliquer la destruction des parasites intracellulaires, les intermédiaires de l'oxygène semblent cependant les moins probables (Catterall, Sharma et al. 1986; Chang and Pechere 1989; Sibley, Adams et al. 1993). Au contraire, les arguments en faveur d'une intervention des intermédiaires nitrogène sont plus nombreux (Sibley, Adams et al. 1993).

Une inhibition de la croissance du Toxoplasme dans les macrophages a été obtenue par injection préalable à des souris de l'antigène majeur de surface P30 sous forme recombinante (Makioka and Kobayashi 1991). D'autres travaux montrent que la phagocytose est active quand la surface du parasite est altérée (De Carvalho and De Souza 1990) ou recouverte d'anticorps (Jones, Yeh et al. 1972; Ryning and Remington 1977; Sibley, Weidner et al. 1985; De Carvalho and De Souza 1989; De Carvalho and De Souza 1990). La transfection de fibroblastes par un récepteur Fc présent sur les macrophages permet à ces cellules, à l'origine non phagocytaires, de tuer les parasites opsonisés (Joiner, Fuhrman et al. 1990).

# Cellules NK

L'étude de l'activation des cellules NK au cours de la réponse immune a donné lieu à des travaux contradictoires. Une augmentation de la cytotoxicité des cellules NK humaines vis-à-vis de lignées cellulaires a été induite *in vitro* par incubation des cellules NK avec différentes fractions parasitaires (Sharma, Verhoef et al. 1984). L'activité permettant d'induire cette cytotoxicité peut être inhibée par préincubation avec du sérum humain. Dans le modèle souris, deux études de Hauser tendent à montrer que d'une part l'activité NK cytotoxique varie selon la phase de la maladie, et d'autre part que des cellules NK de souris infestées trois jours auparavant par la souche RH sont cytotoxiques *in vitro* pour les parasites libres eux-mêmes. Les auteurs postulent que le contact direct cellule NK-parasite est nécessaire (Hauser, Sharma et al. 1982; Hauser and Van Tsai 1986).

Au contraire, une suppression de l'activité NK péritonéale a été observée après infestation de souris gestantes (Luft and Remington 1984). Dans un autre modèle, la même mortalité est induite chez des souris déficientes en activité NK. De plus, l'effet direct sur le parasite suggéré plus haut n'est pas mis en évidence (Hughes 1988).

#### Interleukines et cytokines

Trois revues récentes rassemblent les connaissances sur les cytokines et leur influence sur la régulation de la réponse immune, dans divers modèles parasitaires (Sher and Coffman 1992; Sher, Gazzinelli et al. 1992) ou plus précisément dans la toxoplasmose (Beaman, Wong et al. 1992). Ces auteurs insistent sur l'immunomodulation (souvent immunosuppression) induite par les infections parasitaires chroniques. Le rôle des cytokines et surtout leur régulation croisée apparaissent primordiaux dans le contrôle de l'infection ou le développement de pathologies graves.

L'IFNy est l'une des molécules majeures impliquées dans la résistance à l'infection.

Mac Cabe et coll. montrent en 1984 que l'injection d'IFN<sub>Y</sub> protège les souris contre une infestation létale (Mc Cabe, Luft et al. 1984). Cette protection semble associée à une augmentation du taux d'anticorps et à une activation des macrophages. Dans les fibroblastes humains incubés en présence d'IFN<sub>Y</sub>, on observe une inhibition de la croissance des parasites (Pfefferkorn 1987). L'auteur suggère que l'effet de l'IFN<sub>Y</sub> est d'induire la production de l'enzyme dégradant le tryptophane.

Chez la souris au contraire, seuls les macrophages sont activés par l'IFN $\gamma$ , aucun effet n'étant observé sur les fibroblastes (Schwartzman, Gonias et al. 1990). Benedetto et coll. montrent un effet prophylactique de l'IFN $\gamma$  et de l'IL2 recombinants chez la souris. Chez le rat nude, l'IFN $\gamma$  peut avoir un effet préventif, alors que l'IL2 a un effet curatif (Benedetto, Auriault et al. 1991). L'IFN $\gamma$  agit en synergie dans les modèles expérimentaux avec plusieurs drogues utilisées chez l'homme, ainsi qu'avec l'IL1 $\alpha$  et l'IL1 $\beta$  (Beaman, Wong et al. 1992).

Dans le modèle MAIDS, l'absence de contrôle de la phase aiguë ou chronique de la toxoplasmose est corrélée à l'absence de production d'IFNγ (Gazzinelli, Hartley et al. 1992).

La neutralisation de l'IFNy par un anticorps provoque la mort de souris infestées intrapéritonéalement, par une dose permettant normalement le passage en phase chronique (Suzuki, Orellama et al. 1988). La réponse anticorps ne semble pas affectée par ce traitement, alors que l'activation des macrophages est inhibée. Une augmentation du nombre de kystes ainsi que l'apparition de nombreux foyers inflammatoires dans le cerveau sont observées (Suzuki and Remington 1990).

· .

A fortes doses, le TNF (Tumor Necrosis Factor) retarde la mortalité induite par une infestation létale (Black, Israelski et al. 1989; Chang, Grau et al. 1990). Au cours de l'infection, il y a production de TNF détectable au niveau sérique. Cette production peut être induite par injection d'IFN $\gamma$ , les deux molécules agissant en synergie (Chang, Grau et al. 1990). Le TNF $\alpha$  apparait comme le second messager nécessaire à l'activation des macrophages préactivés par l'IFN $\gamma$  (Sibley, Adams et al. 1991). Une régulation autocrine par le TNF $\alpha$  des macrophages préactivés par l'IFN $\gamma$  est envisagée (Sibley, Adams et al. 1993).

Chez l'homme, la production *in vitro* de TNF $\alpha$  par les monocytes et les macrophages peut être induite par incubation avec un sérum immun ou par des parasites préincubés avec ce sérum (Pelloux, Chumpitazi et al. 1992). Une synergie entre le TNF et l'IL1 $\alpha$  ou  $\beta$  a été observée (Beaman, Wong et al. 1992).

L'IL4, l'IL10 et le TGF $\beta$  (Tumor Growth Factor) semblent les trois facteurs impliqués dans l'immunosuppression observée dans les maladies parasitaires et les modèles rétroviraux (Sher, Gazzinelli et al. 1992). Ces trois molécules peuvent abolir l'activation des macrophages induite par l'IFN $\gamma$ . Dans la toxoplasmose, peu de données sont disponibles. La présence de taux élevés d'IFN $\gamma$  et d'IL2 est corrélée à la faible quantité d'IL4 et d'IL5 (Beaman, Wong et al. 1992).

Une étude récente menée dans un modèle murin d'encéphalite toxoplasmique indique que, dans le cerveau sont détectés les messagers codant pour l'IL1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL6 et l'IFN<sub>Y</sub>, contrairement aux transcrits IL2 et IL4 (Hunter, Roberts et al. 1992).

L'augmentation du taux d'IL6 a été observée parallèlement au développement d'une infection létale et à une multiplication exacerbée des parasites dans les macrophages. Au contraire, l'administration d'un anticorps anti-IL6 prolonge la survie (Beaman, Wong et al. 1992).

# 2-ANTIGENES CIBLES

Le Toxoplasme est présent dans l'organisme soit sous forme libre lors de sa dissémination, soit à l'intérieur d'une cellule, protégé par la membrane de la vacuole parasitophore ou du kyste. La recherche d'antigènes protecteurs, cibles de la réponse immune, s'est orientée vers deux grandes classes d'antigènes, les antigènes de surface et les antigènes de sécrétion.

Les antigènes de surface, et en particulier l'antigène P30, accessibles lorsque les parasites sont extracellulaires, ont fait l'objet de nombreux travaux. Des anticorps dirigés contre ces antigènes permettent la lyse complément-dépendante des parasites à la base du Dye-test.

Le rôle protecteur des antigènes de sécrétion a été démontré dans notre laboratoire. Parmi les antigènes de sécrétion, qui constitueraient 90% des antigènes circulants (Hughes and Van Knapen 1982), les antigènes des granules denses sont secrétés par les parasites intracellulaires dans la vacuole parasitophore ou le kyste (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Charif, Darcy et al. 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991; Torpier, Charif et al. 1993). Leur synthèse aux deux stades de différenciation rencontrés chez l'hôte intermédiaire en fait de bons candidats à l'établissement de l'immunité de prémunition développée lors de la toxoplasmose (Capron and Dessaint 1988). En effet, cette immunité est efficace contre les réinfestations et les réactivations. Cela suppose que les antigènes libérés par les parasites enkystés et qui maintiennent l'intensité de cette réponse soient également exprimés au stade tachyzoïte, forme infestante.

# 2.1-Antigènes de surface

Bien que les poids moléculaires des antigènes majeurs de surface varient selon les auteurs, les 4 molécules décrites sont P30 (SAG1), P22 (SAG2), P43 (SAG3) et P35 (SAG4) (Handman, Goding et al. 1980; Couvreur, Sadak et al. 1988; Bonhomme, Boulanger et al. 1990; Foussard, Gallois et al. 1990).

#### -Ancrage des antigènes de surface

L'ancrage de ces molécules à la surface des parasites est élucidé par deux études simultanées. L'antigène P30 (Nagel and Boothroyd 1989) ou les antigènes P43, P35 et P22 (Tomavo, Schwartz et al. 1989), sont ancrés par un groupement glycosylphosphatidyl inositol (GPI), clivable par action de la PI-PLC (phosphatidyl inositol-phospholipase C). Ce clivage aboutit à l'apparition d'un épitope cross-réactif entre toutes ces molécules (Tomavo, Schwartz et al. 1989). Le clonage des ADNc codant pour P30 ou SAG1 (Burg, Perelman et al. 1988) et P22 ou SAG2 (Prince, Auer et al. 1990) a permis de révéler la présence d'une séquence signal N-terminale, attendue pour des protéines exportées à l'extérieur du parasite, mais également d'une seconde région hydrophobe en position C-terminale, caractéristique d'un ancrage GPI. Les molécules précurseurs impliquées dans la synthèse de cet ancrage ont été identifiées (Tomavo, Dubremetz et al. 1992). Cette synthèse peut s'effectuer sur membranes parasitaires isolées (Tomavo, Dubremetz et al. 1992).

# -Glycosylation

La présence de sucres à la surface des parasites a été recherchée par fixation des lectines Concanavaline A, Wheat Germ Agglutinin et Soya Bean Agglutinin. Ces trois lectines se fixent à la membrane du kyste, mais ne se fixent pas en surface des tachyzoïtes (Sethi, Rahman et al. 1977). Cependant, une étude ultrastructurale avait auparavant décrit la présence d'un glycocalyx à la surface des parasites (Vivier and Petitprez 1969). L'utilisation de techniques plus sensibles confirment ces observations, révèlant la présence de sites de fixation de la ConA en surface des parasites (Mauras, Dodeur et al. 1980) ou à la fraction insoluble d'un extrait parasitaire (Johnson, Mc Donald et al. 1981). Le nombre de sites de fixation de la ConA apparait relativement faible, suggérant un faible nombre de molécules glycosylées (Mauras, Dodeur et al. 1980). L'un des antigènes de surface de 43 kDa, présent aux deux stades parasitaires, est glycosylé (Darcy, Charif et al. 1990).

Récemment, la phosphorylation des antigènes de surface a été démontrée (Tomavo, Martinage et al. 1992). Cette phosphorylation dont la fonction reste à déterminer, concerne les résidus Sérine, bien que de nombreux résidus Thréonine soient présents.

# -Vacuole parasitophore

Un phénomène de "shedding" par lequel le parasite se débarrasse des composants membranaires de surface est décrit à propos de parasites incubés avec un anticorps monoclonal anti-P30 lors de l'invasion (Dubremetz, Rodriguez et al. 1985), ainsi que pour les autres protéines de surface (Sibley and Krahenbuhl 1988). L'ancrage des protéines de surface serait clivé par une PI-PLC parasitaire lors du "shedding" (Tomavo, Schwartz et al. 1989). Selon ces auteurs, la formation du réseau résulterait à la fois de la sécrétion de molécules et de la perte des membranes de surface dans la vacuole parasitophore en formation.
### -Aspects immunologiques

L'antigène de surface de 30 kDa, immunogène majeur, a fait l'objet de nombreux travaux (Kasper and Khan 1993). Présent à tous les stades de la division intracellulaire des tachyzoïtes (Dubremetz, Rodriguez et al. 1985), cet antigène possèderait une région immunodominante contenant un épitope unique répété (Rodriguez, Afchain et al. 1985; Santoro, Charif et al. 1986). Cependant, la séquence primaire de l'antigène P30 cloné (Burg, Perelman et al. 1988) ne contient pas d'épitopes répétés. Le séquençage des gènes codant pour les antigènes P30 des souches C et P (Büllow and Boothroyd 1991) a permis de montrer que 8 acides aminés différaient par rapport à la première molécule décrite, obtenue dans la souche RH (Burg, Perelman et al. 1988). Les propriétés antigéniques ne semblent cependant pas affectées.

L'évaluation du rôle protecteur de l'antigène de surface P30 a donné lieu à des résultats parfois contradictoires (Kasper and Ware 1985; Burg, Perelman et al. 1988; Büllow and Boothroyd 1991; Kahn, Ely et al. 1991; Makioka and Kobayashi 1991). Dans le cadre d'études de nouveaux adjuvants, l'immunisation par l'antigène de surface P30 en présence de liposomes (Büllow and Boothroyd 1991; Makioka and Kobayashi 1991) ou de Saponin Quil A (Kahn, Ely et al. 1991) a donné des résultats encourageants.

L'immunisation par la protéine P30 purifiée a permis de démontrer une cytotoxicité des splénocytes CD8<sup>+</sup> vis-à-vis de parasites extracellulaires (Kahn, Ely et al. 1991), ainsi que leur pouvoir protecteur. L'immunisation par une construction octamérique du peptide 48-67 de l'antigène P30 confère une protection de 40% chez la souris et permet, chez le rat, l'induction d'une réponse T spécifique et protectrice (Darcy, Maes et al. 1992).

Des mutants déficients en P22 (Kasper, Crabb et al. 1982) ou en P30 (Kasper 1987) ont été isolés sur la base de leur résistance à la lyse anticorps-dépendante. Ces mutants devraient permettre de mieux appréhender la fonction des protéines de surface lors de l'infection et dans les mécanismes de survie intracellulaire.

# 2.2-Antigènes de sécrétion

# Les rhoptries

Lycke décrit en 1966 un Penetration Enhancing Factor ou PEF présent dans la fraction de bas poids moléculaire des parasites lysés (Lycke and Norrby 1966). Ce facteur, qui agit sur les cellules hôtes, est capable d'augmenter la pénétration d'environ 30%, son activité pouvant être inhibée par des composants de haut poids moléculaire. A haute concentration, le PEF provoque la rupture des membranes plasmiques. Une double altération, mécanique et chimique de la membrane de la cellule-hôte est alors proposée (Lycke, Carlberg et al. 1975).

Un effet voisin du PEF est obtenu avec des polypeptides polycationiques (Werk, Dunker et al. 1984). Seuls, ces polypeptides sont capables d'altérer la cellule-hôte. La phospholipase A2 de venin de serpent est également capable d'augmenter la pénétration. Une activité PLA2 est détéctée dans un lysat de parasites, mais peut être secrétée sous l'influence du Calcium ou d'un pH alcalin (Saffer, Long Krug et al. 1989). Cette enzyme permet d'augmenter la solubilité de ROP1, suggérant que la PLA2 serait impliquée dans la décharge des rhoptries (Saffer and Schwartzman 1991). L'activité PLA2 est confirmée par la présence de lysocithine dans les rhoptries (Foussard, Leriche et al. 1991).

Plusieurs études réalisées à l'aide d'anticorps monoclonaux ont permis de caractériser une dizaine de molécules spécifiquement associées aux rhoptries (Dubremetz, Sadak et al. 1987; Kimata and Tanabe 1987; Sadak, Taghy et al. 1988; Schwartzman and Krug 1989; Bonhomme, Boulanger et al. 1990; Leriche and Dubremetz 1991). Des expériences de marquage métabolique permettent d'observer une maturation, vraisemblablement un clivage nécessaire à leur sécrétion, pour plusieurs de ces protéines (Sadak, Taghy et al. 1988).

Deux d'entre elles, de 66 et 55-60 kDa (ROP1) sont associées à la membrane de la vacuole parasitophore pendant les quelques heures suivant l'invasion (Kimata and Tanabe 1987; Saffer, Mercereau-Puijalon et al. 1992) et disparaissent ensuite, suggérant leur implication précoce dans l'établissement des fonctions de la vacuole parasitophore. Bien que deux antigènes des rhoptries de 42 et 55-60 kDa soient toujours détectés au stade bradyzoïte (Dubremetz, Sadak et al. 1987; Sadak, Taghy et al. 1988), ces organites sont très modifiés chez les parasites enkystés (Porchet-Hennere and Nicolas 1983). De plus, la modification de la membrane de la vacuole, conduisant à l'inhibition de fusion avec les lysosomes, est irréversible si les parasites sont tués après l'invasion (Joiner, Fuhrman et al. 1990). L'auteur envisage donc que seuls les mécanismes précoces de la formation de la vacuole sont importants pour lui conférer sa capacité de protection des parasites.

La caractérisation moléculaire de la protéine ROP1 a révélé une répartition disymétrique des acides aminés. La région N-terminale est acide et riche en Proline, alors que la région C-terminale est basique et riche en Glycine (Ossorio, Schwartzman et al. 1992). L'anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine bloque l'activité du PEF, suggérant que ROP1 pourrait être ou faire partie de ce facteur (Schwartzman and Krug 1989; Ossorio, Schwartzman et al. 1992).

La protéine ROP2 est identique à l'antigène de 54kDa (J.F. Dubremetz, communication personnelle) cloné sur la base de sa capacité à induire la prolifération d'un clone T CD4 humain (Saavedra, De Meuter et al. 1991). Cette molécule possède une région potentiellement transmembranaire .

### Les granules denses

L'exocytose des granules denses a été suggérée par l'observation de granules fusionnant avec les membranes entourant le parasite (Charif, Torpier et al. 1990; Leriche and Dubremetz 1990; Dubremetz, en préparation). Les antigènes localisés dans les granules denses par l'utilisation de réactifs monoclonaux sont également détectés dans la vacuole parasitophore. Parmi les antigènes secrétés en milieu acellulaire en présence de sérum (Darcy, Deslée et al. 1988), les antigènes des granules denses P24, GP28,5 et P21 sont présents aux deux stades parasitaires (Charif, Torpier et al. 1990; Darcy, Charif et al. 1990; Torpier, Charif et al. 1993).

Comme les rhoptries, les granules denses semblent contenir un grand nombre de molécules, bien qu'il ne soit pas formellement établi que tous soient présents dans les mêmes granules simultanément.

Sibley et coll. décrivent un antigène de sécrétion abondant de 32 kDa associé au réseau intraphagosomal (Sibley and Krahenbuhl 1988). De plus, dans les conditions permettant la production *in vitro* de membranes tubulaires, c'est à dire en l'absence de Calcium, un antigène de 22 kDa fixant le Calcium est secrété (Sibley, Lawson et al. 1986). L'antigène de 24 ou 27 kDa décrit par la suite (Darcy, Deslée et al. 1988; Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Charif, Torpier et al. 1990; Leriche and Dubremetz 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991; Leriche and Dubremetz 1991) est vraisemblablement identique à cet antigène de 22 kDa. En effet, la structure moléculaire de l'antigène P24 (GRA1), cloné dans notre laboratoire (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989) révèle une région capable de fixer le Calcium. Cette fixation est

confirmée expérimentalement sur l'antigène recombinant (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989) comme sur l'antigène P24 natif (Charif, Torpier et al. 1990). Après sécrétion, cet antigène est présent dant la vacuole parasitophore (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Charif, Torpier et al. 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991).

Les antigènes de 28 kDa décrits par Sibley (Sibley 1987) et dans notre laboratoire (Charif, Torpier et al. 1990) sont détectés au niveau des microvillosités du réseau membranaire (Sibley and Sharma 1987; Charif, Torpier et al. 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991), mais également sous le plasmalemme des parasites (Charif, Torpier et al. 1990). La glycosylation de cet antigène est mise en évidence par fixation à la ConA (Charif, Torpier et al. 1990) ou par incorporation de Glucosamine (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991). Cette glycosylation est appuyée par la détection de GP28,5 ou GRA2 au niveau du RE des parasites (Charif, Torpier et al. 1990). Sa structure moléculaire (Parmley, Sgarlato et al. 1992; Mercier, Lecordier et al. 1993) permet d'envisager la formation de deux hélices amphiphatiques pouvant s'associer aux lipides (Mercier, Lecordier et al. 1993).

L'antigène GRA4 de 40 kDa est également glycosylé et associé après sécrétion au réseau membranaire (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991). Cet antigène, reconnu par les IgA sécrétoires (Chardès, Bourguin et al. 1990) a été cloné récemment (Mevelec, Chardès et al. 1992). Cette protéine, riche en Proline, possède une région transmembranaire (Mevelec, Chardès et al. 1992) et est détectée dans le réseau membranaire de la vacuole parasitophore après l'invasion (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991).

Deux antigènes de 30 kDa ont été décrits. L'un est associé au réseau (Linder, Thors et al. 1992), alors que le second (GRA3) est associé à la membrane de la vacuole parasitophore (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991).

L'antigène P21, défini par l'anticorps monoclonal TG17-113 possède également une localisation membranaire (figure 3). Décrit dans un premier temps dans notre laboratoire comme présent dans les granule denses et associé au réseau (Charif, Torpier et al. 1990), cet antigène est également détecté à la membrane de la vacuole parasitophore (figure 3A) et dans la paroi des kystes (figures 3B et 3C) (Torpier, Charif et al. 1993).



<u>Figure 3</u> : Immunolocalisation ultrastructurale de GRA5 au stade tachyzoïte (souche Prugniaud) et bradyzoïte (souches Prugniaud et 76K)

**A** : Au stade tachyzoïte, l'antigène P21, détecté par l'anticorps monoclonal Tg17-113, est présent dans les granules denses des parasites (Gd). Après secrétion, l'antigène P21 est retrouvé dans la vacuole parasitophore (V) présente dans le cytoplasme de la cellule hôte (C). Le marquage est spécifiquement associé à la membrane délimitant cette vacuole (pointes de flèches), et peut également être observé au niveau des microvillosités du réseau membranaire sous jacent (flèche). (x6300)



**B** : Kyste de la souche Prugniaud *in vitro* : L'antigène P21 est détecté dans la matrice de deux granules denses (flèches). La membrane délimitant ce kyste est fortement marquée (pointes de flèches) mais, contrairement au stade tachyzoïte, l'antigène P21 semble moins abondant au sein du réseau membranaire de la vacuole parasitophore (V). (x6300)



**C** : Kyste intracérébral de la souche 76K : De la même façon qu'au stade tachyzoïte, l'antigène P21 est détecté dans les granules denses (Gd) des parasites. *In vivo*, la paroi du kyste est composée de plusieurs strates. Alors que GRA2 est détecté au niveau de l'assise proche de l'espace intrakystique, GRA5 est spécifiquement localisé en association avec les nombreuses invaginations de la membrane délimitant la paroi du kyste (pointes de flèches). (Ga : grains d'amylopectine ; mc : micronèmes ; N: noyau ; R : rhoptries ; SN : système nerveux. (x8200)

Fixation : Glutaraldéhyde. Inclusion : Lowicryl K4M. Les coupes sont incubées séquentiellement avec l'anticorps monoclonal de souris TG17-113 anti-P21 puis des anticorps anti-souris immunopurifiés couplés à l'or colloïdal (Janssen, 1nm). Ce marquage est amplifié par la méthode lactate d'argent/Hvdroquinone

# But du travail

La stratégie vaccinale contre la toxoplasmose développée dans notre laboratoire repose sur l'hypothèse que l'immunité concomitante (contrôlant la réinfestation et la réactivation) observée chez l'homme est due à des antigènes communs de stade, c'est-àdire libérés par les parasites enkystés et stimulant de façon permanente le système immunitaire (Capron and Dessaint 1988). Parmi ces antigènes communs de stade, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) qui constituent 90% des antigènes circulants (Hughes and Van Knapen 1982) et apparaissent être de puissants immunogènes dans la toxoplasmose humaine (Decoster, Darcy et al. 1988).

L'importance des AES dans les mécanismes de protection a été démontrée dans deux modèles de toxoplasmose expérimentale, chez la souris et le rat nude (Darcy, Deslée et al. 1988; Duquesne, Auriault et al. 1990; Darcy, Torpier et al. 1992).

Le clonage moléculaire et l'obtention de plusieurs sondes monoclonales ont permis de caractériser 3 antigènes ES communs aux deux stades tachyzoïte et bradyzoïte, les antigènes P24, GP28,5, P21. Ces antigènes sont stockés dans les granules denses du Toxoplasme et ont été renommés GRA1, GRA2 et GRA5 respectivement, selon la nomenclature proposée par Sibley et coll. Ces antigènes sont sécrétées dans la vacuole parasitophore lors de l'invasion de la cellule-hôte, ce qui suggère un rôle important dans les mécanismes de survie intracellulaire des Toxoplasmes.

Les molécules GRA1 et GRA2, clonées au laboratoire (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Mercier, Lecordier et al. 1993) ainsi que GRA5 ne possèdent pas la même distribution (Charif, Torpier et al. 1990; Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991; Torpier, Charif et al. 1993) :

- GRA1 est une protéine fixant le Calcium observée dans l'espace vacuolaire ;

- GRA2 est détectée en étroite association avec les microvillosités du réseau membranaire de la vacuole parasitophore et du kyste, sa structure moléculaire suggérant une association possible aux lipides (Mercier, Lecordier et al. 1993) ;

- GRA5, rarement retrouvée dans le réseau, est localisée spécifiquement à la membrane de la vacuole parasitophore ou dans la paroi du kyste.

44

La localisation de l'antigène P21, au contact du cytoplasme de la cellule-hôte, suggère son intervention dans les mécanismes d'échappement et/ou dans les fonctions de barrière et de surface d'échange de ces membranes (figure 3).

Dans le cadre de l'étude de la relation structure-trafic (ciblage commun dans les granules denses et différentiel dans la vacuole parasitophore), ce travail visait à caractériser cette troisième classe de molécules, stockées dans les granules denses et associées à la membrane de la vacuole parasitophore.

••

# RESULTATS

· .

# I - CARACTERISATION DE L'ANTIGENE P21 NATIF

L'antigène P21 est défini par l'anticorps monoclonal TG17-113 comme étant un antigène de secrétion (Charif, Darcy et al. 1990). Le criblage de la banque d'expression par cet anticorps monoclonal n'a pas permis la reconnaissance d'un clone d'ADNc. Une stratégie de purification de l'antigène P21 par RP-HPLC a donc été mise en oeuvre en collaboration avec le groupe du Pr. Tartar (laboratoire de Chimie des Biomolécules, URA CNRS 1309, Institut Pasteur de Lille), afin d'obtenir un immunsérum anti-P21 et de microséquencer la protéine P21.

## A-Purification de l'antigène P21 natif par RP-HPLC

Pour purifier l'antigène P21, les protéines d'un lysat NP40 du stade tachyzoïte sont séparées par chromatographie en phase reverse (RP-HPLC) (figure 4). Les fractions contenant les antigènes GRA2 et P21 sont repérées par "dot blot" à l'aide des anticorps monoclonaux TG17-113 et TG17-179 respectivement (Charif, Darcy et al. 1990) (figure 4). La fraction retenue est analysée sur un gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent (figure 5A). Cette coloration révèle deux bandes de poids moléculaires voisins dues à une dégradation de l'antigène P21 (figure 5A, piste 1). En effet, ces bandes réagissent avec l'anticorps monoclonal TG17-113 (figure 5B, piste 2). Un bon enrichissement des fractions a donc été obtenu en une seule étape de séparation par chromatographie.

# B-Obtention du sérum anti-P21

En vue d'obtenir un sérum polyclonal, des rats Fischer ont été immunisés par la fraction HPLC enrichie en antigène P21, en présence d'adjuvant incomplet de Freund. L'immunsérum obtenu a été testé par Western blot sur un extrait de tachyzoïtes. Cette analyse a révélé une polyspécificité inattendue, compte tenu de l'homogénéité des fractions (figure 5C). Trois bandes majeures sont en effet détectées : 21, 28 et 32 kDa. Ces trois bandes sont d'égale intensité, suggérant soit la présence dans les fractions de quantités minimes de contaminants très immunogènes, soit une réactivité croisée entre ces différents antigènes.



# Figure 4 : Purification de l'antigène P21

Les protéines de tachyzoïtes extraites par le NP40 sont séparées par RP-HPLC. Chaque fraction est testée en dot blot. Les antigènes de sécrétion GP28,5 ou GRA2 (pic n°1) et P21 (pic n°2) sont élués successivement.



# Figures 5A et 5B : Analyse en SDS-PAGE des fractions HPLC enrichies en antigène P21

Les fractions purifiées par RP-HPLC contenant environ  $12\mu g$  d'antigène P21, et un extrait total de tachyzoïtes (équivalent à  $2x10^7$  parasites) sont soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 13% et analysés par coloration au nitrate d'argent (**A**) ou en Western blot (**B**).

A : Piste 1 : antigène P21 purifié ; Piste 2 : protéines de tachyzoïtes extraites par le NP40.

**B** : Analyse des fractions HPLC en Western blot révélé par l'anticorps monoclonal TG17-113 anti-P21 ; Piste 2 : fraction majeure ; Pistes 1 et 3 : fractions +1 et -1 ; Piste 4 : extrait de tachyzoïtes.

# Figure 5C : Analyse de la spécificité du sérum de rat anti-P21

Le sérum de rat obtenu par immunisation avec les fractions enrichies en antigène P21 est analysé sur un Western blot d'extrait de tachyzoïtes. Trois bandes sont détectées, à 21, 28 et 32 kDa. La bande reconnue à 28 kDa pourrait être due à la présence de faibles quantités de l'antigène de sécrétion GRA2 dans les fractions HPLC. En effet, lors de la purification par chromatographie, cet antigène très immunogène est élué dans les fractions qui précèdent celles contenant l'antigène P21 (figure 4).

Malgré sa polyspécificité, ce sérum de rat anti-fraction HPLC a été utilisé pour le criblage de la banque d'ADNc de tachyzoïtes construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ Zap II.

### C-Microséquençage de l'antigène P21

Un premier essai de séquençage par la dégradation d'Edman (Edman 1956) a été effectué sur les fractions HPLC enrichies en antigène P21. Aucun résultat n'a pu être obtenu de cette façon, ce qui suggère un bloquage de l'extrémité N-terminale par une modification post-traductionnelle. Une digestion partielle par la trypsine (clivage après les résidus Lysine et Arginine) des fractions contenant l'antigène P21 a donc été réalisée, afin de microséquencer les peptides ainsi obtenus. Ceux-ci ont été séparés par chromatographie (figure 6A). L'absence de pics contaminants sur le profil du chromatogramme confirme l'homogénéité des fractions soumises à la digestion par la trypsine. Six pics majeurs ont été purifiés en quantité suffisante pour être microséquencés par la dégradation d'Edman (figure 6A, pics 1 à 5b). Six séquences majeures (figure 6B) et une ou plusieurs séquences mineures (figure 6C) ont été déduites des pics majeurs.



<u>Figure 6</u> : Microséquençage de la fraction enrichie en antigène P21 L'antigène P21 purifié par RP-HPLC est partiellement digéré par la trypsine. Les peptides ainsi obtenus sont séparés par RP-HPLC.

A : Les pics numérotés de 1 à 5b correspondent aux peptides dont la séquence est retrouvée dans le cadre de lecture de l'insert codant pour l'antigène P21. Le pic n°6 représente l'antigène non digéré.

B : Séquences peptidiques obtenues à partir des pics majeurs. La séquence de ces peptides est retrouvée dans la séquence déduite des inserts codant pour l'antigène P21.
Le peptide 5a correspond aux résidus N-terminaux du peptide 5b.

C : Séquences peptidiques mineures n'appartenant pas à l'antigène P21.

# II - CARACTERISATION DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE P21

# A-Isolement et caractérisation des clones d'ADNc

#### 1-Obtention des clones d'ADNc et classification

La banque d'ADNc a été construite dans le vecteur d'expression  $\lambda$ Zap II (Stratagène), à partir de 5µg d'ARN poly(A) de tachyzoïtes. La ligation dans les bras du vecteur  $\lambda$ Zap II de 2µg d'ADNc double brin a permis l'obtention de 1x10<sup>6</sup> recombinants avant amplification. Le criblage de 10<sup>4</sup> plages de lyse à l'aide du sérum de rat anti-P21 décrit plus haut a conduit à l'isolement de 17 clones d'ADNc. La polyspécificité du sérum, suggérant fortement la présence de plusieurs familles de clones, nous a conduit à entreprendre un exercice de regroupement de ces clones. Un criblage différentiel avec l'anticorps monoclonal TG17-179 dirigé contre l'antigène GP28,5 (GRA2) a permis la reconnaissance d'un seul clone. Les 16 clones restants ont donc été "excisés" (passage *in vivo* à la forme plasmidique pBluescript) et classés par hybridations croisées : l'un des inserts purifié est marqué par la Digoxigénine et hybridé en Southern blot à tous les autres clones digérés de façon à libérer l'insert ADNc. Quatre familles d'hybridation ont ainsi été identifiées. Elles sont représentées par les inserts 1, 3, 13 et 33.2 et contiennent respectivement 6, 1, 6 et 3 clones d'ADNc.

# 2-Caractérisation des familles de clones

# a-Oligonucléotides déduits des séquences peptidiques

Afin de caractériser la famille de clones codant pour l'antigène P21, nous avons dans un premier temps déduit des séquences oligonucléotidiques à partir des séquences peptidiques obtenues par microséquençage de l'antigène P21 natif (figure 6). La séquence des oligonucléotides "dégénérés" a été déterminée à l'aide de travaux résumant l'usage du code génétique chez le Toxoplasme (Johnson 1990), complétés par les séquences des antigènes clonés dans le laboratoire (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Mercier, Lecordier et al. 1993). Cependant, le nombre trop faible de séquences connues a entraîné de nombreuses incertitudes et ces oligonucléotides ne se sont hybridés sur aucune des familles de clones en Southern blot.

# b-Produits de traduction des clones

Dans un deuxième temps, nous avons analysé les produits de traduction codés par les inserts d'ADNc. En effet, le vecteur pBluescript permet, grâce au promoteur de la T3 ARN polymérase cloné en amont du site d'insertion des ADNc, de transcrire *in vitro* l'ARNm correspondant à l'insert. Cette synthèse a été effectuée pour les plus longs inserts de chaque famille de clones. La traduction *in vitro* (qui ne peut avoir lieu que si le clone possède le codon d'initiation de la traduction) de ces ARNm a été réalisée en présence de <sup>35</sup>S-méthionine.

L'analyse de la taille de ces produits de traduction en SDS-PAGE (figure 7) nous a permis d'écarter deux familles de clones : la première représentée par le clone 33.2 (figure 7, piste d), dont le produit de traduction a un poids moléculaire de 25 kDa, la seconde, représentée par le clone 3 (piste b), dont le produit de traduction migre aux environs de 15 kDa. Bien que le critère de taille ne soit pas suffisant pour ce dernier, l'absence d'autres clones dans cette famille permet de supposer que ce peptide ne correspond à aucune des trois bandes majeures reconnues par le sérum de criblage.

L'absence de produit de traduction pour les deux autres familles 1 et 13 (pistes a et c respectivement) peut être expliquée par l'absence de codon ATG initiateur et de résidus méthionine dans la séquence protéique.

#### c-Sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes

Cette technique consiste à purifier par affinité les anticorps reconnaissant chacune des protéines recombinantes à partir d'un sérum polyspécifique. L'élution des anticorps ainsi purifiés permet d'obtenir en quelque sorte l'équivalent d'un sérum monospécifique.



# Figure 7 : Produits de traduction codés par les inserts ADNc

L'ARNm correspondant aux inserts ADNc est synthétisé *in vitro* puis traduit en présence de <sup>35</sup>S-Met. Les produits de traduction (Pt) sont analysés en SDS-PAGE. Piste a : Pt de l'insert 1 ; Piste b : Pt de l'insert 3 ; Piste c : Pt de l'insert 13 ; Piste d : Pt de l'insert 33.2 ; Piste e : Pt de l'ARN total de tachyzoïtes.

#### Sélection négative

Le sérum de rat anti-P21 a été utilisé en sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes exprimées par les clones sous leur forme phagique ( $\lambda$ Zap II). La fragilité particulière des anticorps de rat ne nous a pas permis d'isoler spécifiquement les anticorps anti-P21, et ce malgré l'utilisation de deux protocoles d'élution différents (élution à pH acide par le glycocolle et à haute salinité par le KSCN).

Néanmoins, l'utilisation de cette technique a conduit à la caractérisation d'une nouvelle famille de clones, par l'épuisement sélectif des anticorps anti-protéines recombinantes (figure 8). Le sérum épuisé sur le clone 13 a en effet permis d'observer la disparition d'une bande à 32 kDa (piste c), ceci par comparaison avec le profil obtenu avec le sérum non épuisé (piste d).

#### Sélection positive

Les clones codant pour l'antigène P21 ont été finalement caractérisés en sélection d'anticorps, mais cette fois grâce à un sérum de souris dirigé contre l'antigène P21 purifié par HPLC. En Western blot, ce sérum reconnait trois bandes majeures à 21, 28 et 32 kDa dans un extrait total de tachyzoïtes, mais également de nombreuses bandes mineures (figure 9, piste d). La sélection d'anticorps a été réalisée sur les deux familles représentées par les clones 1 (piste f) et 13 (piste e), ce dernier ayant été précédemment caractérisé par épuisement des anticorps dirigés contre une protéine de 32 kDa.

Les anticorps fixés sur les protéines recombinantes ont été élués par le KSCN. Leur spécificité a été analysée après dialyse sur un Western blot d'extrait de tachyzoïtes. Les anticorps sélectionnés sur le clone 1 (piste f) détectent une bande comigrant avec celle reconnue par le monoclonal TG17-113 (piste c), ainsi qu'une bande plus faible à 32 kDa (flèches). A l'inverse, les anticorps élués du clone 13 (piste e) révèlent une bande à 32 kDa (confirmant le résultat obtenu par déplétion du sérum de rat) et une bande à 21 kDa, avec cette fois une intensité pratiquement identique. Bien qu'une insuffisance des lavages avant élution soit toujours possible, cette observation renforce l'hypothèse formulée plus haut d'une réactivité croisée entre ces deux antigènes.



# Figure 8 : Epuisement de sérum sur les protéines recombinantes

Le sérum de rat dirigé contre la fraction HPLC enrichie en antigène P21 est épuisé sur les protéines recombinantes et comparé au sérum non épuisé sur un Western blot d'extrait total de tachyzoïtes "S2-CHAPS".

Piste a : Sérum de rat épuisé sur le clone 1 ; Piste b : sérum épuisé sur le clone 3 ; Piste c : sérum épuisé sur le clone 13 ; Piste d : sérum de rat non épuisé. La flèche indique la disparition d'une bande à environ 32 kDa pour le sérum épuisé sur le clone 13.



# Figure 9 : Sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes Western blot d'extrait "S2-CHAPS" de tachyzoïtes révélé par :

Piste a : sérum hyperimmun de lapin ; Piste b : sérum de lapin anti-P30 (SAG1) purifié par HPLC ; Piste c = anticorps monoclonal de souris TG17-113 anti-P21 ; Piste d : sérum de souris dirigé contre la fraction HPLC enrichie en antigène P21 et utilisé en sélection d'anticorps ; Piste e : anticorps sélectionnés sur le clone 13 ; Piste f : anticorps sélectionnés sur le clone 1.

# 3-Production de sérums anti-protéines recombinantes

Afin d'approfondir l'étude de la réaction croisée apparente entre les deux antigènes de 21 et 32 kDa, les polypeptides codés par les inserts 1 et 13 ont été produits sous forme recombinante dans *E. coli* afin d'obtenir des sérums anti-P21 et anti-P32. Les inserts ont été sous-clonés dans le vecteur plasmidique d'expression pGEX 2T (Smith and Johnson 1988), de façon à produire une protéine de fusion avec la protéine Sj 26. Cette protéine de 26 kDa, une Glutathion S-transférase de Schistosoma japonicum, possède une très haute affinité pour le glutathion : le couplage de ce peptide à des billes d'agarose permet une purification très rapide de la Sj 26 native ou fusionnée (figure 10).

L'analyse en SDS-PAGE permet d'observer la production des antigènes P21 et P32 recombinants en fusion (figure 10A, pistes a et b), ainsi qu'un un taux important de dégradation. Ces deux antigènes recombinants sont reconnus par le sérum de souris dirigé contre la fraction HPLC (figure 10B, pistes a et b), contrairement à la protéine EF1 $\beta$  de *T. cruzi* (piste c) et à la protéine Sj26 recombinante non fusionnée (piste d).

Les sérums anti-protéines recombinantes ont été produits par injection des protéines de fusion en présence d'ACF. L'analyse de la réponse anticorps dirigée contre chacune des protéines de fusion a confirmé la réactivité croisée entre les deux antigènes. Les deux sérums anti-P21 et anti-P32 recombinantes (figure 11, pistes b et c) révèlent en commun une bande à 32 kDa et un doublet à environ 28 kDa. Le sérum anti-P21 recombinante (piste b) reconnait un antigène de 21 kDa, ce qui est attendu. Or, le sérum anti-P32 recombinante (piste c) détecte un antigène à 24 kDa.

Les antigènes de 32 et 21 kDa reconnus par les sérums anti-protéines recombinantes comigrent avec ceux détectés par le sérum de souris dirigé contre la fraction HPLC (piste a). Par contre, ce dernier révèle une simple bande à 28 kDa (qui pourrait correspondre à l'antigène GRA2, détecté par le monoclonal TG17-179, piste e) et non pas un doublet. De plus, l'antigène de 24 kDa n'apparait pas. La réactivité croisée confirmée pour les antigènes P21 et P32 semble donc s'étendre à d'autres molécules.



# Figure 10 : Purification des protéines P21 et P32 recombinantes

Les protéines recombinantes fusionnées à la Glutathion S-transférase Sj26 sont purifiées par affinité et analysées en SDS-PAGE. Le gel est coloré au Bleu de Coomassie (**A**) ou transféré. Le Western blot est alors révélé par le sérum de souris dirigé contre la fraction HPLC enrichie en antigène P21 (**B**) ou par un sérum de lapin anti-Sj26 (**C**). Pistes a : Antigène P21 recombinant fusionné ; Pistes b : Antigène P32 recombinant ; Pistes c : Antigène EF1β-25 de *T. cruzi* recombinant fusionné (B. Plumas-Marty, soumis) ; Pistes d : Sj26 non fusionnée.



# Figure 11 : Analyse de la réactivité croisée entre les antigènes P21 et P32

Western blot d'extrait de tachyzoïtes "S2-CHAPS" révélé par :

Piste a : sérum de souris dirigé contre la fraction HPLC enrichie en antigène P21 ; Piste b : sérum de souris obtenu par immunisation avec l'antigène P21 recombinant en fusion avec la protéine Sj26 ; Piste c : sérum de souris obtenu par immunisation avec l'antigène P32 recombinant en fusion ; Piste d : anticorps monoclonal de souris anti-P21 ; Piste e : anticorps monoclonal de souris anti-GP28,5 ; Piste f : sérum de lapin anti-P30 (SAG1) ; Piste g : Sérum de souris anti-Sj26 non fusionnée.

# B-Détermination de la séquence du gène codant pour l'antigène P21

#### 1-Séquençage des inserts ADNc

# a-Insert 1 (600 pb)

Le séquençage nucléotidique partiel de la partie 5' de l'insert 1 a confirmé les résultats de la sélection d'anticorps. En effet, la séquence peptidique déduite de la séquence nucléotidique a permis de retrouver dans l'un des cadres de lecture deux peptides obtenus par microséquençage de l'antigène P21 natif. Après sous-clonage de l'insert 1 dans les dérivés mp18 et mp19 du phage M13, l'ADNc 1 a été entièrement séquencé grâce à des oligonucléotides internes de synthèse. Le plus long cadre de lecture ouvert montre une séquence codant potentiellement pour 94 acides aminés (figure 12). Le codon stop est suivi par une région 3' non traduite de 319 pb, terminée par une queue poly(A). La taille totale de ce clone est donc de 601 pb. Quatre des cinq séquences peptidiques majeures microséquencées (figure 6B) sont retrouvées parmi les 94 acides aminés codés par le clone 1, soit environ 44% de la séquence. Le séquençage d'un second insert de cette famille a montré un recouvrement des deux séquences dans la partie codante, et une divergence de quelques paires de bases au niveau du site de polyadénylation.

Plusieurs observations montrent que l'insert 1 est incomplet :

-la séquence de l'insert 1 est dépourvue du codon ATG initiateur ;

-cette séquence contient dans sa partie 5' une séquence codant pour les 3 derniers acides aminés du cinquième peptide majeur (G-A-R) obtenu en microséquence (voir figure 6A) ;

-l'hybridation de l'insert 1 sur les ARN totaux de tachyzoïtes en Northern blot révèle un messager unique d'environ 850 bases (figure 13), soit environ 250 bases de plus que l'insert 1.

### b-Séquençage de l'insert 22 (810 pb)

Afin d'obtenir un clone d'ADNc et un clone génomique contenant la copie complète du gène, la banque d'ADNc construite en  $\lambda$ Zap II et la banque génomique construite en EMBL 3 ont été criblées en hybridation, à l'aide de la partie 5' de l'insert 1 (fragment EcoRI-Pstl de 130 pb, figure 14). Cette sonde a été choisie de façon à sélectionner des clones au moins aussi longs en 5' que le clone 1, puisque le principe de construction de la banque d'ADNc permet d'obtenir des inserts possèdant tous une extrémité 3' complète.

3001	CGC	ATG	ACT	CCCTC	AG	GTG	GTT.	AGCO	G G	AGA	AACC	TC A	GATC	CCT	<u>CG</u>	GCG	<u>ÇGC</u>	<u>G</u> ACG	CG	TGC	CAGA	G -144
CGCG	GGA	CGG	GGT	<u>GGC</u> AF	ACG	AGA	CAC	GTTI	r G	GAT	AAAG	GT C	CTGC	CAG	GT	TGT	GGA	атса	GA	CGT	GTGG	G -74
CTGT	тссо	GCG	TCG	GTTTC	GGT	TTG	TGC	AGAC	G A	.CGC2	ACTG	AC G	GTTG	ACG	тс	GAT	CGG	CACT	CG	ATC	CTAC	C -4
GTCA	GTC	AAT	TTT.	2 D ATTTT	IGG	TTT	TTG	CAG	ΥТ	ATC	ATCG	cg c	GTGT	GTT	CA	CTC	TAA	CTGT	GT	GTA	TGGT	r 6 <b>7</b>
+1 CACT	GTT	TTT	TAT	TGCG	ATT	TTC	GTG.	AAGI	ΓA	ACA	AA A	TGGC	GTCT	GTA	ААА	CGC	GTC	GTTG	TGG	CGG	TAAT	G 139
				-	_	-						ма	. s	v	к	R	v	v	v	A	VМ	12
ATC	GTG	AACO	TGC	TGGC	TTT	ATT	TTT	GTG	GC	GTT	GCCG	GTTC	AACG	CGT	GAC	GTA	GGG'	TCAG	GCG	GGG	ATGA	C 214
т	v	N	v	т. А	L	 т	F	v	G	v	A	G S	 т	R	D	v	G	s	G	G	ם ם	37
-	•	••	•		-	_	-		-			•	-								1	
TCC	1 GAA	<b>S</b> GTO	ста	محمحم	GCGI	GAA	CAA	CAAG	CAG	GTA	CAAC	ААСА	CGAR		AAT	GAA	GAC	сдат	CGT	ידאדי	TCGA	A 780
			<u>а</u>	9000. P G	ج	F		0		v	0.1.0	о н		0	N	 ج	סס	2		т.	F 7	67 67
		<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>			<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	• *• • •	<u> </u>	<u> </u>	•—			••••	<u> </u>	<u> </u>	<u> </u>	<u></u>	
200	~~~			~~~~~	~ . ~ ~		<u> </u>	~~ \	~~~~	200	3.CTC	2					~~ <del>~</del>	~~~~			ოოიო	C
AGG	GGR	AGA(	3CAG		JAC.	GGA				נטטאו												- 304 - 37
<u></u>	G	R	<u>A</u>	A V		<u> </u>		2	_ <u></u>	<u></u>	T I	A V		<u> </u>	4	<u>.</u>		V		<u>A</u>	<u>v v</u>	- 87
						а																
TCA	CTA	CTGO	GAT	TGTT	GAA	+ AAGG	AGG	AGA	AGA	CGC	GCGA	TTCA	AGAA	AGAG	AGC	AAG	GAG	TCTG	GCAP	ACCG	CGGA	A 439
TCA S	CTA L	CTGC L	CGAT R	TGTT L L	gaa <i>i</i> ] k	AAGG R	AGG R	AGAJ R	AGA R	ICGCO R	GCGA	TTCA	AGAA ) E	AGAG E	AGC S	CAAG K	GAG E	TCTO S	GCAA A		CGGA	A 439 _ 112
TCA S	CTA L	CTG(	CGAT R	TGTT(	gaa <i>i</i> ] k	AAGG R	AGG R	AGAJ R	AGA R	CGCO R	GCGA	TTCP	AGAA <u>E</u>	AGAG E	AGC S	AAG K	GAG 	TCTG S	CAP A		CGGA	A 439 _ 112
TCA S GAG	CTA L GAA	CTGC L GAAC	CGAT R GTTG	TGTTO L L CCGAO	gaaj ] k ggaj	AAGG R AGAT	AGG R 'AAG	AGAI R GGGG	AGA R CAC	CGCO R TGTO	GCGA <u>A</u> GTTG	TTCP I C	AGAA <u>E</u> GCTC	AGAG <u>E</u> CTTI	AGC S	CAAG K SGTC	GAG E 5 TCA	TCTO S GCG	A A TG2	ACCO T.	CGGA A <u>E</u> ATTTA	A 439 112 512
TCA S GAG	CTA L GAA E	CTGC L GAAC E	CGAT R GTTG V	TGTT LLL CCGA	GAA <i>I</i> ] K GGAI E	AAGG R AGAT D	AGG R AAG K	AGAJ R GGGG G	AGA R CAC H	CGCO R TGTO C	GCGA <u>A</u> GTTG V	I C I C CTCC A F	AGAP <u>E</u> GGCTC R L	AGAG E CTTT F	SAGC S S TGTT V	XAAG K SGTC V	GAG <u>E</u> 5 TCA S	TCTG S GCG A	CAP A TGP		CGGA	A 439 - <sup>112</sup> 512 133
TCA S GAG	CTA L GAA E	CTGC L GAAC E	GAT R GTTG V	TGTT( L L CCGA( A E	GAAJ ] K GGAJ E	AAGG R AGAT D	AGG R AAG K	AGAI R GGGG G	AGA R CAC H	CGC R TGT C	GCGA A GTTG V	TTCA I C CTCC A F	AGAA 2 E GGCTC 8 L	AGAG E CTTI F	AGC S GTI V	XAAG K EGTC V	GAG <u> </u>	TCTG S GCG A	A A TG2	ACCG T.	CGGA A <u>E</u> ATTTA	A 439 _ <sup>112</sup> 512 133
TCA S GAG E GTGC	CTA L GAA E	CTGC L GAAC E TAG	GAT R GTTG V CGC	TGTT L L CCGA A E	GAA/ ] K GGA/ E TGT	AAGG R AGAT D ATC	R R AAG K	AGAJ R GGGG G	AGA R CAC H T A	CGCC R TGTC C	GCGA A GTTG V GCAC	TTCA I C CTCC A F	AGAA <u>E</u> GGCTC & L	AGAG E CTTI F ACGI	AGC S GTT V CGT	CAAG K SGTC V CGT	GAG E TCA S	TCTG S GCG A TATC	A A TG2	ACCG <u>T</u> . AGGA	CGGA A <u>E</u> ATTTA	A 439 - <sup>112</sup> 512 133 A 582
TCA S GAG E GTGC GACG	GAA GAA E GTG	CTGC L GAAC E TAG GAC	GAT R GTTG V CGC GCC	TGTT( L L CCGA( A E CAGCA	GAAJ GGAJ E TGT TCA	AAGG R AGAT D ATC GAG	AGG R AAG K CGAT	AGAI R GGGG G CGA	AGA R CAC H T A G C	CGCC R TGTC C ACAG	GCGA A GTTC V GCAC TTGC	I C CTCC A F CGG 1 GAA (	AGGA <u>E</u> GGCT( R L TTGG <i>i</i> GAAA <i>i</i>	AGAG E CTTI F ACGI	SAGO S GTT V CGT	XAAG K SGTC V CGT TGG	GAG E TCA S CTG	TCTG S GCG A TATC AATC	A A TG2	ACCG T AGGA	A E	A 439 - <sup>112</sup> 512 133 A 582 A 652
TCA S GAG E GTGC GACG CAGA	CTA L GAA E GTG GCA	CTGC L GAAC E TAG GAC CAG	GAT R GTTG V CGC GCC GAG	TGTT L L CCGA A E CAGCA CAGCA	GAAZ GGAZ E TGT TCA CGT	AAGG R AGAT D ATC GAC GGT	AGG R AAG K CGAT GCGT	AGAI R GGGG G CGA CGAT	AGA R CAC H T 2 G C C C	CGCC R TGTC C ACAG CACG	GCGA A GTTG V GCAC TTGC GTGC	I C I C CTCC A F CGG 1 SAA C CGT 2	AAGAA GGCTC R L TTGGA GAAAA	AGAG E CTTT F ACGI ATGI	SAGO S TGT TGT TGT	CAAG K SGTC V CGT TGG CTC	GAG E TCA S CTG TGT	TCTG S GCG A TATC AATC ATA2	$\frac{1}{1}$	ACCG T AGGA	A E	A 439 112 512 133 A 582 A 652 C 722
GAG GAG E GTGC GACG CAGA AAGG	CTA L GAA E GTG GCA TAC ACC	GAAC E TAG GAC CAG TTT	CGAT R GTTG V CGC GCC GAG TTT	TGTT LLL CCGA A E AGCA ATTG GTTG	GAAJ GGAJ E TGT TCA CGT AGC	AAGG R AGAT D ATC GAC GGT ACA	AGG R AAG K CGAT GCGT TGAT	AGAI R GGGG CGA CGAT CGAT	AGA R CAC H T 2 G C C C A 2	CGCC R TGTC C ACAG CACG STGTC ACCA	GCGA A GTTG GCAC TTGC GTGC GTGZ	TTCA I C CTCC A F CGG I GAA ( CGT A ATT (	AAGAA GGCTC L TTGGA GAAAA AGAGC	AGAG E CTTI F ACGI ATGI SAGG	SAGC S GTT V GT GT GT GC SCG	CGTC CGTC CGT TGG CTC GGT	GAG E TCA S CTG TGT GTG	TCTG S GCG A TATC AATC ACGC	$\frac{TG}{A}$	ACCG T AGGA CTTC CTCC ATGA	CGGA A <u>S</u> ATTTA STGGC STCGG AAGGG	A 439 112 512 133 A 582 A 652 C 722 C 792
GAG GAG E GTGC GACG CAGA AAGG CATT	GAA GAA E GTG GCA TAC ACC	CTGC L GAAC E TAG GAC CAG TTT .GTT	CGAT R GTTG V CGC GCC GAG TTT AAA	TGTTC L L CCGA A E AGCA ATTG GTTG GTCG ATATG	GAAJ GGAJ E TGT TCA CGT AGC CCG	AAGG R AGAT D ATC GAC GGI ACA AAC	AGG R AAG K CGAT CGAT ATAC	AGAI R GGGG CGA CGAT CGAT CGAT	AGA R CAC H G C C C C C C C C C	CGCC R TGT C C ACAG CACG GTGT ACCA	GCGA GTTG V GCAC TTGC GTGC GTGC	ITCA I C CTCC A F GAA C GAA C GCA C	AGAA GGCTC L TTGGA GAAAA AGAGC GTGCC	AGAG E CTTI F ACGI ATGI GAGG	AGC S GTT V GT GT GC GC GC SCG	CAAG <u>K</u> (CGTC V CGT TGG CTC GGT ACA	GAG <u>E</u> TCA S CTG TGT CTGC CTGC CGAC	TCTO S GCG A TATO AATO ATA2 ACGO GTAO	ECAP A TG2 C CC C CC C CC C CC C CC C CC C CC C	ACCG T. AGGA CTTC CTCC ATGA ACTI GTTC	CGGA A <u>E</u> ATTTA STGGC GTCGC AAGGC TGAT GATGA	A 439 112 512 133 A 582 A 652 C 722 C 792 G 862

Figure 12 : Séquence nucléotidique du gène codant pour l'antigène P21 La séquence déduite des inserts ADNc et génomiques contient un cadre de lecture ouvert codant pour 133 acides aminés. Les codons stop encadrant le cadre de lecture sont doublement soulignés. La séquence protéique déduite permet de retrouver 5 séquences peptidiques (soulignées) obtenues par le microséquençage d'une fraction HPLC enrichie en antigène P21. La flèche verticale indique le site de clivage potentiel du peptide signal. La seconde région hydrophobe est encadrée. La flèche horizontale indique le site majeur d'initiation de la transcription, les deux pointes de flèche montrant l'extrémité 5' des deux principaux inserts ADNc étudiés (1 et 22). Le site de polyadénylation, extrémité 3' de tous les inserts ADNc, est marqué d'une étoile. Les séquences polyT et riches en G et C sont soulignées respectivement dans la région 5' non traduite du messager et dans la région potentiellement promotrice située en amont du départ de la transcription.



# Figure 13 : Détection du messager codant pour l'antigène P21 en Northern blot

L'hybridation de l'insert ADNc 1 marqué par le <sup>32</sup>P sur 10 µg d'ARN total de tachyzoïtes permet la détection d'un messager unique d'environ 850 bases.



### Figure 14 : Carte de restriction du gène codant pour l'antigène P21

Le fragment génomique EcoRI (au milieu) inclut toute la région transcrite (en bas). La trait large indique le cadre de lecture ouvert. Le séquençage de l'insert génomique (en haut) a été effectué par délétion du clone génomique (mutants génomiques) et par des oligonucléotides internes. Les extrémités 5' des inserts ADNc 1 et 22, ainsi que les sondes nucléiques 5' et 3' sont indiqués. Les oligonucléotides 21-16 (le plus 5') et 21-18 utilisés pour déterminer le départ de la transcription sont marqués par des étoiles.

(B : BamHI ; EI : EcoRI ; EV : EcoRV ; P : PstI ; Pv : Pvul : X : Xbal).

Trois clones génomiques et de très nombreux clones d'ADNc ont été obtenus. Ces derniers ont été sélectionnés selon la taille de leur partie 5' par digestion EcoRI-PstI.

Les clones possédant les plus grands fragments se sont révélés être orientés dans le sens 3'-5', la séquence présente en aval du site EcoRI étant identique à la partie 3' non codante du clone 1. Afin d'éliminer les clones artéfactuels, de nouveaux clones ont donc été sélectionnés, cette fois par une double digestion EcoRI-PstI et XhoI-PstI.

Parmi les clones présentant la bonne orientation 5'-3', le clone 22 posséde la partie 5' la plus longue (figure 14) et sa taille totale (810 pb) est voisine de celle du messager (environ 850 b) détecté en Northern blot (figure 13). Cet insert a donc été sous-cloné dans les dérivés du phage M13 et entièrement séquencé. La séquence obtenue est identique dans sa partie 3' à celle du clone 1. Les 300 pb supplémentaires en 5' permettent de prolonger le cadre de lecture jusqu'à un codon ATG. Ce codon se situe dans un contexte favorable d'initiation (A<sup>-3</sup> et G<sup>+4</sup>), selon les critères établis chez les Eucaryotes supérieurs (Kozak 1989) et chez le Toxoplasme (Ossorio, Schwartzman et al. 1992). La séquence peptidique, terminée par les résidus G-A-R est retrouvée dans la région N-terminale du polypeptide de 133 acides aminés codés par le clone 22. Le codon ATG est précédé d'une région 5' non traduite de 92 pb contenant des séquences polyT, ce qui est retrouvé dans plusieurs gènes du Toxoplasme codant pour des antigènes de surface, des granules denses ou des rhoptries (Burg, Perelman et al. 1988; Nagel and Boothroyd. 1988; Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Ossorio, Schwartzman et al. 1992; Mercier, Lecordier et al. 1993).

# 2-Insert génomique

La carte de restriction des clones génomiques isolés par hybridation avec la partie 5' du clone 1 a permis de vérifier qu'ils possédaient tous la région codante entière : l'ADN des clones phagiques a été digéré par diverses enzymes, en particulier par l'enzyme Pstl pour laquelle deux sites très proches sont présents dans les inserts d'ADNc. La cartographie a été réalisée en Southern blot. Les sondes utilisées (figure 14) sont les fragments 5' et 3' de l'insert 1 (EcoRI-Pstl et Pstl-Xhol) marqués par la Digoxigénine. Cette étude a permis de mettre en évidence un fragment HindIII de 4,5 kb d'une part, et d'autre part un fragment EcoRI de 3 kb inclus dans le premier, et contenant au moins toute la séquence de l'insert ADNc 1.

Ce résultat a été confirmé sur un Southern blot d'ADN génomique de tachyzoïtes digéré par différentes enzymes (figure 15). Les mêmes sondes, marquées cette fois par le <sup>32</sup>P, se sont hybridées à des fragments de taille identique à ceux des clones génomiques. Un seul profil d'hybridation est observé, suggérant la présence d'un gène unique.

65

Le fragment EcoRI de 3 kb a donc été sous-cloné dans un premier temps dans le vecteur pUC 18. Une carte de restriction plus précise a été établie en comparaison avec celle des clones ADNc. Cette carte a montré d'une part que la séquence codant pour l'antigène P21 était située au milieu de l'insert. D'autre part, la similitude des profils de restriction obtenus pour l'ADNc et l'insert génomique semble indiquer que ce gène est probablement dépourvu d'introns.

Dans un second temps, cet insert génomique a été sous-cloné dans le phage M13 mp19 afin de permettre son séquençage. Etant donné la taille de ce fragment, le séquençage de proche en proche par oligonucléotides internes s'avérait très lourd. Une technique de délétion progressive de l'insert a donc été utilisée, permettant, par recouvrement d'une dizaine de clones plus ou moins délétés (figure 16), de séquencer entièrement l'insert à l'aide d'une seule amorce s'hybridant au vecteur (figure 14).

La séquence obtenue à partir des clones d'ADNc ainsi que l'absence d'intron ont été confirmées. De plus, la situation de la région transcrite dans l'insert génomique nous a permis d'avoir accès à la séquence potentiellement promotrice située en amont (figure 12). Cette région est particulièrement riche en GC en comparaison de la région 5' non traduite de l'ARNm.

#### 3-Détermination du départ de la transcription

Afin de déterminer précisément le site de départ de la transcription, une expérience d'extension d'amorce a été réalisée sur l'ARNm. Deux oligonucléotides proches de l'extrémité 5' de l'insert 22 et distants de 30 pb (figure 14) ont été utilisés après marquage au <sup>32</sup>P pour "remonter" vers l'extrémité 5' de l'ARN par une réaction de transcription réverse. Ces mêmes amorces ont été employées pour séquencer la région génomique correspondante. La migration sur un même gel de polyacrylamide des deux types de produits de réaction (fragments obtenus par transcription réverse de l'ARN et réaction de séquence) (figure 17) a permis de montrer que la réaction de polymérisation s'arrêtait au même endroit pour les deux oligonucléotides. En effet, l'arrêt de la transcription réverse a été établie pour l'oligonucléotide 21-18 (piste b), à 11 pb en amont du clone ADNc 22 grâce à la réaction de séquence migrant en parallèle (piste c).



# <u>Figure 15</u> : Carte de restriction génomique du gène codant pour l'antigène P21

L'ADN génomique de tachyzoïtes digéré par différentes enzymes de restriction est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose. L'hybridation en Southern blot avec les fragments 3' (**A**) et 5' (**B**) de l'insert ADNc 1 (voir figure 14) révèle la présence de deux fragments contenant toute la partie codante. Les fragments EcoRI de 3,2kpb (pistes 1) et HindIII de 4,5kpb (pistes 2) encadrant le premier s'hybrident en effet avec les deux sondes (flèches). Pistes 1 : EcoRI ; Pistes 2 : HindIII ; Pistes 3 : Pstl ; Piste 4 : Pvul ; Piste 5 : EcoRI-Pstl ; Piste 6 : EcoRI-HindIII ; Piste 7 : HindIII-Pstl.



Figure 16 : Exemple d'analyse des mutants génomiques délétés (cyclone) L'ADN des mutants génomiques délétés est analysé par électrophorèse en gel d'agarose 0,7%.

Vecteur M13mp19 natif : n ; Insert génomique EcoRI non délété dans M13mp19 : étoile. Autres pistes : mutants plus ou moins délétés.



# Figure 17 : Détermination du départ de la transcription

Les oligonucléotides 21-16 (piste a) et 21-18 (piste b) ont servi d'amorce à une réaction de transcription réverse sur l'ARN de tachyzoïtes. Une réaction de séquençage est effectuée avec l'oligonucléotide 21-18 sur le clone génomique (piste c). Les fragments synthétisés lors de la transcription reverse et la réaction de séquence sont analysés sur gel de polyacrylamide 8%. Les bases correspondant aux arrêts de la transcription réverse (flèches) sont déterminées grâce à la séquence effectuée avec l'oligonucléotide 21-18 (pistes b et c). La transcription réverse effectuée avec les deux oligonucléotides s'arrête aux mêmes endroits : les deux fragments ont 30 bases de différence, correspondant à la distance séparant les deux amorces.

L'arrêt de la transcription réverse réalisée avec l'amorce 21-16 a pu être positionné au même endroit que pour l'oligonucléotide 21-18 puisqu'il est possible de compter les 30 bases séparant les deux fragments, c'est-à-dire exactement la distance séparant les deux oligonucléotides. Le clone ADNc 22 est donc presque complet à 11 pb près.

### 4-Vérification de l'absence d'intron

L'absence d'intron a été confirmée par une expérience de digestion par la Nucléase S1. L'insert génomique simple brin est mis en présence des ARN totaux de tachyzoïtes dans des conditions favorisant l'hybridation. L'action de la Nucléase S1 est de digérer les parties de l'ADN génomique qui ne se sont pas hybridées au messager et formant des boucles simple brin, et donc correspondant aux introns. Le produit de cette digestion est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose puis transféré par Southern blot. L'hybridation avec l'insert 22 marqué par le <sup>32</sup>P a révélé une bande unique de 800 pb environ (figure 18), correspondant à la taille de la région transcrite. Aucune boucle d'ADN simple brin ne s'est donc formée lors de l'hybridation entre le gène et l'ARNm.





# Figure 18 : Cartographie du gène codant pour l'antigène P21 par la nucléase S1

L'ARN de tachyzoïtes est mis en présence de l'insert génomique simple brin. Après hybridation et digestion par la nucléase S1 (élimination de l'ADN simple brin non aparié à l'ARN), l'ADN non digéré est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose puis transféré. Le blot est hybridé avec l'insert ADNc 22 marqué par le <sup>32</sup>P.

Piste a : ARN total et insert génomique ; Piste b : témoin sans ARN de tachyzoïtes.

# III - Clonage du gène codant pour l'antigène de 32 kDa

L'hypothèse d'une réactivité croisée entre les antigènes P21 et P32 formulée au vu des résultats de la sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes (figure 9) a été confirmée par la production de sérums anti-protéines recombinantes (figure 11). Ces sérums reconnaissent une famille de protéines dans un extrait total de tachyzoïtes. Ceci nous a amené à définir la séquence de l'antigène P32 pour identifier les structures responsables de cette réactivité croisée.

# A-Inserts d'ADNc

La famille représentée par le clone 13 et codant pour l'antigène P32 contient 6 clones. Le séquençage partiel des inserts 13 et 15 (figure 19) de cette famille a permis de déduire un cadre de lecture ouvert en phase avec celui de la  $\beta$ -galactosidase et codant pour 115 acides aminés (figure 20). Il a également révélé la présence d'un site Xhol interne proche de l'extrémité 5'. Le séquençage de 450 pb à partir de l'extrémité 3' a montré la présence de la queue polyA et, en amont, des codons stop dans les trois phases de lecture. Le séquençage d'une région d'environ 500 pb située au milieu de l'insert et contenant la fin de la partie codante ainsi que le codon stop n'a pas été poursuivi sur ce clone mais sur un inset génomique (figure 19).

Le séquençage de la partie 5' de l'ADNc située en amont du clone 13 a été obtenue en sous-clonant dans le phage M13 le fragment 5' (EcoRI-Xhol) de l'insert le plus long (insert 43, 1600 pb, figure 19). La séquence permet de compléter la partie codante jusqu'à deux codons ATG distants de 83 pb (figure 20).

Les séquences de type polyT observées en amont du codon ATG situé le plus en 5' indiquent que cet insert de 1600 pb contient vraisemblablement la région 5' non traduite. L'hybridation en Northern blot de l'ARNm de tachyzoïtes avec l'insert 43 marqué au <sup>32</sup>P a permis de mettre en évidence un messager unique d'environ 1600 bases (figure 21), ce qui permet de penser que l'insert ADNc 43 correspond à une copie presque complète.




۰.

L'insert génomique Pstl (en haut) contient la totalité de la région transcrite (en bas). Le cadre de lecture est représenté par un trait large. Les extrémités 5' des inserts ADNc séquencés (43, 13 et 15) sont indiqués par une flèche sur la séquence transcrite. La stratégie de séquençage par délétion du clone génomique (familles de mutants 2 et 15), par des oligonucléotides internes (1, 4 et 5), ou grâce à des amorces s'hybridant au vecteur (pour les extrémités 5' et 3' des ADNc) est représentée de part et d'autre des cartes de restriction.

B : Bgll ; Hit : Hindll ; Hitt : Hindlll ; P : Pstl ; S : Sall ; Sc : Sacl ; X : Xhol : Xb : Xbal

GAATACGTCG GACTGGTCTA GGTGAACGTG STGCGACGAG CTGATCACCA CCGGAGGGGG TTGGCTTTCG 70 TEGETGAGGA TEETTETEAT ETTETTECAE CEGETEEGAE GEGEAGEAGE AACEGECEGAE ETETAEGAAA 140 CACGAGTETE GEGEGETETEA TGEAAATGEE CACTGGETGA CTETT<u>CEEE</u>A TTAGTAGAAT ATTTGEGTEG 210 TEGAATGETG AEGGEAAACA AAACGAAGTG ETATCAGEGT <u>GTTTT</u>GETGT GEATTGEAGG E<u>TGTTTATT</u> 280 TAGACATTTT GGCCGCAAAA GATTTGTGTT TCCGAGCAGG TGACCTGGGT CGCTTTTTG AAACAGCAGG 350 AAAACAGCTT CGTGGTGCCA CGTAGCGTGC TTGTTGGCGA CTACCTTTT TTCTTGGGAG TGTCGGCGAA 420 ATGCACACGGTGGCATCCATCTGAGGCAGAAGCGTAACTTCTGTCCTGTAACTGTCTCCACAGTTGCTGTGGTC 495 MAHGGIHLRQKRNFCPVTVSTVAVV25 TTTGTAGTCTTCATCGGTGTACTCGTCAATTCGTTGGGTGGAGTCCGTGTCGCAGCAGACAGCGGTGGTGTTAAG 570 FVVFMGVLVNSLGGVRVAADSGGVK50 CAGACCCCTTCGGAAACCGGTTCGAGCGGTGGACAGCAAGAAGCAGTGGGGACCACTGAAGACTATGTCAACTCT 845 Q T P S E T G S S G G Q Q E A V G T T E D Y V N S 75 TCGGCGATGGCCGATGGCCAAGGCGACTCGTTAGCTGAAGATGATACAACCTCCGAAGCGGCGAGGGCGACGTT 720 SAMGGGQGDSLAEDDTTSEAAEGDV,100 GACCCTTTTCCCGTGCTGGCGAATGAGGGGAAGTCGGAGGCGCGTGGCCCGTCGCTCGAGGAAAGAATCGAAGAA 795 D P F P V L A N E G K S E A R G P S L E E R I E E 125 CAGGGCACAAGACGACGTTACTCCTCTGTTCAAGAACCACAAGCGAAGGTGCCATGCAAACGAACACAGAAAACGC 870 Q G T R R Y S S V Q E P Q A K V P C K R T Q K R 150 CACAGACTCATTGGTGCTGTGGTGTTGGCAGTATCTGTGGCAATGCTTACCGCTTTCTTCTTCGAAGGACTGGA 945 HRLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTG175 CGACGCTCTCCCCAAGAACCATCTGGGGATGGTGGTGGAAATGATGCAGGCAATAATGCTGGGAACGGTGGGAAT 1020 R R S P Q E P S G D G G <mark>G N D A G N N A G N G G N 200</mark> GAAGGCAGAGGTTACGGAGGCAGAGGTGAAGGAGGAGCCGAGGATGACAGGCGCCCGTTGCACCCGGAACGTGTG 1095 E,GRGYGGRGEGGAEDDRRPLHPERV225 AATGTGTTTGATTAT TAAAGATGAA AACAGGGGGT CTATGCGCCA CTGGGGCACT CTATGTCTTG 1160 NVFDY230 TAGTCGATGC CATGCAACGA CCGGGAGAGAC GGCACTGTCC GACGTGGAGA AGAACGTAGG AATCTGTACG1230 AACTGCGCTC CTTCCAGACT TGGGACGTGG ACAGGTCGAC ATGTGTGGAC GGGTCGCGAT GAATGGTTTG 1300 CGTCTTTTAC ACCTGAGGTA GTGTACGTCG GCGATCGCAG GGCTGTAACG CTCAGGAGAA TCTTCCAAAG1370 AACGGTGAAG CCGAATCTGT CGAGTTACCA TCTGGCAGTT GTGACGTGGT ACTACCGGAC TGAAATAAAA1440 AGCAAAGTTT TCGTGAAAGT CTGTGGCAGC GATTCCAGTG AAAAGTCGAA GAGATGAAAC ATAAGTAGGA 1510

AGTGTGAAGC GAAAAGAGTC GCACACACGA GAACGAATGA GTGTAAAACA GGGGCCGGAT CATACACCGA 1650 OCCGTCGATG AGGCAGAGCC GCTGCGCCGA AGCTGCCGCG ATTTGTCATA AAGTTTTCAC GTGTTTTGTG 1720 TTTTGCGTCG TGTGTATGCC GTGTCGCGAT TTCGTCTTC AAAACTCCAC ACAAGCGCGA AAAATTATGG 1790 AAACGTATCA TGCGTGGGCT GAATACGATG TTGAAGAATT GCACGTGCAC ATGCCAGCGA AACTAGCAGG 1860

ATACGATAAT GCCTCCGACA CCGCCGGCAT CACCTGCAAG CGTGACGTTT CAGTCGTGGA AGATGCTTTA 1580

Figure 20 : Séquence nucléotidique du gène codant pour l'antigène P32

La séquence nucléotidique déduite des inserts ADNc et génomique contient un cadre de lecture ouvert codant potentiellement pour 230 acides aminés. Les codons stop sont soulignés d'un trait double. Les deux codons ATG potentiellement initiateurs sont encadrés. Les têtes de flèches indiquent l'extrémité 5' des deux principaux inserts ADNc étudiés (43 et 13). Le site de polyadénylation est représenté par une étoile. Les deux régions hydrophobes sont encadrées. Un site potentiel de N-glycosylation est marqué d'une étoile (résidu n°74). L'insert 13 et le peptide 74-100 (souligné) ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pGEX. Le peptide de synthèse 188-201 est également souligné dans la séquence protéique.

Les séquences polyT de la région 5' non traduite du messager et les régions riches en G et C de la région potentiellement promotrice sont soulignés.

.

Contrairement à l'antigène P21 pour lequel seuls des clones incomplets ont été obtenus en criblage par expression, un clone d'ADNc complet codant pour l'antigène de 32 kDa a été isolé sans avoir recours à un second criblage en hybridation. Cependant, un codon stop est présent 45 pb en amont du codon ATG, empêchant la production de la protéine de fusion avec la β-galactosidase. L'obtention de ce clone en expression en système bactérien pourrait être le fait d'une initiation interne de la traduction au niveau de l'ATG situé dans la région 5'.

### **B-Inserts** génomiques

De la même façon que pour le gène codant pour l'antigène P21, la banque génomique a été criblée à l'aide de l'insert ADNc le plus long (43, 1600 b, figure 19) marqué par la Digoxigénine, en vue de l'isolement du gène codant pour l'antigène de 32 kDa. Trois clones ont ainsi été isolés.

La carte de restriction de ces clones nous a permis de sous-cloner en pUC 18 un fragment PstI de 3,2 kb (figure 19) contenant toute la région transcrite. A nouveau, la carte de restriction effectuée sur cet insert, en particulier par l'enzyme HindII, a indiqué l'absence probable d'intron.

L'ADN génomique de tachyzoïtes a été digéré par différentes enzymes et hybridé en Southern blot avec l'insert 43 marqué par la Digoxigénine. Après révélation par chimioluminescence, des fragments identiques à ceux présents dans les clones génomiques ont été détectés (figure 22), en particulier le fragment Pstl de 3,2 kb (piste d).

L'insert génomique Pstl-Pstl de 3,2 kb a été sequencé après sous-clonage dans les deux orientations dans le dérivé mp19 du phage M13. La délétion progressive de l'insert a de nouveau été employée, cette fois dans les deux orientations de façon à assurer un nombre minimum d'ambiguités dans les régions transcrites non encore séquencées (figure 19). Les résultats ont permis de confirmer les séquences des ADNc, mais également de compléter les 500 pb centrales encadrant le codon stop. Le cadre de lecture ouvert de ce gène, entre le codon ATG le plus 5' et le codon stop code donc potentiellement pour 230 acides aminés (figure 20).

a b c d e



Figure 21 : Détection du messager codant pour l'antigène P32

L'hybridation de l'ARN total de tachyzoïtes avec l'insert ADNc 43 marqué par le <sup>32</sup>P permet la détection d'un messager unique d'environ 1600 bases, c'est à dire de même taille que l'insert ADNc 43.

# Figure 22 : Détection du gène codant pour l'antigène P32

Le fragment Pstl détecté dans les clones génomiques contenant la région codant pour l'antigène P32 est retrouvé dans l'ADN génomique de tachyzoïtes digéré par Pstl d'environ 3kpb (piste d) et hybridé avec l'insert 43 marqué par la Digoxigénine. Piste a : HindIII ; Piste b : HindIII-Sall ; Piste c : Sall ; Piste d : Pstl ; Piste e : Pvull. De façon similaire au gène codant pour l'antigène P21, une région riche en G et C est retrouvée en amont de la région riche en T caractéristique du 5' non traduit du messager (figure 20). Bien que l'expérience d'extension d'amorce n'ait pas été réalisée pour positionner exactement le départ de la transcription, ces éléments indiquent que le clone 43 est complet à quelques paires de bases près.

# IV - Structure moléculaire des deux antigènes de 21 et 32 kDa

A-Structure primaire et profil d'hydrophobicité (Kyte and Doolittle 1982)

## 1-L'antigène P21

L'antigène P21, défini par l'anticorps monoclonal TG17-113, est présent dans les granules denses du Toxoplasme et dans la vacuole parasitophore (Charif, Torpier et al. 1990). La présence d'une région N-terminale hydrophobe présentant toutes les caractéristiques d'un peptide signal (figures 12 et 23A) indique que cette protéine rentre dans le réticulum endoplasmique pour être exportée. Le site de clivage le plus probable (Von Heijne 1986) se situe entre les acides aminés 25 et 26, le peptide mature serait dès lors composé de 108 acides aminés.

L'analyse de ce peptide révèle une seconde région hydrophobe au milieu de la molécule dont la taille (18 acides aminés) et l'environnement (5 Arg en position C-terminale) sont compatibles avec une région transmembranaire (Rao and Argos 1986). La région hydrophile N-terminale de 50 acides aminés est riche en acides aminés acides (34%) et en Glycine (16%). La région C-terminale de 40 acides aminés est riche en acides aminés acides (22%) et en résidus basiques (20%). Une seule Cystéine est présente, dans la région C-terminale (position 124). Le point isoélectrique du peptide mature est de 5,9.

#### 2-L'antigène de 32 kDa

La séquence codant pour l'antigène de 32 kDa possède deux codons ATG distants de 30 acides aminés. Le codon le plus 5' est cependant dans un contexte plus favorable d'initiation, puisqu'il est encadré de  $G^{-3}$  et  $G^{+4}$  (figure 20) (Kozak 1989). De plus, seul ce premier résidu Methionine est suivi d'une séquence pouvant répondre aux critères de taille d'un peptide signal (Von Heijne 1986).

Une seconde région hydrophobe de 19 acides aminés et bordée de résidus basiques est située entre les acides aminés 153 et 171 (figures 20 et 23B), ce qui suggére une région transmembranaire (Rao and Argos 1986).

Le résidu Asparagine 74 est un site potentiel de N-glycosylation.

La région C-terminale de 59 acides aminés est riche en Glycine (27%) et en résidus acides (29%).





<u>Figure 23</u> : Profil d'hydrophobicité des antigènes P21 et P32 Les séquences protéiques déduites des inserts clonés sont représentées en fonction de leur hydrophobicité (A : antigène P21 ; B : antigène P32). Chaque molécule contient deux séquences hydrophobes (hachures).

La coupure prédictive du peptide signal de l'antigène P21 est représentée par une flèche.

## B-Représentation des molécules en 2 dimensions ("HCA plot")

La mise au point d'un système de représentation en 2 dimensions sous forme théorique d'hélice  $\alpha$  permet l'étude des "clusters" hydrophobes, mais également le rapprochement d'acides aminés éloignés en séquence primaire (Gaboriaud, Bissery et al. 1987; Lemesle-Varloot, Henrissat et al. 1990). Cette représentation des deux antigènes nous a permis d'observer la présence de 7 motifs semblables ou similaires dans les deux molécules (figure 24). Ces motifs, constitués de 4 à 6 acides aminés éloignés les uns des autres en séquence primaire (figure 25), sont situés dans les domaines hydrophiles des molécules et pourraient être à l'origine des réactivités croisées observées.

De nombreux doublets d'acides aminés sont observés, en particulier dans la séquence de l'antigène P32 (figure 25).

## C-Obtention d'antisérums spécifiques de l'antigène de 32 kDa

Afin d'obtenir une sonde anticorps monospécifique contre l'antigène de 32 kDa, deux régions hydrophiles ne comportant apparemment pas de motifs communs complet avec l'antigène P21 ont été choisies de part et d'autre de la seconde zone hydrophobe (figures 24 et 20) :

-La région N-terminale 74-100 a été sous clonée dans le vecteur d'expression pGEX 3X (fragment HindII obtenu à partir de l'insert ADNc 13 : fragment 13HII) et produite sous forme recombinante chez *E. coli*.

-Un peptide de synthèse a été choisi dans la région C-terminale (88-101), le sous clonage de ce fragment s'avérant difficile. Ce peptide a été couplé à l'ovalbumine.

Les sérums de souris dirigés contre ces deux fragments ont été dans un premier temps analysés sur un Western blot d'extrait de tachyzoïtes et en immunofluorescence sur parasites fixés. Le sérum anti-13HII révèle sur un Western blot une simple bande à 32 kDa, alors que le sérum anti-peptide ne détecte aucun antigène. Par contre, les deux sérums sont positifs en immunofluorescence. La comparaison de la fluorescence obtenue avec différents anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène de surface (SAG1), des rhoptries (ROP1) ou des granules denses (GRA5), indique que ces sérums reconnaissent un antigène cytoplasmique. Figure 24 : Représentation des deux antigènes en deux dimensions : détermination des motifs communs

La séquence des antigènes P21 (A) et P32 (B) est représentée sous forme d'hélice  $\alpha$ . Les domaines hydrophobes sont indiqués par des doubles flèches au-dessus de chaque séquence et les acides aminés correspondants sont entourés d'un trait double. Les régions potentiellement  $\alpha$ -hélicoïdales sont indiquées par des doubles flèches en pointillés. Les motifs d'acides aminés communs aux deux antigènes sont indiqués chacun d'une couleur différente. Les deux régions hydrophiles entourées d'un trait simple correspondent au fragment exprimé sous forme recombinante (R) et au peptide de synthèse (P).

Les acides aminés sont représentés selon leur code à une lettre. Les acides aminés particuliers sont indiqués par les symboles suivants : Thr : □ ; Ser : □ ; Gly : ◆ ; Pro : ◆ ; Cys : € .





Figure 25 : Séquence primaire des deux antigènes

Les acides aminés composant les motifs communs aux deux antigènes (A : P21 ; B : P32) sont encadrés et marqués des mêmes couleurs que dans la figure 24. Les résidus appartenant à plusieurs motifs sont simplement encadrés. De nombreux doublets ou triplets d'acides aminés sont soulignés d'un trait large.

A MASVKR<u>VVV</u>AVMIVNVLALIFVGVAGSTRDV<mark>GSGGDDSEGARGREQQQ</mark>VQ QHEQNEDR**SLFER**GR<u>AA</u>VTGH**P**VR**T**AV**G**LAAAVVAVVSLLRLLKRRRRA IQEESKESATAEEEEVAEEDKGHCVARLFVVSA

B MAHGGIHLRQKRNFCPVTVSTVAVVFVVFMGVLVNSLGGVRVAADSGGVK QTPSETGSSGGQQEAVGTTEDYVNSSAMGGGQGDSLAEDDTTSEAAEGDV DPFPVLANEGKSEARGPSLEERIEEQGTRRRYSSVQEPQAKVPCKRTQKR HRLIGAVVLAVSVAMLTAFFLRRTGRRSPQEPSGDGGCNDAGNNAGNGGN EGRGYGGRGEGGAEDDRRPLHPERVNVFDY

# D-Localisation de l'antigène P32

La localisation de l'antigène P32 a été réalisée à l'échelle optique sur coupes à la paraffine. Deux types d'échantillons ont été utilisés : des tachyzoïtes de la souche RH provenant de la cavité péritonéale de souris infestées, et des bradyzoïtes de la souche 76K enkystés dans le cerveau de souris. Le même marquage est observé pour les deux immunsérums, anti-fragment recombinant et anti-peptide. Ce marquage est présent sous forme de ponctuations à l'intérieur des parasites des deux stades (figure 26), rappelant les images obtenues avec les anticorps monoclonaux dirigés contre les antigènes de granules denses tels que GRA5 (A). Il est de plus possible d'observer, au niveau de certains kystes intracérébraux, un faible marquage de la paroi du kyste (figure 26, B et D).



Figure 26 : Localisation de GRA5 et de l'antigène P32 aux stades tachyzoïte et bradyzoïte par immunofluorescence.

GRA5 est détecté, dans les kystes intracérébraux, au niveau des granul de la paroi du kyste (A).

L'antigène P32 est détecté par le sérum anti-peptide (B) et le destruction tetragment recombinant (C, D, E). Dans les kystes intracérébraux, il est producte distinguer les granulations à l'intérieur de la majorité des parasites (B, C de majorité de ces kystes est faiblement marquée au niveau de la paroi (B, D). Le tachyzoïtes de la souche RH dans une vacuole parasitophore présentent également un marquage sous forme de ponctuations (E) (A à E : x1000).



# DISCUSSION

Toxoplasma gondii est un protozoaire parasite intracellulaire obligatoire, capable à la fois d'induire chez l'homme une réponse immune spécifique efficace et d'échapper à ces mécanismes en se divisant dans une vacuole parasitophore ou un kyste. La réponse immune développée lors de la toxoplasmose est efficace contre les réinfestations et les réactivations de toxoplasmose chronique. Cela suppose que les antigènes qui entretiennent cette réponse durant toute la vie de l'hôte soient exprimés aux deux stades parasitaires rencontrés chez l'hôte intermédiaire (Capron and Dessaint 1988).

Les antigènes d'excrétion-sécrétion (AES) sont d'excellents immunogènes, chez l'homme comme dans les modèles animaux. Un procédé de sécrétion des AES en milieu acellulaire a été mis au point dans notre laboratoire (Darcy, Deslée et al. 1988). Cette sécrétion nécessite la présence de sérum, ce qui explique la grande quantité d'AES retrouvée lors de l'infection parmi les antigènes circulants (Hughes and Van Knapen 1982). L'obtention d'AES a permis de démontrer leur pouvoir protecteur à la fois chez le rat nude, hautement susceptible à l'infection (Darcy, Deslée et al. 1988; Duquesne, Auriault et al. 1990), et chez la souris infestée par une dose létale de kystes (Darcy, Torpier et al. 1992).

L'immunisation par les AES a également permis de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre plusieurs antigènes de sécrétion (Charif, Darcy et al. 1990). Or il apparait que tous ces anticorps détectent des molécules stockées dans les granules denses du Toxoplasme et ce, quel que soit le stade, tachyzoïte ou bradyzoïte.

Les molécules des granules denses sont également observées dans la vacuole parasitophore ou le kyste et semblent donc sécrétées par les parasites lors de l'invasion (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Charif, Darcy et al. 1990; Torpier, Charif et al. 1993). Cette localisation, au niveau de la surface d'échange entre le Toxoplasme et sa cellule-hôte, suggère une participation fondamentale de ces molécules dans les mécanismes d'échappement et dans le maintien de la relation hôte-parasite.

L'utilisation des sondes monoclonales dirigées contre trois de ces molécules, GRA1 (P24), GRA2 (P28) et GRA5 (P21) a permis d'observer un ciblage commun de ces antigènes dans les granules de sécrétion. Par contre, une localisation spécifique a pu être démontrée pour chacun d'entre eux après sécrétion dans la vacuole parasitophore ou le kyste. GRA1, qui possède deux structures capables de lier le Calcium, est observée dans l'espace vacuolaire (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989). GRA2 est associée spécifiquement aux microvillosités du réseau membranaire entourant les parasites (Charif, Darcy et al. 1990; Torpier, Charif et al. 1993). Sa structure moléculaire suggère une association possible aux lipides (Mercier, Lecordier et al. 1993). GRA5 est très peu abondante dans le réseau membranaire sousjacent mais au contraire associée spécifiquement à la membrane de la vacuole ou à la paroi du kyste (figure 3) (Torpier, Charif et al. 1993).

Au cours de ce travail, nous avons entrepris la caractérisation moléculaire de GRA5, qui appartient à cette catégorie particulière de molécule contenues dans les granules denses du Toxoplasme et associées à la membrane de la vacuole parasitophore, au contact du cytoplasme de la cellule-hôte.

La stratégie de purification de GRA5 mise en oeuvre en collaboration avec l'équipe du Pr. Tartar a permis

- d'obtenir par microséquençage de la protéine purifiée cinq séquences peptidiques de GRA5 présentes dans les régions hydrophiles de la molécule ;

- d'évaluer les potentialités protectrices de cet antigène dans un modèle murin d'infestation létale et dans un modèle de toxoplasmose congénitale chez le rat (L. Zenner, résultats non publiés) ;

 de produire un immunsérum de rat et un immunsérum de souris reconnaissant l'antigène GRA5.

Malgré l'homogénéité des fractions HPLC enrichies en antigène P21, ces sérums reconnaissent avec la même intensité GRA5 et deux autres antigènes de 32 et 28kDa, ce dernier semblant comigrer avec GRA2. Le sérum de rat a été utilisé dans le criblage d'une banque d'expression d'ADNc de tachyzoïtes et le sérum de souris dans la caractérisation des clones isolés, par sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes.

L'hypothèse d'une réactivité antigénique croisée entre ces deux protéines (GRA5 et P32) a été formulée sur la base de la polyspécificité à la fois des sérums dirigés contre la fraction HPLC enrichie en antigène P21 natif, et des anticorps sélectionnés sur les protéines recombinantes codées par les inserts d'ADNc 1 (GRA5) et 13 (P32). En effet, les anticorps sélectionnés sur chacune des protéines recombinantes révèlent deux bandes à 21 et 32 kDa. Le séquençage nucléotidique de l'insert ADNc 1 a permis d'identifier le gène *GRA5* avec certitude : la séquence en acides aminés déduite contient en effet les cinq peptides majeurs obtenus par microséquençage de GRA5 natif purifié.

La réactivité antigénique croisée entre GRA5 et la protéine de 32 kDa a été confirmée par la production de sérums anti-GRA5 et anti-P32 recombinantes. Cette réactivité croisée semble de plus s'étendre à d'autres molécules, en particulier à un doublet migrant à environ 28 kDa et à un antigène de 24 kDa.

L'alignement des séquences en acides aminés des antigène P32 et GRA5 ne révèle aucune homologie significative (24%). Par contre, la représentation de ces deux séquences sous forme théorique d'hélice  $\alpha$  (Hydrophobic Cluster Analysis) (Gaboriaud, Bissery et al. 1987; Lemesle-Varloot, Henrissat et al. 1990) permet d'observer 7 regroupements d'acides aminés communs et pouvant expliquer la réactivité croisée observée. Ces motifs sont constitués d'acides aminés éloignés les uns des autres en séquence primaire.

Afin d'obtenir un immunsérum monospécifique contre cet antigène de 32kDa, deux fragments issus de cette molécule et ne comportant pas de motif entier commun à la protéine GRA5 ont été choisis pour les immunisations. L'un des fragments a été obtenu par synthèse peptidique et le second, sous forme recombinante fusionnée, dans le vecteur d'expression pGEX (Smith and Johnson 1988).

Ces deux antisérums, utilisés en immunofluorescence, permettent de détecter un marquage d'aspect granulaire sur les tachyoïtes fixés ou en coupes. Les bradyzoïtes présentent le même marquage, et il est également possible d'observer un faible marquage au niveau de la paroi des kystes. La présence dans la séquence en acides aminés de cette molécule de deux régions hydrophobes possédant les caractéristiques d'un peptide signal et d'une région transmembranaire conforte ces résultats. Bien que la localisation subcellulaire exacte de cette molécule reste à confirmer au niveau ultrastructural, l'antigène de 32kDa semble donc être une molécule des granules denses non décrite jusqu'à présent, pour laquelle nous proposons donc l'appellation GRA6.

# Structure des gènes

La séquence du gène *GRA5* et de son environnement a été établie d'après le séquençage des inserts d'ADNc et génomique. Ce gène ne contient pas d'intron, comme le montrent d'une part le recouvrement exact des séquences d'ADNc et génomique et d'autre part, la cartographie par la nucléase S1. La détermination du départ de la transcription, par transcription réverse sur l'ARN de tachyzoïtes indique que ce gène est constitué de 861 pb. Le cadre de lecture ouvert code potentiellement pour 136 acides aminés. Le premier codon ATG rencontré dans ce cadre se trouve dans un contexte favorable d'initiation ( $A^{-3}$  et  $G^{+4}$ ) (Kozak 1989) et permet la traduction d'une protéine de 133 acides aminés.

Cette région codante est encadrée de deux régions non traduites, de 102 pb en 5' et de 319 pb en 3'. Ces deux régions, dans le gène *GRA5* comme dans la majorité des gènes connus (tableau 1), sont pauvres en GC en comparaison de la séquence codante :

-les régions 5' non traduites, en amont du codon ATG, contiennent moins de 50% de GC (excepté pour le gène *SAG3*) ;

-les régions codantes renferment au moins 53% de GC ;

-la séquence 3' non traduite, entre le codon stop et le site de polyadénylation, est constituée, pour tous les gènes sauf *SAG3*, de moins de 52% de GC.

Ces valeurs semblent donc significatives, puisque la composition moyenne en GC de l'ADN du Toxoplasme est de 50% (Johnson, Dubey et al. 1986). De plus, il parait possible d'utiliser ce calcul de la composition en GC pour caractériser les différentes régions d'un gène, par exemple lorsque les extrémités d'un cadre de lecture ne sont pas définies avec certitude.

Parmi les gènes des granules denses dont la séquence génomique est connue, seul le gène *GRA2* possède un intron. Le %GC de l'intron est voisin de celui des régions 5' et 3' non traduites, c'est-à-dire inférieur à 50%, alors que la séquence codante renferme 54,5% de GC. L' ARNm codant pour GRA2 est très abondant, et il est possible d'isoler des ADNc correspondant au pré-messager, polyadénylé mais possédant encore l'intron non épissé (C. Mercier, résultats non publiés). Le rôle de cet intron dans la régulation de ce gène reste à déterminer.

Gène	Amont du "cap site" (< 200pb)	5' non traduit	Séquence codante	Introns	3' non traduit	Références (Genbank)
GRA1	56%	42%	52,6%		49%	(Cesbron-Delauw, 1989) (M26007)
GRA2	55%	41%	54,5%	48%	48%	(Mercier, 1993) (L01753)
GRA4		44,5%	56%		47%	(Mevelec, 1992) (M76432)
GRA5	61,5%	35%	53,5%		51%	(Lecordier, 1993) (L06091)
GRA6	55%	1er ATG : 47% 2e ATG : 35%	64%		51%	(Lecordier, en préparation)
ROP1	60%	43%%	57%		51%	(Ossorio, 1992) (M71274)
SAG1	57%	1er ATG : 50% 2e ATG : 47%	53%		47,5%	(Burg, 1988) (A30527)
SAG2		48%	54,5%		49%	(Prince, 1990) (M33572)
SAG3		53%	57,5%		54%	(Cesbron-Delauw, en préparation)
TUB1	, 62%	44,5%	57%	54%	45,5%	(Nagel, 1988) (M20024)
TUB2			58%	52%	44%	(Nagel, 1988) (M20025)

## <u>Tableau</u> 1

Le pourcentage de GC a été calculé dans les différentes régions des gènes du Toxoplasme connus jusqu'à présent. Pour les gènes dont l'environnement 5' est séquencé, le calcul a été effectué sur 200 bases lorsque cela était possible. Les références ne sont pas systématiquement citées dans le texte.

(Programme "Basedis", DNAstar)

Deux autres gènes du Toxoplasme, codant pour l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -tubuline, contiennent chacun plusieurs introns. Les variations de composition en bases citées plus haut se confirment entre la séquence codante et les introns.

Le gène codant pour l'antigène P32 semble également ne pas contenir d'intron, bien que nous ne puissions pas l'affirmer avec certitude puisque l'ADNc n'a pas été entièrement séquencé. Deux régions seraient susceptibles de contenir un intron, d'une part celle située en amont de l'insert ADNc le plus long, et d'autre part celle encadrant le codon stop, région qui n'a été séquencée que dans l'insert génomique.

L'hypothèse d'un intron en amont de l'insert ADNc 43 est peu probable. En effet, plusieurs arguments indiquent que cet insert correspond à la totalité de la région transcrite :

- la taille du messager détecté en Northern blot est voisine de celle de l'insert (1600 pb) ;

- le cadre de lecture ouvert possède en 5' deux codons ATG, le codon le plus 5' se trouvant dans un contexte plus favorable d'initiation, c'est-à-dire encadré d'un G en -3 et en +4 (Kozak 1989; Ossorio, Schwartzman et al. 1992).

- le pourcentage de GC dans les séquences situées de part et d'autre de l'extrémité 5' de l'insert d'ADNc 43 se rapproche de ceux calculés pour les autres gènes du Toxoplasme (tableau 1) : la région 5' non traduite des messagers contient pour tous les gènes connus moins de 50% de GC alors que la région située en amont du départ de la transcription renferme au moins 55% de GC. Dans le gène codant pour GRA6, ces valeurs sont respectivement de 47 ou 35% selon le codon ATG considéré, et de 55% dans la séquence génomique située en amont de l'extrémité 5' de l'insert ADNc le plus long.

Nous ne pouvons pas exclure la présence d'un petit intron au niveau de la région non séquencée dans les inserts ADNc, en amont du codon stop. Cependant, cet intron devrait être de petite taille, puisqu'il n'est pas détecté en cartographie de restriction. De plus, cette région code pour un domaine de la protéine où sont retrouvés trois motifs d'acides aminés communs à GRA5. La présence d'un intron dans cette région semble donc peu probable. Néanmoins, le séquençage de cette région dans les inserts d'ADNc est actuellement en cours.

Dans les régions riches en GC ou riches en AT, ces bases ne sont pas réparties uniformément. Des "stretches" de plusieurs G et/ou C sont présents dans la région en amont du site de départ de la transcription, et plusieurs polyT sont observés dans la région 5' non traduite. Ces séquences sont caractéristiques et apparemment similaires, mais aucun motif consensus n'a pu être mis en évidence. Des régions riches en GC ont été définies comme la cible de "DNA-binding proteins" dans les régions promotrices de divers gènes. En particulier, le facteur SP1, découvert dans les cellules HeLa (Dynan and Tjian 1983) peut activer des gènes du virus SV40 (Dynan and Tjian 1983), du virus de l'herpès (Jones and Tjian 1985), du VIH (Jones, Kadonaga et al. 1986), ou d'eucaryotes supérieurs (Dynan, Saffer et al. 1985; Dynan, Sazer et al. 1986). Le motif consensus reconnu par SP1 est constitué de GGGCGG. Chez le Toxoplasme, de telles séquences pourraient par exemple être définies par des expériences de retard sur gel de ces régions potentiellement promotrices plus ou moins délétées en présence d'extraits nucléaires.

Les gènes *GRA1* et *SAG1* contiennent une séquence identique à la "CAAT box", respectivement à 70 et 50 pb en amont du "cap site". De telles séquences, conservées des levures à l'homme (Chodosh, Olesen et al. 1988), n'ont pas été observées dans les autres gènes du Toxoplasme dont l'environnement est connu. La présence de ces séquences est donc soit fortuite, soit remplacée dans les autres gènes par d'autres motifs ayant la même fonction. De tels motifs restent cependant à identifier. Aucun de ces gènes ne contient de séquence de type "TATA box", classiquement décrite pour la transcription des ARNm chez les eucaryotes supérieurs (Breathnach and Chambon 1981).

La région 5' non traduite de l'insert d'ADNc le plus long codant pour l'antigène P32 contient un codon stop empêchant la production de la protéine de fusion dans le vecteur d'expression  $\lambda$ Zapll. Or ce clone a été isolé par un criblage en expression, ce qui suggère que cette région 5' non traduite renferme les séquences nécessaires à l'initiation de la traduction. Cependant, la séquence d'initiation de la traduction ou séquence de Shine-Dalgarno, servant de site de fixation pour les ribosomes chez les Procaryotes (GAGAGG) (Shine and Dalgarno 1974) n'est pas retrouvée en amont des deux codons ATG potentiellement initiateurs. L'obtention d'un produit de traduction *in vitro* à partir de l'ARNm de l'insert 43 permettrait de confirmer que la séquence est bien complète. Cette synthèse ne peut en effet s'effectuer qu'en présence des séquences nécessaires à l'initiation de la traduction. De plus, le microséquençage de ce produit de traduction ATG initiateur.

Le site de polyadénylation des ARNm est déterminé chez les eucaryotes supérieurs, par la présence de la séquence consensus AATAAA (Proudfoot and Brownlee 1976; Fitzgerald and Shenk 1981) située de 10 à 30 bases en amont de la queue polyA. Un motif similaire (AATA) est présent 10 à 15 bases en amont de la queue polyA des gènes *SAG1* et *SAG2*, *GRA1*, *GRA5* et *P32*. Le gène *GRA2* ne contient pas ce motif, les séquences les plus proches du consensus dans cette région étant ATA à -10 et AATTA à -22.

La caractérisation de ces régions régulatrices de la transcription et de la traduction pourra être appréhendée grâce à des constructions chimériques exprimées transitoirement dans le Toxoplasme. La fusion d'un gène rapporteur en aval des régions supposées promotrices des gènes du Toxoplasme devrait conduire à l'identification des séquences impliquées dans la transcription. De telles expériences ont permis de montrer l'importance de certaines séquences dans la transcription des gènes de *Leishmania enriettii* (Curotto de Lafaille, Laban et al. 1992). La transfection de cellules par ces gènes permettra de plus de savoir si de telles séquences sont conservées et reconnues.

# Structure des protéines GRA5 et P32

La composition en acides aminés de GRA5 a été déterminée grâce à l'isolement et au séquençage du gène. Cependant, la majorité de la séquence des régions hydrophiles de GRA5 a également été obtenue par le microséquençage de l'antigène GRA5 natif. Les régions microséquencées représentent en effet 65% des séquences hydrophiles accessibles à la digestion par la trypsine.

94

La séquence en acides aminés de GRA5 est caractérisée par deux régions riches en résidus hydrophobes, l'une N-terminale et la seconde au centre de la molécule. La région hydrophobe N-terminale répond aux critères classiques définis pour le peptide signal d'une molécule sécrétée (Von Heijne 1986), ce qui est retrouvé dans les séquences de GRA1, GRA2 et GRA4 (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Mevelec, Chardès et al. 1992; Mercier, Lecordier et al. 1993). Cette structure moléculaire est en faveur de la sécrétion des antigènes des granules denses. Le site de clivage probable du peptide signal de GRA5 se situe entre les résidus 25 et 26. Le peptide mature contiendrait donc 108 acides aminés avec un poids moléculaire (PM) théorique de 11,8 kDa environ, c'est-à-dire la moitié du PM apparent (21 kDa). Or ce PM est observé en conditions réductrices et n'est donc pas dû à la formation d'homo ou d'hétérodimères via le résidu Cystéine situé dans la région C-terminale. Il est important de noter qu'une migration inattendue est observée pour différents antigènes du Toxoplasme. Par exemple, SAG2 recombinant migre presque au même niveau que SAG2 natif (22 kDa), alors que le PM théorique est de 15 kDa (Parmley, Sgarlato et al. 1992). De la même façon, des résultats récents indiquent l'antigène GRA2 recombinant migre à environ 25 kDa, pour un PM calculé de 20 kDa. Il en est de même pour la molécule GRA1 recombinante (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989).

La charge importante des régions hydrophiles de GRA5 pourrait également expliquer un retard de migration en gel. Cette caractéristique est retrouvée pour les protéines fortement chargées telles que ROP1 (Ossorio, Schwartzman et al. 1992) ou encore les PARP, protéines acides riches en Proline de *T. Brucei* (Roditi, Dobbelaere et al. 1989).

L'absence de reconnaissance de GRA5 recombinant par l'anticorps monoclonal TG17-113 suggère la présence d'épitopes générés par des modifications posttraductionnelless (glycosylation, phosphorylation) de l'antigène natif :

-la séquence de GRA5 ne contient pas de sites potentiels de N-glycosylation, mais les résidus Sérine et Thréonine pourraient être O-glycosylés ;

-le séquençage de l'antigène natif n'a pu être réalisé à partir de son extrémité N-terminale, suggérant une modification du premier résidu, postérieur au clivage du peptide signal. Une telle modification, observée également pour GRA1 et GRA2 (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989; Mercier, Lecordier et al. 1993), pourrait contribuer à la stabilisation des molécules de granules denses après leur sécrétion dans la vacuole parasitophore. Le résidu N-terminal des protéines GRA, sirué après le site de clivage le plus probable des peptides signaux, est le Glycocolle pour GRA4 et GRA5, et Alanine pour GRA1 et GRA2. La nature de cette modification reste cependant inconnue. Il serait intéressant de savoir si cette modification est commune à toutes ces molécules, ou si au contraire chaque molécule des granules denses possède une maturation post-traductionnelle qui lui est propre, en fonction de sa localisation dans la vacuole parasitophore.

L'étude de cette différence entre les poids moléculaires théorique et apparent pourra être appréhendée par différentes techniques.

-L'analyse de la taille du produit de traduction *in vitro* d'un clone ADNc complet codant pour GRA5 permettra d'estimer le PM apparent dû uniquement au "squelette" protéique.

-Le marquage métabolique des parasites en présence de sucres tritiés indiquera si GRA5 est glycosylé ou non. De telles expériences ont permis de démontrer la glycosylation de GRA2 et GRA4 (Achbarou, Mercereau-Puijalon et al. 1991).

La seconde région hydrophobe de GRA5 est encadrée par deux régions hydrophiles fortement chargées. Cette zone hydrophobe présente les caractéristiques de taille (18 acides aminés) et d'environnement (résidus basiques) des régions transmembranaires (Rao and Argos 1986). Cette structure est à rapprocher de la distribution ultrastructurale de GRA5, systématiquement associée à la membrane de la VP ou à la paroi du kyste. Néanmoins, l'association de GRA5 à ces membranes *via* cette région transmembranaire reste à démontrer. L'intégration de GRA5 dans les membranes pourra être démontrée par la production de sérums dirigés contre la région N-terminale et la région C-terminale, ce qui permettra de plus de connaitre son orientation, en particulier de savoir quel est la région de la molécule en contact avec le cytoplasme de la cellule hôte.

La localisation de GRA5 à la membrane de la vacuole parasitophore soulève différentes questions, notamment celle de l'origine de la membrane de cette vacuole, de la cinétique d'intégration membraire de GRA5 et du transport de cette molécule entre l'étape de sécrétion et la membrane de la vacuole parasitophore.

L'hypothèse d'une intégration de GRA5 dans la membrane de la cellule-hôte au moment de la pénétration du parasite semble peu vraisemblable. En effet, contrairement à la protéine ROP1, qui n'est associée à la membrane de la vacuole parasitophore que dans les premières minutes de l'invasion (Saffer, Mercereau-

Puijalon et al. 1992) (Dubremetz, en préparation), GRA5 est présente de façon permanente à la membrane de cette vacuole mais également dans la paroi du kyste (figure 3) (Torpier, Charif et al. 1993). Des travaux récents indiquent que GRA3, autre molécule des granules denses associée à la membrane de la vacuole, n'est pas présente à la membrane dans les minutes suivant l'invasion, mais est alors détectée autour des tachyzoïtes. Un marquage abondant de la membrane de la vacuole parasitophore est par contre observé ultérieurement (Dubremetz, en préparation).

Un mécanisme similaire pourrait vraisemblablement être envisagé pour GRA5. De plus, la présence de cet antigène dans les granules denses des bradyzoïtes et au niveau de la paroi du kyste (Torpier, Charif et al. 1993) suggère une sécrétion continue de cet antigène par les parasites intracellulaires et enkystés.

L'observation, dans certains cas, d'une immunoréactivité anti-GRA5 au niveau du réseau membranaire de la vacuole parasitophore (figure 3) pourrait suggérer l'association de cet antigène à un transporteur, par exemple par le biais du résidu Cystéine dans la région C-terminale.

L'étude des structures responsables du ciblage des protéines dans les granules denses pourra être étudiée grâce à la construction de molécules chimériques, transfectées dans des cellules sécrétrices. Il est en effet possible d'imaginer une molécule composée de fragments de deux antigènes des granules denses dont la distribution est différente, ou encore d'un antigène des granules denses et d'un antigène de surface. Il est également envisageable de tranfecter le Toxoplasme lui-même par les différents gènes mutés, de façon à créer des mutants "nuls" par recombinaison homologue. Le criblage des mutants devrait cependant s'avérer plus difficile pour les protéines des granules denses que pour les protéines de surface.

La séquence en acides aminés de l'antigène P32 contient, ainsi que celle de GRA5, deux domaines hydrophobes. Le premier domaine est situé dans la région N-terminale de la protéine. Cette séquence ne correspond pas à un peptide signal "classique", que l'on considère la première ou la deuxième Méthionine du cadre de lecture ouvert. L'antigène P32 est détecté en immunofluorescence sous forme de granulations à l'intérieur des parasites. De plus, ce marquage est observé aux deux stades tachyzoïte et bradyzoïte. Ces arguments sont en faveur d'une localisation de cette molécule dans les granules denses :

-elle est détectée aux deux stades parasitaires, mais tous les bradyzoïtes ne sont pas marqués dans un même kyste, ce qui peut être observé par exemple pour GRA5 ;

-GRA5 possède des motifs communs à cet antigène, vraisemblablement à l'origine de leur réactivité croisée et qui suggèrent une fonction apparentée ;

-les sérums dirigés contre cette molécule de 32kDa marquent faiblement la paroi des kystes intracérébraux, bien qu'il soit impossible de distinguer à cette échelle si la fluorescence est associée à la paroi elle-même ou au réseau membranaire sous-jacent. Cette distribution est selon nous à rapprocher de la structure moléculaire de cet antigène qui possède une région hydrophobe répondant aux critères définis pour les domaines transmembranaires. Jusqu'à présent, deux molécules des granules denses possédant une région transmembranaire ont été caractérisées : l'une associée à la membrane de la vacuole parasitophore (GRA5) et la seconde au réseau membranaire (GRA4).

Ces résultats, bien que préliminaires et demandant confirmation au niveau ultrastructural, suggèrent que cette molécule fait partie des antigènes sécrétés par les granules denses. La réactivité croisée ainsi que les homologies observées avec GRA5 appuient selon nous cette hypothèse. De plus, il est possible que d'autres antigènes possèdent des caractéristiques communes. En effet, les sérums anti-GRA5 et anti-P32 recombinantes détectent d'autres molécules en Western blot, en particulier un doublet en commun à 28kDa. Ces similitudes entre les deux protéines pourraient évoquer l'existence d'une famille de molécules.

L'interrogation des banques de données n'a permis de dégager aucune homologie significative avec GRA5 ou l'antigène de 32kDa. Des scores plus élevés sont cependant détectés si l'on considère des petits fragments de chaque molécule. Par exemple, la région riche en acide glutamique de GRA5 s'aligne sur les protéines composant les neurofilaments, constituants du cytosquelette des neurones. La région C-terminale de l'antigène P32 s'aligne quant à elle sur les protéines riches en Glycocolle telles que différents collagènes, qui possèdent le motif répété Gly-X-Y. D'autres homologies sont détectées, dans la même région avec la fibroïne de la soie, la kératine, une "eggshell protein" de *Schistosoma japonicum*, ou encore la "circumsporozoite protein" de *Plasmodium*. De telles homologies, même faibles, avec ces diverses protéines fibreuses, pourrait suggérer un rôle structural pour ces deux antigènes.



# Propriétés immunologiques

La réactivité antigénique croisée entre les antigènes GRA5 et P32, suggérée par la sélection d'anticorps sur les protéines recombinantes, a été confirmée par la production de sérums anti-protéines recombinantes. La comparaison des bandes détectées en Western blot par ces deux types de sérums (Anticorps sélectionnés ou anti-protéines recombinantes) permet de noter des différences entre l'antigénicité et l'immunogénicité de ces molécules. L'antigène P32 est reconnu par les anticorps anti-GRA5 natif ou recombinant. Par contre, l'immunisation par l'antigène P32 recombinant ne génère pas la production d'anticorps reconnaissant l'antigène P21 natif, mais permet la détection d'un antigène de 24 kDa environ. Cet antigène n'est révélé avec aucun des sérums anti-GRA5 natif ou recombinant.

Les deux sérums anti-GRA5 et P32 recombinantes détectent un doublet aux environ de 28 kDa qui semble différent de l'antigène GRA2. Ce doublet parait en effet "encadrer" la bande reconnue par l'anticorps monoclonal TG17-179. Par contre, l'antigène de 28 kDa reconnu par le sérum anti-GRA5 natif comigre avec GRA2.

Cette différence entre l'immunogénicité et l'antigénicité de ces deux molécules semble se confirmer dans la réponse humaine développée lors de l'infection par le Toxoplasme. En effet, dans le cadre de l'évaluation des potentialités diagnostiques de GRA2 recombinant (A. Murray, en préparation), les antigènes GRA5 et P32 recombinants ont été testés en parallèle contre quelques sérums humains de phases aiguë et chronique. Des résultats préliminaires d'ELISA montrent que l'antigène P32 recombinant est reconnu par tous ces sérums-tests. Au contraire, l'antigène P21 recombinant n'est reconnu par aucun d'entre eux. Il apparait donc que, malgré la présence de motifs communs, le ou les épitopes de P32 immunogènes chez l'homme sont soit absents soit non antigéniques dans GRA5. Il semble en être de même chez la souris, puisque le sérum anti-P32 recombinant ne reconnait pas GRA5

Bien que ces résultats restent à confirmer avec un nombre significatif de sérums, l'antigène P32 pourrait, ainsi que cela a été démontré pour GRA2, constituer un outil de diagnostic utilisable sous forme recombinante. Les 59 acides aminés N-terminaux de GRA2 révèlent 100% des sérums de phase aiguë et 75% des sérums de phase chronique.

Si les potentialités diagnostiques de P32 se confirment, il semble possible par exemple d'associer ces deux antigènes sous forme recombinante dans un même test diagnostic permettant à la fois une bonne standardisation et une excellente fiabilité.

L'antigénicité de cette molécule ne semble pas modifiée sous forme recombinante, ce qui suggère soit la conservation de la structure secondaire de cet antigène lors de sa synthèse en système bactérien, soit la présence d'épitopes linéaires. Cette propriété permetta donc la caractérisation des épitopes présents au sein de cette molécule, par exemple par des expériences d'inhibition par compétition avec des fragments de l'antigène P32 sous forme recombinante ou de peptide de synthèse. Ces résultats devraient en outre permettre d'élucider la nature de la réactivité croisée avec GRA5.

La purification de GRA5 natif par RP-HPLC a permis l'évaluation de son rôle protecteur dans deux modèles animaux mis au point dans notre laboratoire (Darcy and Zenner 1993).

L'immunisation par 10µg de GRA5 natif en présence d'AIF confère une protection significative vis-à-vis d'une infestation létale (figure 27). Une survie prolongée (plus de 50 jours) est observée chez 40% des animaux, dans deux expériences successives, alors que presque 80% des témoins sont morts à 10 jours. Une troisième série d'expériences de protection a été entreprise afin d'étudier les potentialités protectrices des antigènes P32 et GRA5 sous forme recombinante. A J11, l'immunisation de souris par les AES et l'antigène GRA5 natif purifié confèrent respectivement 27 et 31% de survie. Ces résultats indiquent une infestation particulièrement forte, puisque la protection par les AES atteint normalement 70% à cette date dans des expériences antérieures (Darcy, Torpier et al. 1992). Néanmoins, à J11, 15% des animaux immunisés par l'antigène GRA5 recombinant survivent. Au contraire, tous les animaux immunisés par P32 recombinant sont morts à cette date. A J85, les taux de survie sont respectivement de 15 et 8% chez les animaux immunisés par GRA5 natif et GRA5 recombinant.

L'antigène GRA5 natif s'est également révélé protecteur dans un modèle de toxoplasmose congénitale mis au point chez le rat dans notre laboratoire (Zenner, Darcy et al. 1993). En effet, le taux de passage aux foetus, de 42% chez les témoins immunisés par l'adjuvant seul, chute à 15% lorsque la mère est préalablement immunisée par GRA5 natif purifié (L. Zenner, résultats non publiés).

Bien que préliminaires, ces résultats permettent d'envisager l'intégration de GRA5 natif ou recombinant dans la mise au point d'un vaccin sous-unité.







# CONCLUSION

Ce travail avait pour but de caractériser au niveau moléculaire un antigène des granules denses de 21kDa (GRA5) de *Toxoplasma gondii*. Il nous a également permis d'identifier un antigène de 32kDa qui possède des caractéristiques communes à GRA5, tant sur le plan de son immunogénicité que de sa distribution dans le Toxoplasme de sa structure moléculaire. Ces similitudes suggèrent que cette molécule de 32kDa est également un composant des granules denses et laissent envisager l'existence d'une famille de molécules.

Ces travaux devraient donc permettre, dans le cadre de l'étude moléculaire des antigènes de granules denses

-d'appréhender les mécanismes génétiques régulant l'expression de ces gènes,

-d'identifier les structures moléculaires responsables de leur ciblage commun dans les granules denses et au contraire de leur distribution différentielle après sécrétion dans la vacuole parasitophore

-et enfin d'évaluer les propriétés immunologiques de ces molécules, que ce soit sur le plan diagnostique ou vaccinal.

# **MATERIELS ET METHODES**

•

.

.

# I - Etude des protéines natives et recombinantes

## **1-Parasites**

Les tachyzoïtes de la souche RH sont obtenus à partir du liquide péritonéal de souris Swiss infectées. Les parasites sont repris en milieu RPMI-1640 (Gibco-BRL) et les cellules de souris contaminantes sont éliminées par filtration sur membrane de polycarbonate (3µm, Nucleopore).

### 2-Western blots d'extrait total de tachyzoïtes

L'extrait total de tachyzoïtes est constitué d'une quantité égale de protéines solubles et membranaires.

Les protéines solubles sont obtenues par traitement aux ultrasons (4x1 min.) d'une suspension de tachyzoïtes en eau distillée contenant 1% de PMSF. Cette suspension est congelée à -20°C, passée sur une X-Press (LKB) et centrifugée 2 heures à 36000g. Le surnageant ("S2") est recueilli et 100 U/mI d'Aprotinine (Sigma) sont ajoutées. Le culot de débris membranaires est traité par le détergent CHAPS à 9,7mM en PBS pH7,2, en présence de PMSF 0,04mM, EDTA 0,25mM, TLCK 0,2mM, TPCK 0,2mM. Après agitation une nuit à 4°C, la suspension est centrifugée 30 min. à 12000g. Le surnageant contenant les protéines membranaires solubilisées est recueilli et filtré sur membrane de 0,22mm (Millipore).

Après dosage de protéines, ce mélange S2-CHAPS est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 13% (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) en présence de 2-Mercapto Ethanol. Le gel est calibré à l'aide de protéines précolorées. Les protéines sont ensuite transférées 3h à 60 Volts par Western blot (Towbin, Staehelin et al. 1979) sur membrane de nitrocellulose 0,45  $\mu$ m (Schleicher et Schull). Les membranes sont saturées 30 min. en présence de lait en poudre 5% (Gloria).

۰.

# 3-Purification de l'antigène P21 natif

Les protéines de 1x10<sup>10</sup> tachyzoites sont extraites une nuit à 4°C en tampon TEN (Tris-HCI pH 7,4 10mM, EDTA 2mM, NaCI 150mM) contenant 1% de Nonidet P40, 100 U/ml d'Aprotinine et 40µM de PMSF. Après centrifugation 20 min. à 3500g, le surnageant est filtré sur 0,22µm (Millipore). Les protéines sont alors séparées par RP-HPLC (Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography) sur une colonne Vydac C18 (300Å, particules de 7µm, 500x9 mm) en 100% de solvant A (0,5% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) dans l'eau). Après 10 min. d'élution isocratique, les protéines sont éluées par un gradient de 0-100% de solvant B (25/75/0,45 (v/v/v) d'eau/acétonitrile/TFA) pendant 180 min. à un débit de 2 ml/min. Les protéines sont détectées à 215 nm et chaque fraction est lyophilisée puis reprise dans 100 µl de TEN/PBS pH 8,0 10mM (v/v). 1µl de chaque fraction est alors testé en dot blot incubé avec l'anticorps monoclonal Tg17-113 (Charif, Torpier et al. 1990). La pureté des fractions contenant l'antigène P21 est analysée sur gel de polyacrylamide 13% (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) coloré par le nitrate d'argent (Maniatis, Fritsch et al. 1990).

# 4-Digestion trypsique de l'antigène P21 et séquençage des peptides générés

Les fractions contenant l'antigène P21 purifié par RP-HPLC sont soumises à une digestion par la trypsine pendant 2 jours à 37°C dans un rapport enzyme/substrat de 5/100 (p/p), en Tris-HCl pH 8,0 100mM, CaCl2 10mM (Vandekerckhove, Bauw et al. 1985). Les fragments trypsiques sont alors séparés sur une colonne Vydac C18 (300Å, particules de 7µm, 200x4,6 mm) en 100% de solvant A. Après 40 min. d'élution isocratique, les peptides sont élués par un premier gradient linéaire de 0-37% de solvant B pendant 120 min. puis par un second gradient linéaire de 37-80% de solvant B pendant 60 min. L'élution des peptides est suivie par absorbance à 215nm. Chaque fraction contenant des peptides est concentrée de 50µl à approximativement 20µl. Les peptides correspondant aux pics majeurs sont alors séquencés par la dégradation d'Edman (Edman 1956) sur un microséquenceur phase gaz (Applied Biosystem 470A). Les dérivés PTH-acides aminés sont identifiés par HPLC (Applied Biosystem 120A).

## 5-Obtention des sérums anti-P21

L'antigène P21 est purifié par RP-HPLC et lyophilisé comme décrit ci-dessus. Des rats Fisher et des souris OF1 reçoivent à 2 semaines d'intervalle 4 injections sous-cutanées de 15µg d'antigène P21 solubilisé dans 100µl de PBS pH 7,4 et émulsifié par 100µl d'ACF (Adjuvant Complet de Freund).

## 6-Sélection d'anticorps

Les clones  $\lambda$ Zap II sont étalés de façon à obtenir l'expression des protéines de fusion (voir "criblage en expression de la banque ADNc").

Sélection négative (épuisement de sérums) : 10 ml de TN1 (Tris-HCl pH 7,5 10mM, NaCl 0,15M) -lait 5% contenant le serum de rat anti-P21 native dilué au 1/200<sup>e</sup> sont passés successivement sur quatre filtres. Le sérum ainsi épuisé sur les protéines recombinantes est comparé au sérum non épuisé sur un Western blot d'extrait total de tachyzoïtes.

Sélection positive (élution) : Les filtres sont incubés 3h avec le sérum de souris anti-P21 native au 1/100<sup>e</sup> en TN2 (pH 8,0) -lait 5%. Après lavages en TN2, les anticorps fixés sur les protéines recombinantes sont élués par 4ml de KSCN 3,5M, 10 min. sous agitation douce. Après addition de 15µl de BSA 20% et de 150µl de 10xTBS (Tris-HCl pH 8,3 0,5M, NaCl 1M), les anticorps sont dialysés une nuit à 4°C contre du 1xTBS puis analysés sur Western blot d'extrait total de tachyzoïtes.

# 7-Produits de traduction des clones

Le vecteur pBluescript permet de synthétiser l'ARN sens ou antisens correspondant à l'insert ADNc cloné, grâce à des promoteurs de transcription des phages T3 et T7 clonés de part et d'autre du polylinker. Chaque matrice est purifiée sur gradient de CsCl. 1µg est linéarisé en 3' de l'insert ADNc par Xhol ou Kpnl, 1h à 37°C puis traité par la Protéinase K à 50µg/ml 30 min. à 37°C. Après extraction par le phénol/chloroforme, l'ADN est précipité à -20°C et centrifugé. Le culot est repris en TE. La transcription *in vitro* est réalisée par 25U de T3 ARN polymérase (Boehringer), 30 min à 37°C puis la matrice ADN est éliminée par digestion à la DNase I, 15 min. à 37°C. L'ARN est précipité 1h à -20°C après extraction au phénol/chloroforme. Après estimation à 260nm de la quantité d'ARN synthétisé, la traduction *in vitro* est réalisée sur 1,5µg en présence de <sup>35</sup>S-Méthionine (Amersham)

et d'acides aminés froids, par un lysat de réticulocytes (Génofit), pendant 90 min. à 30°C. La quantité d'acide aminé radioactif incorporée est estimée par précipitation à l'acide trichloroacétique. Les produits de traduction sont analysés en SDS-PAGE 13%. Après 30 min. d'incubation en liquide scintillant (Amplify, Amersham), le gel est séché et autoradiographié.

La traduction *in vitro* de 9µg d'ARN totaux de tachyzoïtes est réalisée en parallèle.

### 8-Expression des protéines recombinantes

a-<u>Sous-clonage dans le vecteur d'expression pGEX</u> : (Smith and Johnson 1988).

Le vecteur pGEX permet l'expression de protéines recombinantes en fusion avec la Glutathion S-transférase Sj26 de *Schistosoma japonicum*. Ce système permet une purification excellente et très rapide de la protéine de fusion par fixation sur des billes d'agarose couplées au Glutathion. Les inserts ADNc ou des fragments de ces inserts sont digérés de façon à restaurer le cadre de lecture après ligation dans le vecteur pGEX. Les inserts sont purifiés sur laine de verre après électrophorèse sur gel d'agarose comme décrit ci-dessus. La ligation dans le vecteur pGEX digéré et déphosphorylé est effectuée une nuit à 16°C. La souche *E. coli* JM109 rendue compétente par le traitement au TFB (Maniatis, Fritsch et al. 1990) est utilisée pour la transformation.

Les colonies sont testées en minipréparation de plasmide par lyse alcaline (Maniatis, Fritsch et al. 1990), de façon à vérifier la présence de l'insert et éventuellement sa bonne orientation 5'-3' si les sites de restriction le permettent. Les clones sélectionnés sont testés pour l'expression de la protéine de fusion, un décalage du cadre de lecture attendu étant observé dans environ 50% des cas.

### b-Expression et purification des protéines recombinantes

# -Criblage en expression des clones recombinants

Les clones sont cultivés une nuit à 37°C en LB-ampicilline puis dilués au 1/10e. Après 1h de culture, L'IPTG est ajouté à la concentration finale de 0,1mM, pendant 1h. Toutes les étapes suivantes sont réalisées sur glace ou à 4°C afin de minimiser la dégradation de la protéine de fusion. Les bactéries sont centrifugées 10 min. à 3000rpm et le culot est repris en PBS pH 7,5, Triton X100 1%, EDTA 1mM, PMSF 0,5mM (PBS-TEP). Les bactéries sont soniquées 2x15 sec. puis le lysat est centrifugé en tubes de 1,5ml, 5 min. à 10.000 rpm à 4°C. Le surnageant est mis en contact avec des billes d'agarose couplées au Glutathion, pendant quelques minutes à 4°C. Après une centrifugation rapide, les billes sont lavées trois fois en PBS-TEP. La
protéine fixée est alors éluée 3 min. à 100°C en présence de 1 volume de Tampon échantillon concentré 2 fois. L'analyse est effectuée par électrophorèse sur minigel de polyacrylamide 5-13% coloré au Bleu de Coomassie.

## -Production de la protéine de fusion

Une colonie est cultivée une nuit à 37°C dans 200ml de LB-ampicilline. Cette culture est diluée dans 2 litres pendant une heure à 37°C puis l'expression est induite pendant 1h par addition d'IPTG 0,1mM. La culture est centrifugée 10 min. à 4°C, 3000 rpm. Chaque culot correspondant à 500 ml de culture est repris dans 10 ml de PBS-TEP froid puis les bactéries sont soniquées 4x20 sec. Le soniquat est centrifugé en tubes Corex à 4°C 10 min. à 10.000 rpm puis le surnageant est mis en contact avec 2 ml de billes agarose-Glutathion préalablement équilibrées en PBS, environ 5 min. sur un agitateur rotatif à 4°C. Les billes sont centrifugées 2 min. à 4°C à 2000 rpm puis lavées trois fois dans un grand volume de PBS-TEP.

L'élution de la protéine de fusion est ensuite réalisée par compétition avec du glutathion libre ajouté à la concentration de 5mM en Tris-HCl pH 8,0 50mM. Ce "décrochage" est effectué deux fois de suite par 5 ml de cette solution, quelques minutes à 4°C. La protéine de fusion est conservée à -20°C, un aliquot étant prélevé de façon à effectuer les analyses qualitatives et quantitatives sur minigel de polyacrylamide.

La protéine de fusion est dialysée 2x1h à 4°C contre du PBS pH 7,5, EDTA 1mM, PMSF 0,5mM, puis concentrée sur Aquacid (Calbiochem), l'élimination du glutathion libre permettant de réaliser un dosage de protéines plus précis.

# 9-Immunisation par les protéines recombinantes et par le peptide de synthèse

Les protéines recombinantes sont injectées en fusion avec la protéine Sj26. Le peptide de synthèse est couplé à l'Ovalbumine. Les souris Swiss OF1 recoivent à deux semaines d'intervalle quatre injections de 10 à 15  $\mu$ g de chaque construction dans 100 $\mu$ l de PBS, additionnés de 100  $\mu$ l d'ACF.

## 10-Localisation des antigènes par immunofluorescence

Les échantillons proviennent de souris Swiss OF1 infestées soit par la souche 76K depuis plus de trois mois et possédant de nombreux kystes intracérébraux, soit intrapéritonéalement depuis 72 heures par la souche virulente RH. Les prélèvements (cerveau et liquide intrapéritonéal) sont fixés par le Carnoy, inclus en paraffine et coupés à 5µm d'épaisseur. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont incubées une nuit à température ambiante avec les différents sérums dilués en tampon de Coons (Véronal sodique 10mM, NaCl 145mM, Azide de Sodium 3,5mM, HCl 3,4mM). Après 2 lavages rapides en tampon de Coons, l'anticorps anti-souris couplé à la fluorescéine (Jackson, Interchim) est ajouté pendant une heure à température ambiante à la dilution 1/500. Les coupes sont alors rincées en tampon de Coons et observées après montage.

## 11-Analyse des séquences protéiques

L'analyse en séquence primaire est réalisée grâce au programme "PC gene".

Les profils en 2 dimensions sont obtenus grâce au programme "HCA plot" (Gaboriaud, Bissery et al. 1987; Lemesle-Varloot, Henrissat et al. 1990). Les séquences protéiques ont été comparées aux banques de données NBRF/PIR (44900 entrées) et Genbank/EMBL (102947 entrées).

## II - Biologie moléculaire

## 1-Banque d'ADNc de tachyzoïtes

## a-Construction

L'ARN de tachyzoïtes de la souche RH est purifié par extraction au Lithium/urée (Auffray and Rougeon 1980). La construction de la banque est effectuée à l'aide de kits Stratagène. L'ARN poly(A) est séparé par passage sur une colonne oligodT ("Poly(A) Quick<sup>TM</sup> mRNA Purification Kit"). 5µg d'ARN poly(A) sont alors soumis à une reverse transcription par la MMLV reverse transcriptase ("Uni Zap<sup>TM</sup> XR Kit"). Cette synthèse du premier brin d'ADNc est initiée par un primer polyT s'hybridant à la queue poly(A) de tous les ARNm : les ADNc ainsi obtenus possèdent donc tous une extrémité 3' complète.

Après digestion de la matrice ARN par la RNase H, le second brin de l'ADNc est synthétisé par la DNA polymérase I. Des adaptateurs EcoRI sont alors ligués de manière non sélective aux deux extrémités des ADNc double brin. Une digestion ultérieure par l'enzyme Xhol permet ainsi de libérer en 3' le site Xhol introduit par le primer de la transcription reverse, alors que l'extrémité 5' porte toujours le site EcoRI. Les ADNc sont ensuite séparés selon leur taille sur colonne Ultrogel AcA34 (IBF Biotechnics). Les plus grands fragments sont alors ligués dans leur orientation 5'-3' dans le vecteur d'expression  $\lambda$ ZapII digéré par les enzymes EcoRI (5') et Xhol (3'), ce qui permet de multiplier par deux les chances d'expression. Les ADNc sont insérés dans le gène *Lac Z*, en aval d'un cadre de lecture ouvert codant pour la partie N-terminale de la β-galactosidase (4kDa).

Après "empaquetage" de l'ADN dans des protéines phagiques ("Gigapack II Gold packaging extract"), le titre de la banque est estimé en étalant différentes dilutions en présence de la souche *E. coli* PLK-F'. La même souche est utilisée pour l'amplification de la banque.

## b-<u>Criblage</u>

## Criblage en expression

La banque est étalée en présence de la souche *E. coli* XL1-Blue sur boites NZY. Les bactéries sont préalablement rendues compétentes par une incubation d'une heure en MgSO4 10mM. Après 2h d'incubation à 42°C, un filtre imbibé d'IPTG 10mM et séché est déposé sur le tapis bactérien de façon à induire l'expression des protéines recombinantes, une nuit à 37°C. Les filtres sont saturés en TN1 contenant 5% de lait en poudre (Gloria) puis incubés 2h avec le sérum de rat anti-P21 dilué au 1/200<sup>e</sup> dans le même tampon. Après trois lavages de 15 min. en TN1, les filtres sont incubés 1h avec des anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplés à la Peroxydase (Diagnostic Pasteur), au 1/500<sup>e</sup> en TN1, puis révélés après lavages.

Le criblage différentiel avec l'anticorps monoclonal Tg 17-179 dirigé contre l'antigène de secrétion GP28,5 (Charif, Darcy et al. 1990) est effectué dans les mêmes conditions, en TN2 (pH 8,0) à la dilution 1/200<sup>e</sup>.

## Criblage en hybridation

La banque est étalée en présence des bactéries *E. coli* XL1-Blue compétentes sur boites NZY, une nuit à 37°C. Une empreinte des plages de lyse est réalisée sur filtre de nitrocellulose. Ces filtres sont dénaturés par contact pendant 1 min. avec NaOH 0,5M, NaCl 1,5M puis neutralisés 8 à 10 min. par Tris-HCl pH 7,5 1M, NaCl 1,5M. Les filtres sont ensuite rincés 10 min. en 2xSSC, séchés puis l'ADN est fixé à 80°C pendant 2h. Les filtres sont préhybridés en 6xSSC, 0,25% lait en poudre puis hybridés dans le même milieu contenant la sonde marquée au <sup>32</sup>P et dénaturée, une nuit à 65°C (T°H). Les lavages sont effectués en 2xSSC, 0,1% SDS, 0,25% lait en poudre, 2x30 min. à température ambiante puis 2x30 min. à (T°H-5 à 10°C) en 0,1xSSC, 0,1% SDS. Les filtres sont alors séchés puis autoradiographiés une nuit à -80°C (Hyperfilm MP, Amersham).

Les clones positifs sont purifiés par un nouvel étalement sur boite NZY. Les empreintes sont alors hybridées par la même sonde, marquée cette fois par la Digoxigénine ("Non radioactive DNA labeling and detection kit", Boehringer Mannheim). La dénaturation des filtres est identique au protocole décrit plus haut. Les conditions d'hybridation sont détaillées au paragraphe "Southern blots".

## c-Excision : passage à la forme plasmidique des clones λZap II

Les clones phagiques  $\lambda$ Zap II peuvent être obtenus sous forme plasmidique sans sous-clonage des inserts : cette étape est réalisée *in vivo*. Les clones  $\lambda$ Zap II positifs purifiés sont mis en contact avec des XL1-Blue compétentes, en présence du phage "helper" R408 (Stratagène) pendant 15 min. à 37°C puis l'ensemble est mis en culture en milieu 2TY, 3h à 37°C sous agitation. Lors de cette étape, dans les bactéries coinfectées par les deux phages, les protéines du phage helper sont détournées vers les séquences d'initiation et de terminaison de la réplication de l'ADN qui ont été sousclonées dans le vecteur  $\lambda$ Zap II. Une partie de ce phage est donc répliquée sous forme de "phagemide" pBluescript, c'est-à-dire d'ADN double brin plasmidique. Les cellules sont ensuite lysées pendant 20 min. à 70°C et les débris sont éliminés par centrifugation. Le surnageant est mis en contact avec de nouvelles bactéries compétentes qui sont étalées cette fois sur boites LB-Ampicilline (100µg/ml), une nuit à 37°C. Une grosse colonie (résistante) bien isolée des colonies satellites est alors réétalée sur une nouvelle boite afin d'éliminer les contaminations par le phage helper.

## 2-ADN génomique

a-<u>Purification d'ADN génomique de tachyzoïtes</u> (Johnson, Dubey et al.

1986)

10<sup>10</sup> tachyzoïtes de la souche RH sont rincés deux fois en PBS. Le culot est resuspendu dans 10 volumes de NaCl 0,1M, EDTA 0,1M, Tris-HCl pH7,5\_10mM. Après addition de 1/10<sup>e</sup> de volume de SDS 10%, les parasites sont incubés 30 min. à 37°C en présence de 100 µg/ml de RNase, puis 3h à 50°C avec 100 µg/ml de Protéinase K. Après deux extractions des protéines au phénol/chloroforme, l'ADN est dialysé une nuit à 4°C contre du TE (Tris-HCl pH 8,0 10mM, EDTA 1mM). La séparation de l'ADN de tachyzoïtes et de l'ADN de souris contaminant, basée sur la différence du %(GC) entre les deux espèces, est effectuée sur gradient de CsCl. 200 μg d'ADN sont mélangés à 7,6 ml de Tris-HCl pH 8,0 50mM, EDTA 25mM saturé en CsCl puis 200 µg de colorant Hoescht 33258 (Sigma) sont ajoutés. Un volume final de 10,57 ml est obtenu par addition d'eau, déposé dans un tube à ultracentrifugation "Quick Seal" (Beckman). Le volume est complété par de la paraffine et la centrifugation est effectuée 48h à 45.000 rpm (rotor Ti90). Trois bandes d'ADN sont alors repérées sous UV, l'ADN de tachyzoïtes correspondant à la plus basse. Cette bande est prélevée à la seringue puis le colorant est extrait au N-Butanol saturé en TE. Un second gradient peut être effectué dans les mêmes conditions, afin d'éliminer l'ADN de souris résiduel. l'ADN est ensuite dialysé une nuit à 4°C contre du TE puis la concentration est estimée à 260 nm.

## b-Banque génomique

Construction : (Cesbron-Delauw, Guy et al. 1989)

L'ADN génomique de tachyzoïte est partiellement digéré par l'enzyme de restriction Mboll. Les fragments de 15 à 20kb sont alors sélectionnés et ligués dans le site BamHI du vecteur phagique EMBL 3.

La banque génomique est étalée en présence de la souche *E. coli* P2.392 rendue compétente par incubation en MgSO4 10mM, une nuit à 37°C sur boites NZY. Les empreintes en nitrocellulose sont dénaturées et fixées (voir "criblage de la banque d'ADNc") puis hybridées une nuit à 68°C avec un insert ADNc purifié et marqué par la Digoxigénine. Les conditions d'hybridation sont identiques à celles décrites pour les Southern blots (voir plus bas). Les clones positifs sont réétalés et criblés dans les mêmes conditions.

## c-<u>Sous-clonage des fragments génomiques en vecteur</u> plasmidique

La souche *E. coli* P2.392 est utilisée pour amplifier en milieu NZY les clones génomiques. Les phages sont purifiés sur gradient de CsCl avant purification de l'ADN phagique par la technique standard (Maniatis, Fritsch et al. 1990).

2 à 3  $\mu$ g d'ADN phagique sont digérés par l'enzyme de restriction voulue, pendant 3h à 37°C. Un aliquot est déposé sur gel d'agarose afin de vérifier que la digestion est complète. Le reste est alors ligué en totalité dans le vecteur pUC 18 ou pUC 19, préalablement digéré et déphosphorylé. La souche *E. coli* JM109 rendue compétente pour la transformation par le TFB (Maniatis, Fritsch et al. 1990) est transformée, pendant 30 min. sur glace. Après 1,5 min de choc thermique à 42°C, les bactéries sont mises en culture 1h à 37°C en milieu LB, afin de permettre l'expression de la résistance à l'ampicilline. Les bactéries sont étalées sur boites LB-Ampicilline une nuit à 37°C.

Les colonies sont alors repiquées en double sur boites quadrillées afin de permettre un criblage en hybridation. Une empreinte en nitrocellulose est réalisée sur la moitié de ces boites. Ces empreintes sont dénaturées pendant 5 à 10 min. avec NaOH 0,5M, NaCl 1,5M puis neutralisées 15 à 20 min. par Tris-HCl pH 7,5 1M, NaCl 1,5M. Les filtres sont ensuite rincés 10 min. en 2xSSC, séchés puis l'ADN est fixé à 80°C pendant 2h. L'excès de matériel est éliminé par incubation des filtres en 3xSSC, 0.1% SDS, 3h à 50°C, puis par une digestion par la Protéinase K à 100  $\mu$ g/ml en 2xSSC, 0,1% SDS, 1h à 56°C. Les filtres sont ensuite préhybridés et hybridés dans les conditions standard avec un insert ADNc marqué par la Digoxigénine (voir plus bas).

## 3-Préparations de plasmide

Après transformation, les colonies sont testées en minipréparation de plasmide par la technique de lyse alcaline (Maniatis, Fritsch et al. 1990). Le matériel est digéré par les enzymes de restriction appropriées en présence de RNase.

Les purifications de plasmide à grande échelle sont réalisées par la technique de "boiling" suivi d'un gradient sur CsCl-Bromure d'Ethidium (Maniatis, Fritsch et al. 1990). Après extraction du BrEt au N-Butanol, l'ADN est dialysé contre du TE et précipité si la concentration est insuffisante.

## 4-Southern et Northern Blots

## a-Sondes nucléiques

## -Purification

Le plasmide recombinant purifié sur gradient de CsCl est digéré par les enzymes de restriction appropriées pendant 2 à 3h à 37°C. L'insert ainsi libéré est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Après coloration du gel au Bromure d'Ethidium, l'insert est découpé puis placé dans un tube de 1,5ml préalablement percé et contenant de la laine de verre siliconée tassée (Interchim). Ce tube est emboité sur un second tube et l'insert est élué par centrifugation à 6.000 rpm pendant 10 min. Les débris d'agarose sont éliminés par 2 extractions au phénol/chloroforme puis l'insert est précipité une nuit à -20°C par addition de 1/10e de volume d'Acétate de Sodium pH 5,2 3M et de 2 volumes d'Ethanol 100%. Après 10 min. de centrifugation à 13.000 rpm, l'insert est repris en TE et un aliquot est dosé sur minigel d'agarose.

## -Marquage par le <sup>32</sup>P

25 ng d'insert sont dénaturés 5 min à 100°C puis transférés rapidement sur glace. Le marquage est effectué par la Klenow selon la méthode du "random hexamers priming" (Sanger, Nicklen et al. 1977) en présence de ( $\alpha^{32}$ P)-dCTP (Amersham), de 1h à une nuit à température ambiante. La réaction est arrêtée par addition de TE et les nucléotides libres sont éliminés par précipitation en présence d'ADN de sperme de hareng. La sonde est reprise en TE et le marquage est évalué par le comptage d'un aliquot. La sonde est à nouveau dénaturée 5 min. à 100°C avant l'hybridation.

## -Marquage par la Digoxigénine

("Non radioactive DNA labeling and detection kit", Boehringer Mannheim). Le principe de marquage est identique, l'un des nucléotides étant couplé à la Digoxigénine (Digoxigénine-11-dUTP). La sonde pouvant se conserver à -20°C, 50 à 200 ng d'insert sont marqués à chaque réaction.

## b-<u>Hybridation</u>

Les Southern blots sont réalisés par capillarité selon les techniques standard (Maniatis, Fritsch et al. 1990). L'ADN est fixé soit 2h à 80°C (nitrocellulose, Schleicher and Schull), soit 3 min. sous UV (Hybond-N, Amersham).

Les Northern blots sont réalisés sur 10  $\mu$ g d'ARN de tachyzoïtes soumis à une électrophorèse en gel d'agarose-Formaldéhyde, en tampon MOPS 50mM, EDTA 1mM, 1h à 60 Volts puis 2h à 100 Volts. Le transfert est effectué par capillarité selon les techniques classiques (Maniatis, Fritsch et al. 1990).

## -Hybridation avec une sonde radiomarquée

Southern blots : La préhybridation est effectuée de 30 min. à 1h en 6xSSC, 0,25% lait en poudre à 68°C. La sonde dénaturée 5' à 95°C est ajoutée dans le même milieu, l'hybridation étant effectuée une nuit à 68°C. Les blots sont lavés 2x15 min. en 2xSSC, SDS 0,1% à température ambiante puis 2x30 min. à 68°C en 0,1xSSC, SDS 0,1%, séchés puis autoradiographiés à -80°C en présence d'écrans amplificateurs (Hyperfilm MP, Amersham, ou X-Omat, Kodak).

Northern blots : La préhybridation et l'hybridation s'effectuent en Formamide 40%, NaCl 0,9M, Phosphate de Sodium pH 6,5 50mM, EDTA 2mM, ADN de sperme de hareng 50µg/ml, Sulfate de Dextran 5%, SDS 1%, Denhardt 4x (Denhardt 100x = Ficoll 2%, Polyvinylpyrrolidone 2%), à 42°C pendant une nuit. Les filtres sont lavés en 0,5xSSC, SDS 0,1%, 2x15 min. à température ambiante puis 2x15 min. à 65°C. Les filtres sont séchés puis autoradiographiés à -80°C en présence d'écrans amplificateurs (Hyperfilm MP, Amersham, ou X-Omat, Kodak). Hybridation par une sonde marquée par la Digoxigénine

("Non radioactive DNA labeling and detection kit", Boehringer Mannheim) Le même protocole d'hybridation et de détection est employé pour les criblages de plages de lyse et de colonies.

Hybridation : Les filtres sont préhybridés en 2xSSC, Sarcosine de Sodium 0,1%, SDS 0,02%, agent bloquant 1%, pendant 30 min à 68°C. La sonde dénaturée 5 min à 100°C est ajoutée au même milieu à raison de 2 à 5 ng/ml, une nuit à 68°C. La sonde est récupérée, congelée immédiatement à -20°C et peut être réutilisée. Les lavages sont effectués en 2xSSC, SDS 0,1% 2x5 min. à température ambiante, puis en 0,1xSSC, SDS 0,1%, 2x15 min. à 68°C.

Révélation : Le filtre est rincé rapidement en Tampon 1 (Tris-HCl pH 7,5 0,1M, NaCl 0,15M) puis saturés 30 min. dans le Tp2 (Tp1 contenant 0,5% d'agent bloquant). L'incubation avec l'anticorps anti-Digoxigénine couplé à la Phosphatase Alcaline est réalisée en Tp1, 30 min. à la dilution 1/5.000. Le filtre alors lavé 2x15 min. en Tp1 puis équilibré quelques minutes en Tp3 (Tris-HCl pH 9,5 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl2 50mM). La révélation est effectuée à l'obscurité en Tp3 contenant :

-soit deux substrats chromogènes de la Phosphatase Alcaline, Nitro Blue Tetrazolium (NBT) et Bromo-4-Chloro Indoyl Phosphate (BCIP). Le temps de révélation peut varier de 5 min. pour un southern blot à 30 min. environ pour la détection de plages de lyse. La réaction est arrêtée dans l'eau;

-soit un substrat permettant le développement d'une réaction de chimioluminescence (AMPPD). Les filtres sont alors exposés de quelques minutes à une nuit (Hyperfilm MP, Amersham).

## 5-Séquençage

## ADN double brin

2 à 5 μg d'ADN plasmidique purifié sur gradient de CsCl ou à l'aide du kit "Quiagen" (Diagen) sont dénaturés 5 min. à 70°C par NaOH 0,4N. Après neutralisation par l'Acétate de Sodium 3M pH 4,8, l'ADN est immédiatement précipité par addition de deux volumes d'Ethanol 100%, une nuit à -20°C. Après centrifugation 20 min. à 13.000 rpm, le culot est repris en eau distillée.

## ADN monobrin

Les inserts ADNc ou génomiques sont purifiés à partir du vecteur plasmidique puis religués dans le bactériophage M13 (dérivés mp18 et/ou mp19). L'ADN monobrin est obtenu par infection de *E. coli* TG1 (Maniatis, Fritsch et al. 1990).

-ADNc : Les inserts ADNc sont séquencés à l'aide de primers internes, dans les deux orientations, en monobrin et double brin.

-ADN génomique : Les inserts génomiques sous-clonés en M13 mp19 sont soumis à une digestion progressive permettant de générer des mutants plus ou moins délétés ("Cyclone I, Rapid Deletion Subcloning Biosystem for M13 Derivated", IBI, Eastman Kodak Company). Il est ainsi possible, par recouvrement de plusieurs clones délétés, de séquencer de grands fragments d'ADN avec un seul primer s'hybridant au vecteur (Amorce M13-40).

La réaction de séquençage est effectuée par la réaction de terminaison de chaîne (Sanger, Nicklen et al. 1977) par utilisation de déaza-didéoxynucléotides ("Multiwell Microtitre Plate DNA Sequencing System", Amersham), en présence de ( $\alpha^{35}$ S)-dCTP (Amersham). Les échantillons sont déposés après dénaturation 5 min. à 95°C sur gel de polyacrylamide 6%, Urée 8,4M en tampon TBE pH 7,9 (Tris-HCI 89mM, Acide borique 88mM, EDTA 2mM). Après environ 3h 30 min. de migration, le gel est fixé 15 min. en Acide Acétique 10%, Méthanol 10%, séché sous vide puis autoradiographié une nuit ou plus à température ambiante (Film  $\beta$ -max, Amersham).

## 6-Extension d'amorce

Cette expérience, destinée à déterminer le site de départ de la transcription, est réalisée par une transcription réverse sur l'ARN de tachyzoïtes amorcée par un oligonucléotide dont la séquence est choisie à l'extrémité 5' de l'insert ADNc le plus long.

500ng d'oligonucléotide sont marqués par 20µCi de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP (Amersham) à l'aide de la polynucléotide kinase (Boehringer). Après précipitation à l'Acétate de Sodium en présence d'ARNt entraineur, le marquage de la sonde est évalué. 10<sup>6</sup> cpm sont mis en présence de 10µg d'ARN total de tachyzoïtes 3 min. à 80°C puis jusqu'au Tm, calculé pour chaque oligonucléotide. La moitié de cette réaction est soumise à une transcription réverse, 2x1h à 42°C (l'enzyme reverse transcriptase est à nouveau ajoutée au bout d'une heure). Après extraction phénolique et précipitation en présence d'ARNt entraineur, le culot est repris dans le Bleu échantillon utilisé pour les réactions de séquence. Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide utilisé pour le séquençage 8%, Urée 8,4M en tampon TBE. Une réaction de séquençage réalisée

sur l'ADN génomique à l'aide des mêmes oligonucléotides est déposée en parallèle afin de calibrer le gel (toute autre réaction de séquence peut être utilisée). Après environ 1h d'électrophorèse, le gel est fixé, séché et autoradiographié (Hyperfilm MP, Amersham).

## 7-Protection à la Nucléase S1

Cette expérience est destinée à montrer la présence d'introns dans la séquence génomique. 100µg d'ARN total de tachyzoïtes et 250ng d'insert génomique simple brin (en M13) sont coprécipités à l'Acétate de Sodium en présence d'ARNt entraineur. Le culot est repris dans 3µl d'eau, 24µl de formamide désionisée et 3µl de tampon 10xBERK/BVF (NaCI 4M, Pipes pH 6,7 0,4M, EDTA pH 8,0 10mM). Après incubation 10 min. à 70°C, l'hybridation entre l'ADN génomique et l'ARN est réalisée au moins 5h à 50°C. Ce mélange est alors ajouté à une solution conservée sur glace contenant 3,3µg d'ADN de sperme de hareng dénaturé dans 150µl d'eau, 150µl de tampon 2xS1 BVF (NaCl 1,5M, NaOAc 0,6M, ZnSO4 10mM, glycérol 10%) et 60U de Nucléase S1. Une incubation de ce mélange 1h à 37°C permet à la Nucléase S1 de dégrader l'ADN monobrin non hybridé à l'ARN et formant des boucles correspondant aux introns. L'enzyme est ensuite éliminée par extraction pnénolique et les complexes ARN/ADN sont précipités à -70°C. Le culot est repris en TE et l'ARN est digéré 15 min. à 37°C par la RNase. Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en gel d'agarose 1% puis transférés par Southern blot sur nylon (Hybond-N, Amersham). Les fragments sont détectés par une sonde ADNc marquée à l'( $\alpha$ -<sup>32</sup>P)-dCTP.

# BIBLIOGRAPHIE

· .

Achbarou, A., O. Mercereau-Puijalon, et al. (1991). Differential targetting of dense granule proteins in the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. 103: 321-329.

Aikawa, M., Y. Komata, et al. (1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Pathol. 87: 285-290.

Allegra, C. J., D. Boarman, et al. (1990). Interaction of sulfonamide and sulfone compounds with *Toxoplasma gondii* dihydropteroate synthase. J. Clin. Invest. 85: 371-379.

Ambroise-Thomas, P. and J. P. Garin (1984). Toxoplasmose. Encycl. Med. Chir., Paris, Maladies Infectieuses 8098 A<sup>10</sup> 4: 1-8.

Anderson, S. E., J. L. Krahenbuhl, et al. (1979). Longitudinal studies of lymphocyte rsponse to *Toxoplasma* antigen in humans infected with *T. gondii*. J. Clin. Lab. Immunol. 2: 293-297.

Asai, T., T. Kim, et al. (1987). Detection of nucleoside triphosphate hydrolase as a circulating antigen in sera of mice infected with *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 55: 1332-1335.

Asai, T., J. O'Sullivan, et al. (1983). A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. J. Biol. Chem. 258: 6816-6822.

Auffray, C. and F. Rougeon (1980). Purification of mouse immunoglobulin heavychain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. Eur. J. Biochem. 107: 303-307.

Beaman, M. H., S.-Y. Wong, et al. (1992). Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. Immunological Reviews 127: 97-117.

Benedetto, N., C. Auriault, et al. (1991). Effect of rIFN $\chi$  and IL2 treatments in mouse and nude rat infections with *Toxoplasma gondii*. Eur. Cytokine Net. 2: 107-114.

Black, C. M., D. M. Israelski, et al. (1989). Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *Toxoplasma gondii* or *Trypanosoma cruzi*. Immunol. 68: 570-574.

Blanco, J. C., S. O. Angel, et al. (1992). Cloning of repetitive DNA sequences from *Toxoplasma gondii* and their usefulness for parasite detection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 350-357.

Bloch-Michel, E., J. Couvreur, et al. (1992). Toxoplasmose oculaire. Encycl. Med. Chir. 21230B<sup>18</sup>.

Bloomfield, H. M. and J. S. Remington (1970). Comparison of three strains of *T. gondii* by polyacrylamide gel electrophoresis. Trop. Geogr. Med. 22: 367-370.

Bonhomme, A., F. Boulanger, et al. (1990). *Toxoplasma gondii*: immunochemistry of four antigens with monoclonal antibodies. Exp. Parasitol. 71: 439-451.

Boothroyd, J. C. and L. D. Sibley (1993). Population biology of *Toxoplasma gondii*, in "48th forum in immunology". Res. Immunol. 144: 14-16.

Breathnach, R. and P. Chambon (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50: 349-383.

Brown, C. R. and R. Mc Leod (1990). Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. J. Immunol. 145: 3438-3441.

Budzko, D. B., L. Tyler, et al. (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: 959-961.

Büllow, R. and J. C. Boothroyd (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with P30 antigen in liposomes. J. Immunol. 147: 3496-3500.

Burg, J. L., C. M. Grover, et al. (1989). Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27: 1787-1792.

Burg, J. L., D. Perelman, et al. (1988). Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 141: 3584-3591.

Candolfi, E., B. Arveiller, et al. (1988). Structure du génome de *Toxoplasma gondii* : premiers résultats. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 6: 27-32.

Capron, A. and J. P. Dessaint (1988). Vaccination against parasitic diseases : some alternative concepts for the definition of protective antigens. Ann. Inst. Past. /Immunol. 139: 109-117.

Carrazana, E. J., E. J. Rossitch, et al. (1989). Cerebral toxoplasmosis in the acquired immune deficiency syndrome. Clin. Neurol. Neurosurg. 91: 291-301.

Catterall, J. R., S. D. Sharma, et al. (1986). Oxygen-independent killing by alveolar macrophages. J. Exp. Med. 163: 1113-1131.

Cazenave, J., M. H. Bessières, et al. (1990). Détection de toxoplasmes par amplification d'ADN. Un exemple d'application des techniques de biologie moléculaire au diagnostic parasitaire. Rev. Franc. Lab. 209: 118-126.

Cederqvist, L. L., MD. Facog, et al. (1977). Fetal immune response following congenital toxoplasmosis. Obst. Gynecol. 50: 200-204.

Cesbron, J. Y., A. Capron, et al. (1985). Use of a monoclonal antibody in a doublesandwitch ELISA for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (P30). J. Immunol. Meth. 83: 151-158.

Cesbron-Delauw, M. F., B. Guy, et al. (1989). Molecular characterization of a 23 K major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7537-7541.

Chang, H. R., G. E. Grau, et al. (1990). Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. Immunol. 69: 33-37.

Chang, H. R. and J. C. F. Pechere (1988). Activity of spiramycin against *Toxoplasma gondii* in vitro, in experimental infections and in human infection. J. Antimicrobiol. Chem. 22-Suppl. B: 87-92.

Chang, H. R. and J. C. F. Pechere (1988). In vitro effects of four macrolides (Roxithromycin, spiramycin, azithromycin, [CP-62,993], and A-56268) on *Toxoplasma gondii*. J. Antimicrob. Agents Chem. 32: 524-529.

Chang, H. R. and J. C. F. Pechere (1989). Macrophage oxydative metabolism and intracellular *Toxoplasma gondii*. Microb. Pathog. 7: 37-44.

Chardès, T., I. Bourguin, et al. (1990). Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of antigens. Infect. Immun. 58: 1240-1246.

Charif, H., F. Darcy, et al. (1990). *Toxoplasma gondii*: characterization and localization of antigens secreted from tachyzoites. Exp. parasitol. 71: 114-124.

Chobotar, B. and E. Scholtyseck (1982). Ultrastructure. The biology of the *Coccidia*. Ed. Peter L. Long, University Park Press, Baltimore. p. 101.

Chodosh, L. A., J. Olesen, et al. (1988). A yeast and a human CCAAT-binding protein have heterologous subunits that are functionally interchangeable. Cell 53: 25-35.

Cornelissen, A. W. C. A., J. P. Overdulve, et al. (1984). Determination of nuclear DNA of five *Eucoccidian* parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii, Sarcocystis cruzi, Eimeria tenella, E. acervulina* and *Plasmodium berghei,* with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii.* Parasitol. 88: 531-553.

Couvreur, G., A. Sadak, et al. (1988). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. 97: 1-10.

Cristina, N., M. F. Liaud, et al. (1991). A family of repeated DNA sequences in *Toxoplasma gondii*: cloning, sequence analysis, and use in strain characterization. Exp. Parasitol. 73: 73-81.

Cristina, N., B. Oury, et al. (1991). Restriction fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. Parasitol. Res. 77: 266-268.

Curotto de Lafaille, M. A., A. Laban, et al. (1992). Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. P. N. A. S. USA 89: 2703-2707.

Darcy, F., H. Charif, et al. (1990). Identification and biochemical characterization of antigens of tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* with cross-reactive epitopes. Parasitol. Res. 76: 473-478.

Darcy, F., D. Deslée, et al. (1988). Induction of a protective antibody-dependant response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 10: 553-567.

Darcy, F., F. Fourdrinier, et al. (1992). Diagnostic value of specific IgA antibodies in AIDS patients with *Toxoplasma* infection: a bicentric evaluation. Immunol. Letters 30: 345-348.

Darcy, F., P. Maes, et al. (1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxopasma* gondii P30 antigen. J. Immunol. 149: 3636-3641.

Darcy, F., G. Torpier, et al. (1992). Diagnostic et prévention de la toxoplasmose : nouvelles approches et perspectives. Gynécol. Int. 1: 48-57.

Darcy, F. and L. Zenner (1993). Experimental models of toxoplasmosis, in "48th forum in immunology". Res. Immunol. 144: 16-23.

Dardé, M. L., B. Bouteille, et al. (1988). Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrylamide gels. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39: 551-558.

Dardé, M. L., B. Bouteille, et al. (1990). Comparison of isoenzyme profiles of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced under different culture conditions. Parasitol. Res. 76: 367-371.

Dardé, M. L., B. Bouteille, et al. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. J. Parasitol. 78: 786-794.

De Carvalho, L. and W. De Souza (1989). Cytochemical localization of plasma embrane markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages. J. Protozool. 36: 164-170.

De Carvalho, L. and W. De Souza (1990). Internalization of surface anionic sites and phagosome-lysosome fusion during interaction of *Toxoplasma gondii* with macrophages. Eur. J. Cell Biol. 51: 211-219.

•

Deblock, S. and J. Biguet (1971). Morphologie et biologie du Toxoplasme. Rev. Med. 8: 413-420.

Decoster, A., F. Darcy, et al. (1988). Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplamosis: identification of markers of acute and chronic infection. Clin. Exp. Immunol. 73: 376-382.

Decoster, A., B. Slizewicz, et al. (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: 2291-2295.

Denkers, E. Y., A. Sher, et al. (1993). CD8+ T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition, in "48th forum in immunology". Res. Immunol. 144: 51-57.

Derouin, F., C. Sarfati, et al. (1989). Laboratory diagnosis of pulmonary toxoplasmosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J. Clin. Microbiol. 27: 1661-1663.

Dubey, J. P. and J. K. Frenkel (1973). Experimental *Toxoplasma* infection in mice with strains producing oocysts. J. Parasitol. 59: 505-512.

Dubremetz, J. F., C. Rodriguez, et al. (1985). *Toxplasma gondii*: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. Exp. parasitol. 59: 24-32.

Dubremetz, J. F., A. Sadak, et al. (1987). Characterization of a 42 kDa rhoptry antigen of *Toxoplasma gondii*. Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoal infections. NATO ASI Series. 365-369.

Dubremetz, J. F. and G. Torpier (1978). Freeze fracture study of the pellicle of an *Eimerian* sporozoite (*Protozoa, Coccidia*). J. Ultrastruc. Res. 62: 94-109.

Dumon, H., P. Herin, et al. (1990). Etude critique de différentes méthodes de mise en évidence de *Pneumocystis carinii* et de *Toxoplasma gondii* dans le lavage bronchoalvéolaire au cours du SIDA, bilan de deux ans. Bull. Soc. Fr. Parasitol. 8: 243-246. Duquesne, V., C. Auriault, et al. (1990). Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen specific helper T cells. Infect. Immun. 58: 2120-2126.

Dynan, W. S., J. D. Saffer, et al. (1985). Transcription factor SP1 recognizes promoter sequence from the monkey genome that are similar to the simian virus 40 promoter. P. N. A. S. USA 82: 4915-4919.

Dynan, W. S., S. Sazer, et al. (1986). Transcription factor SP1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. Nature 319: 246-248.

Dynan, W. S. and R. Tjian (1983). Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymérase II. Cell 32: 669-680.

Edman, P. and G. Begg (1967). A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1: 80-91.

Endo, T., H. Tokuda, et al. (1987). Effect of extracellular potassium on acid release and motility initiation in *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 34: 291-295.

Endo, T., K. Yagita, et al. (1988). Detection and localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res. 75: 102-106.

Fitzgerald, M. and T. Shenk (1981). The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. Cell 24: 251-260.

Fortier, B. and F. Ajana (1992). La toxoplasmose congénitale : dépistage et traitement. Méd. Mal. Infect. 22: 838-847.

Foussard, F., Y. Gallois, et al. (1990). Isolation of the pellicle of *Toxoplasma gondii* (*Protozoa, Coccidia*): characterization by electron microscopy and protein composition. Parasitol. Res. 76: 563-565.

Foussard, F., M. A. Leriche, et al. (1991). Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. Parasitol. 102: 367-370.

Frenkel, J. K. (1967). Adoptive immunity to intracellular infection. J. Immunol. 98: 1309-1319.

Frenkel, J. K., J. P. Dubey, et al. (1969). *Toxoplasma gondii*: fecal forms separated from eggs of the Nematode *Toxocara cati*. Science : 432-433.

Frenkel, J. K., J. P. Dubey, et al. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 167: 893-896.

Frenkel, J. K., B. M. Nelson, et al. (1975). Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. Hum. Pathol. 6: 97-111.

Fuhrman, S. A. and K. A. Joiner (1989). *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. J. Immunol. 142: 940-947.

Gaboriaud, C., V. Bissery, et al. (1987). Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. FEBS Letter 224: 149-155.

Gallois, Y., F. Foussard, et al. (1988). Membrane fluidity of *Toxoplama gondii*: a fluorescence polarization study. Biol. of the Cell 62: 11-15.

Garcher, C., A. Bron, et al. (1990). Toxoplasmose oculaire et SIDA. J. Fr. Ophtalmo. 13: 69-73.

Gazzinelli, R. T., F. T. Hakim, et al. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J. Immunity 146: 286-292.

Gazzinelli, R. T., J. W. Hartley, et al. (1992). Opportunistic infections and retrovirus-induced immunodeficiency: studies of acute and chronic infections with *Toxoplasma gondii* in mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. Infect. Immun. 60: 4394-4401.

Godard, I., F. Darcy, et al. (1990). Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice : kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulins A antibodies. Infect. Immun. 58: 2446-2451.

Gray, F., R. Gherardi, et al. (1989). Diffuse "encephalitic" cerebral toxoplasmosis in AIDS. Report of four cases. J. Neurol. 236: 273-277.

Gross, U., W. A. Müller, et al. (1991). Identification of a virulence-associated antigen of *Toxoplasma gondii* by use of a mouse monoclonal antibody. Infect. Immun. 59: 4511-4516.

Grover, C. H., P. Thulliez, et al. (1990). Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using Polymerase Chain Reaction and amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. 28: 2297-2301.

Guay, J. M., A. Huot, et al. (1992). Physical and genetic mapping of cloned ribosomal DNA from *Toxoplasma gondii*: primary and secondary structue of the 5S gene. Gene 114: 165-171.

Hakim, F. T., R. T. Gazzinelli, et al. (1991). CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host. J. Immunol. 147: 2310-2316.

Handman, E., J. W. Goding, et al. (1980). Detection and characterization of membrane antigens of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 124: 2578-2583.

Handman, E. and J. S. Remington (1980). Serological and immunological characterization of monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 40: 579-588.

Hassl, A. and H. Aspöck (1990). Detection and characterization of circulating antigens in acute experimental infections of mice with four different strains of *Toxoplasma gondii*. Zbl. Bakt. 272: 526-534.

Hauser, W. E. and X. Van Tsai (1986). Acute *Toxoplasma* infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *T. gondii in vitro*. J. Immunol. 136: 313-319.

Hauser, W. E. J., S. D. Sharma, et al. (1982). Natural killer cells induced by acute and chronic *Toxoplasma infection*. Cell. Immunol. 69: 330-346.

Herskowitz, S., S. E. Siegel, et al. (1989). Spinal cord toxoplasmosis in AIDS. Neurol. 39: 1552-1553.

Holliman, R. E. (1988). Toxoplasmosis and the acquired immune deficiency syndrome. J. Infect. 16: 121-128. Hughes, H. P. A. (1981). Characterization of the circulating antigens of *Toxoplasma* gondii. Immunol. Letters 3: 99-102.

Hughes, H. P. A. (1988). Oxydative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. Parasitol. Today 4: 340-347.

Hughes, H. P. A., R. J. Boik, et al. (1989). Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing. J. Parasitol. 75: 489-497.

Hughes, H. P. A., C. A. Connely, et al. (1984). Antigen specific lymphocyte transformation induced by secreted antigens from *Toxoplasma gondii*. Clin. Exp. Immunol. 58: 539-547.

Hughes, H. P. A. and F. Van Knapen (1982). Characterization of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. Intern. J. Parasitol. 12: 433-437.

Hunter, C. A., C. W. Roberts, et al. (1992). Detection of cytokine mRNAs in the brain of mice infected with toxoplasmic encephalitis. Parasite Immunol. 14: 505-413. Israelski, D. M., F. G. Araujo, et al. (1989). Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. J. Immunol. 142: 954-958.

Israelski, D. M. and J. S. Remington (1990). Activity of gamma-interferon in combination with pyrimethamine or clindamycin in treatment of murine toxoplasmosis. Eur. J. Microbiol. Infect. Dis. 9: 358-360.

Jacobs, L. and M. N. Lunde (1957). A hemagglutination test for toxoplasmosis. J. Parasitol. 43: 308-314.

Johnson, A. M. (1986). Characterization and in vitro translation of *Toxoplasma gondii* ribonucleic acid. Mol. Biochem. Parasitol. 18: 313-320.

Johnson, A. M. (1987). *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* : DNA comparison using cloned rRNA gene probes. Exp. Parasitol. 63: 272-278.

۰.

Johnson, A. M. (1990). Comparison of dinucleotide frequency and codon usage in *Toxoplasma* and *Plasmodium*: evolutionary implications. J. Mol. Evol. 30: 383-387.

Johnson, A. M. and P. R. Baverstock (1989). Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. Parasitol. Today 5: 102-105.

Johnson, A. M., J. P. Dubey, et al. (1986). Purification and characterization of *Toxoplasma gondii* tachyzoite DNA. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc. 64: 351-355.

Johnson, A. M. and S. Illana (1991). Cloning of *Toxoplasma gondii* gene fragments encoding diagnostic antigens. Gene 99: 127-132.

Johnson, A. M., S. Illana, et al. (1989). Cloning, expression and nucleotide sequence of the gene fragment encoding an antigenic portion of the nucleoside triphosphate hydrolase of *Toxoplasma gondii*. Gene 85: 215-220.

Johnson, A. M., P. J. Mc Donald, et al. (1981). Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of *Toxoplasma gondii*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 100: 934-943.

Johnson, A. M., P. J. Mc Donald, et al. (1983). Monoclonal antibodies to *Toxoplasma gondii* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. J. Protozool. 30: 351-356.

Johnson, L. L. (1992). SCID mouse models of acute and relapsing chronic *Toxoplasma* gondii infections. Infect. Immun. 60: 3719-3724.

Joiner, K. A. (1991). Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. Parasitol. Today 7: 226-227.

Joiner, K. A., S. A. Fuhrman, et al. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of parasitophorous vacuole in Fc receptor-transfected fibroblasts. Science 249: 641-646.

Jones, K. A., J. T. Kadonaga, et al. (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, SP1. Science 232: 755-759.

. .

Jones, K. A. and R. Tjian (1985). SP1 binds to promoter sequences and activates herpes simplex virus "immediate-early" gene transcription in vitro. Nature 317: 179-182.

Jones, T. C., S. Yeh, et al. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I - Mechanism of entry and intracellular fate of the parasite. J. Exp. Med. 136: 1157-1172.

Jones, T. C., S. Yeh, et al. (1972). The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. II- The absence of lysosomal fusion with phagocytic vacuoles containing living parasites. J. Exp. Med. 136: 1173-1194.

Joyner, L. P. (1982). Host and site specificity. The biology of the *Coccidia*. University Park Press, Ed. Peter L. Long, Baltimore. p. 35.

Kahn, I. A., K. H. Ely, et al. (1991). A purified parasite antigen (P30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. J. Immunol. 147: 3501-3506.

Kasper, L. H. (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 9: 433-445.

Kasper, L. H. (1989). Identification of stage specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 57: 668-672.

Kasper, L. H., B. S. Bradley, et al. (1984). Identification of stage-specific sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies. J. Immunol. 132: 443-449.

Kasper, L. H., J. H. Crabb, et al. (1982). Isolation and characterization of a monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 129: 1694-1699.

Kasper, L. H. and I. A. Khan (1993). Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection, in "48th forum in immunology. Res. Immunol. 144: 45-48.

Kasper, L. H., I. A. Khan, et al. (1992). Antigen-specific (p30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii*-infected peritoneal macrophages. J. Immunol. 148: 1493-1498.

Kasper, L. H. and P. L. Ware (1985). Recognition and characterization of stagespecific oocysts/sporozoite antigens of *Toxoplasma gondii* by human antisera. J. Clin. Invest. 75: 1570-1577.

Kaufman, H. E., M. L. Melton, et al. (1958). Strains differences of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 189-190.

Kimata, I. and K. Tanabe (1987). Secretion by *Toxoplasma gondii* of an antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. J. Cell Science 88: 231-239.

King, C. A. (1988). Cell motility of sporozoan protozoa. Parasitol. Today 4: 315-318.

Kozak, M. (1989). The scanning model for translation: an update. J. Cell Biol. 108: 229-241.

Krahenbuhl, J. L., J. D. Gaines, et al. (1972). Lymphocyte transformation in human toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 125: 283-288.

Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. J. Mol. Biol. 157: 105-132.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Lemesle-Varloot, L., B. Henrissat, et al. (1990). Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. Bioch. 72: 555-574.

Leport, C. and J. S. Remington (1992). Toxoplasmose au cours du SIDA. La Presse Med. 21: 1165-1171.

Leriche, M. A. and J. F. Dubremetz (1990). Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. Parasitol. Res. 76: 559-562.

Leriche, M. A. and J. F. Dubremetz (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: 241-248.

Levine, L. D. (1982). Taxonomy and life cycles of *Coccidia*. The Biology of the *Coccidia*. Ed. Peter L. Long, University Park Press, Baltimore. p. 2.

Levine, N. D., J. O. Corliss, et al. (1980). A newly revised classification of the *protozoa*. J. Protozool. 27: 37-58.

Lindberg, R. E. and J. K. Frenkel (1977). Toxoplasmosis in nude mice. J. Parasitol. 63: 219-221.

Linder, E., C. Thors, et al. (1992). Generation of antibodies against *Toxoplasma gondii* antigen associated with dense granules and the parasitophorous vacuole of the host cell. Parasitol. Res. 78: 175-178.

Luft, B. J., G. Kansas, et al. (1984). Functional and quantitative alteriations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplamosis. J. Infect. Dis. 150: 761-767.

Luft, B. J. and J. S. Remington (1984). Effect of pregnancy on augmentation of natural killer cell activity by *Corynebacterium parvum* and *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 132: 2375-2380.

Luft, B. J. and J. S. Remington (1988). AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. J. Infect. Dis. 157: 1-6.

Lycke, E., K. Carlberg, et al. (1975). Interactions between *Toxoplasma gondii* and its host cells: function of the penetration-enhancing-factor of *Toxoplasma*. Infect. Immun. 11: 853-861.

Lycke, E. and R. Norrby (1966). Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of *Toxoplasma* parasites into cultures host-cells. Brit. J. Exp. Pathol. 47: 248-256.

Makioka, A. and A. Kobayashi (1991). Toxoplasmicidal activity of macrophages activated by recombinant major surface antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 59: 2851-2852.

Maniatis, T., G. F. T. Fritsch, et al. (1990). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring harbor Laboratory. p. 106 : 18-56 ; p. 108 et 115 : 1-25 ; p. 114 : 1-76 et 2-69 ; p. 115 : 1-42 ; p. 116 : 9-38 et 7-34 ; p.118 : 4-29.

Mauras, G., M. Dodeur, et al. (1980). Partial resolution of the sugar content of *Toxoplasma gondii* membrane. Biochem. Biophys. Res. Communic. 97: 906-912.

Mc Cabe, R. E., B. J. Luft, et al. (1984). Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 150: 961-962.

Mc Leod, R., M. O. Beem, et al. (1985). Lymphocyte anergy specific to *Toxoplasma gondii* antigens in a baby with congenital toxoplasmosis. J. Clin. Lab. Immunol. 17: 149-153.

Mc Leod, R., J. K. Frenkel, et al. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital *Toxoplasma* challenge. J. Immunol. 140: 1632-1637.

Mercier, C., L. Lecordier, et al. (1993). Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. (in press).

Mévelec, M.-N., T. Chardès, et al. (1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. Mol. Biochem. Parasitol. 56: 227-238.

Nagel, S. D. and J. C. Boothroyd (1988). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins of *Toxoplasma gondii* are encoded by single copy genes containing multiple introns. Mol. Biochem. Parasitol. 29: 261-273.

Nagel, S. D. and J. C. Boothroyd (1989). The major surface antigen P30 of *Toxoplasma* gondii is anchored by a glycolipid. J. Biol. Chem. 264: 5569-5574.

Nichols, B. A. and M. L. Chiappino (1987). Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 34: 217-226.

Nichols, B. A., M. L. Chiappino, et al. (1983). Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. J. Ultrastruct Res. 83: 85-98.

Nichols, B. A. and G. R. O'Connor (1981). Penetration of mouse peritoneal macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii*. New evidence for active invasion and phagocytosis. Lab. Invest. 44: 324-335.

Nicolle, C. and L. Manceaux (1908). Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. C.R. Acad. Sci. 147: 763-766.

Nicolle, C. and L. Manceaux (1909). Sur un protozoaire nouveau du gondi (*Toxoplasma gondii* N. Gen.). Arch. Inst. Past. Tunis 1: 97-103.

Ossorio, P. N., J. D. Schwartzman, et al. (1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host-cell penetration has unusual charge asymetry. Mol. Biochem. Parasitol. 50: 1-16.

Ossorio, P. N., L. D. Sibley, et al. (1991). Mitochondrial-like DNA sequences flanked by direct and inverted repeats in the nuclear genome of *Toxoplasma gondii*. J. Mol. Biol. 222: 525-536.

Parker, S. J., C. W. Roberts, et al. (1991). CD8+ T cells are the major lymphocytes subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin. Exp. Immunol. 84: 207-212.

Parker, S. J., F. M. Smith, et al. (1991). Murine immune responses to recombinant *Toxoplasma gondii* antigens. J. Parasitol. 77: 402-409.

Parmley, S. F., F. D. Goebel, et al. (1992). Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by Polymerase Chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 3000-3002.

Parmley, S. F., G. D. Sgarlato, et al. (1992). Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen-P22 of *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Microbiol. 30: 1127-1133.

Parmley, S. F., G. D. Sgarlato, et al. (1993). Genomic and corrected cDNA sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 57: 161-166.

Pavia, C. S. (1987). Thymocyte-dependent immunity to toxoplasmosis in the normal and immunocompromised guinea-pig host. Parasite Immunol. 9: 205-218.

Pelloux, H., B. F. F. Chumpitazi, et al. (1992). Sera of patients with high titers of immunoglobulin G against *Toxoplasma gondii* induce secretion of tumor necrosis factor alpha by human monocytes. Infection and Immun. 60: 2672-2676.

Pfefferkorn, E. R. (1987). The mechanism by which interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts. Host-parasite and molecular interations in protozoal infections. NATO ASI Series, Vol. H11, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 345-354.

Pfefferkorn, E. R., S. E. Borotz, et al. (1992). *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to sulfonamides. Exp. Parasitol. 74: 261-270.

Pfefferkorn, E. R., M. E. Eckel, et al. (1989). *Toxoplasma gondii*: the biochemical basis of resistance to Emimycin. Exp. Parasitol. 69: 129-139.

Pfefferkorn, E. R., M. E. Eckel, et al. (1988). *Toxoplasma gondii: In vivo* and *in vitro* studies of a mutant resistant to Arprinocid-N-oxide. Exp. Parasitol. 65: 282-289.

Pfefferkorn, E. R. and L. C. Pfefferkorn (1976). *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. Exp. Parasitol. 39: 365-376.

Pfefferkorn, E. R. and L. C. Pfefferkorn (1977). Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. J. Protozool. 24: 449-453.

Pfefferkorn, E. R. and L. C. Pfefferkorn (1977). *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to 5-Fluorodeoxyuridine. Exp. Parasitol. 42: 44-55.

Pinon, J. M., D. Toubas, et al. (1990). Detection of specific immunoglobulin E in patients with toxoplasmosis. J. Clin. Microbiol. 28: 1739-1743.

Pomeroy, C., S. Kline, et al. (1989). Reactivation of *Toxoplasma gondii* by Cytomegalovirus disease in mice: antimicrobial activities of macrophages. J. Infect. Dis. 160: 305-311.

· • .

Porchet, E. and G. Torpier (1977). Etude du germe infectieux de *Sarcocystis tenella* et *Toxoplasma gondii* par la technique de cryodécapage. Z. Parasitenk. 54: 101-124.

Porchet-Hennéré, E. and G. Nicolas (1983). Are rhoptries of *Coccidia* really extrusomes ? J. Ultrastruct. Res. 84: 194-203.

Porchet-Hennéré, E. and G. Torpier (1983). Relations entre *Toxoplasma* et sa cellulehôte. Protistologica TXIX: 357-370.

Potasman, I., L. Resnick, et al. (1988). Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrom (AIDS). Ann. Int. Med. 108: 49-51.

Prince, J. B., K. L. Auer, et al. (1990). Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 43: 97-106.

Proudfoot, N. J. and G. G. Brownlee (1976). 3' non coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. Nature 263: 211-214.

Rahmah, N. and A. Khairul Anuar (1992). Demonstration of antigenic similarities and variations in excretory/secretory antigens of *Toxoplasma gondii*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 187: 294-298.

Rao, J. K. M. and P. Argos (1986). A conformational preference parameter to predict helices in iontegral membrane proteins. Biochim. Biophys. Acta 869: 197-214.

Remington, J. S., M. M. Bloomfield, et al. (1970). The RNA of *Toxoplasma gondii*. PSEBM 133: 623-626.

Ridel, P. R., C. Auriault, et al. (1988). Protective role of IgE in immunocompromised rat toxoplasmosis. J. Immunol. 141: 978-983.

Roditi, I., D. Dobbelaere, et al. (1989). Expression of *Trypanosoma brucei* procyclin as a fusion protein in *Escherichia coli*. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 35-44.

Rodriguez, C., D. Afchain, et al. (1985). Major surface protein of *Toxoplasma gondii* (P30) contains an unique immunodominant region with repetitive epitopes. Eur. J. Immunol. 15: 747-749.

Rondanelli, E. G., G. Senaldi, et al. (1986). Dynamic and ultrastructural studies of in vitro interaction between *Toxoplasma gondii* and cultured cell lines. I-Adhesion and cellular penetration. Boll. Ist. Steroter. Milan 65: 194-203.

Ryning, F. W. and J. S. Remington (1977). Effect of alveolar macrophages on *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 18: 746-753.

Saavedra, R., F. De Meuter, et al. (1991). Human T cell clone identifies a potentially protective 54 kDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. J. Immunol. 147: 1975-1982.

Sabin, A. B. (1941). Toxoplasmic encephalitis in children. J. Am. Med. Assoc. 116: 801-807.

Sabin, A. B. (1949). Complement fixation test in toxoplasmosis and persistence of the antibody in human beings. Pediatr. 4: 443-453.

Sadak, A., Z. Taghy, et al. (1988). Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. : 203-211.

Saffer, L. D., S. A. Long Krug, et al. (1989). The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 145-149.

Saffer, L. D., O. Mercereau-Puijalon, et al. (1992). Localization of *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and aftern host cell penetration. J. Protozool. 39: 526-530.

Saffer, L. D. and J. D. Schwartzman (1991). A soluble phospholipase of *Toxoplasma* gondii associated with host cell penetration. J. Protozool. 38: 454-460.

Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Santoro, F., D. Afchain, et al. (1985). Serodiagnosis of *Toxoplasma* infection using a purified parasite protein (P30). Clin. Exp. Immunol. 62: 262-269.

.

Santoro, F., H. Charif, et al. (1986). The immunodominant epitope of the major membrane tachyzoite protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol. 8: 631-639.

Savva, D., J. C. Morris, et al. (1990). Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii*. J. Med. Microbiol. 32: 25-31.

Schreiber, R. D. and H. A. Feldman (1980). Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. J. Infect. Dis. 141: 366-369.

Schwartzman, J. D., S. L. Gonias, et al. (1990). Murine gamma interferon fails to inhibit *Toxoplasma gondii* growth in murine fibroblasts. Infect. Immun. 58: 833-834.

Schwartzman, J. D. and E. C. Krug (1989). *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. Exp. Parasitol. 68: 74-82.

Schwartzman, J. D., E. C. Krug, et al. (1985). Detection of the microtubule cytoskeleton of the coccidian *Toxoplasma gondii* and the hemoflagellate *Leishmania donovani* by monoclonal antibodies specific for  $\beta$ -tubulin. J. Protozool. 32: 747-749.

Schwartzman, J. D. and E. R. Pfefferkorn (1983). Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the coccidian, *Toxoplasma gondii*. J. Protozool. 30: 657-661.

Sethi, K. K., A. Rahman, et al. (1977). Search for the presence of lectin-binding sites of *Toxoplasma gondii*. J. Parasitol. 63: 1076-1080.

Sharma, S. D., F. G. Araujo, et al. (1984). *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with Toxoplasma gondii. J. Immunol. 133: 2818-2820.

Sharma, S. D., J. Verhoef, et al. (1984). Enhancement of human natural killer cell activity by subcellular components of *Toxoplasma gondii*. Cell. Immunol. 86: 317-326.

Sheffield, H. G. and M. J. Melton (1970). *Toxoplasma gondii*: the oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. Science 167: 892-893.

Sher, A. and R. L. Coffman (1992). Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. Annu. Rev. Immunol. 10: 385-409.

Sher, A., R. Y. Gazzinelli, et al. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. Immunological Reviews 127: 183-204.

Shine, J. and L. Dalgarno (1974). The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. P. N. A. S. USA 71: 1342-1346.

Sibley, L. D. (1987). Modification of host cell phagocytic compartments by intracellular *Toxoplasma gondii*. Host-parasite cellular and molecular interactions in protozoan infections. NATO ASI series H11, Springer-verlag Berlin Heidelberg.

Sibley, L. D., L. B. Adams, et al. (1991). Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers antitoxoplasmal activity of IFN- $\chi$  primed macrophages. J. Immunol. 147: 2340-2345.

Sibley, L. D., L. B. Adams, et al. (1993). Macrophage interactions in toxoplasmosis, in "48th forum in immunology". Res. Immunol. 144: 38-40.

Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). Construction of a molecular karyotype for *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 51: 291-300.

Sibley, L. D. and J. C. Boothroyd (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. Nature 359: 82-85.

Sibley, L. D. and J. L. Krahenbuhl (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: 81-87.

Sibley, L. D., R. Lawson, et al. (1986). Superoxyde dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. Mol. Biochem. Parasitol. 19: 83-87.

Sibley, L. D., E. R. Pfefferkorn, et al. (1991). Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Today 7: 327-328.

Sibley, L. D. and S. D. Sharma (1987). Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. Infect. Immun. 55: 2137-2141.

Sibley, L. D., E. Weidner, et al. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. Nature 315: 416-419.

Sklenar, I., T. C. Jones, et al. (1986). Association of symptomatic human infection with *Toxoplasma gondii* with imbalance of monocytes and antigen-specific T cell subsets. J. Infect. Dis. 153: 315-324.

Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. Gene 67: 31-40.

Splendore, A. (1909). Sur un nouveau parasite du lapin. Deuxième note préliminaire. Bull. Soc. Path. Exot. 2: 462-465.

Stepick-Biek, P., P. Thulliez, et al. (1990). IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. J. Infect. Dis. 162: 270-273.

Suggs, M., K. W. Walls, et al. (1968). Comparative antigenic study of *Besnoitia jellisoni*, *B. panamenis* and five *Toxoplasma gondii* isolates. J. Immunol. 101: 166-175.

Suzuki, Y., K. Joh, et al. (1991). A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice. Immunol. 74: 732-739.

Suzuki, Y., M. A. Orellama, et al. (1988). Interferon  $\chi$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 240: 516-518.

Suzuki, Y. and J. S. Remington (1990). The effect of anti-IFN- $\chi$  antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. J. Immunol. 144: 1954-1956.

Suzuki, Y. and J. S. Remington (1993). Toxoplasmic encephalitis in AIDS patients and experimental models for study of the disease and its treatment, in "48th forum in immunology". Res. Immunol. 144: 66-67.

Taylor, D. W., C. B. Evans, et al. (1990). Identification of an apically-located antigen that is converted in sporozoan infection. J. Protozool. 37: 540-545.

Tixier, A., A. Goullier-Fleuret, et al. (1990). Toxoplasmose et SIDA : étude sérologique et recherche d'antigène circulant. A propos de 6 cas de toxoplasmose cérébrale chez les sidéens. Bull. Soc. Fr. Paras. 8: 239-242.

Tomavo, S., J. F. Dubremetz, et al. (1992). Biosynthesis of glycolipid precursor(s) for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in a *Toxoplasma gondii* cell-free system. J. Biol. Chem. 267: 21446-21458.

Tomavo, S., J. F. Dubremetz, et al. (1992). A family of glycolipids from *Toxoplasma* gondii. Identification of candidate glycolipid precursor(s) for *Toxoplasma* gondii glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. J. Biol. Chem. 267: 11721-11728.

Tomavo, S., B. Fortier, et al. (1991). Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 59: 3750-3753.

Tomavo, S., A. Martinage, et al. (1992). Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Parasitol. Res. 78: 541-544.

Tomavo, S., R. T. Schwartz, et al. (1989). Evidence for glycosyl-phosphatidyl inositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. Mol. Cell. Biol. 9: 4576-4580.

Torpier, G., H. Charif, et al. (1993). *Toxoplasma gondii*: differential location of antigens secreted from encysted bradyzoites. Exp. Parasitol. (in press).

Torpier, G., M. L. Dardé, et al. (1991). *Toxolasma gondii*: membrane structure differences between zoites demonstrated by freeze fracture analysis. Exp. Parasitol. 72: 99-102.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. P. N. A. S. USA 76: 4350-4354.

Vandekerckhove, J., G. Bauw, et al. (1985). Protein blotting on polybrene-coated glass fiber sheets. A basis for acid hydrolysis and gas-phase sequencing of picomoles

· • .

quantities of protein previously separated on sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 152: 9-19.

Vivier, E. and A. Petitprez (1969). Le complexe membranaire superficiel et son évolution lors de l'élaboration des individus-fils chez *Toxoplasma gondii*. J. Cell Biol. 43: 329-342.

Vivier, E. and A. Petitprez (1972). Données ultrastructurales complémentaires morphologiques et cytochimiques sur *Toxoplasma gondii*. Protist. 8: 199-221.

Von Heijne, G. (1986). A new method for predicting signal sequence cleavage sites. Nucl. Acid Res. 14: 4683-4690.

Waldeland, H. and J. K. Frenkel (1983). Live and killed vaccines against toxoplasmosis in mice. J. Parasitol. 69: 60-65.

Wanke, C., C. U. Tuazon, et al. (1987). *Toxoplasma* encephalitis in patients with acqired immune defisciency syndrome: diagnosis and response to therapy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 36: 509-516.

Ware, P. L. and L. H. Kasper (1987). Strain-specific antigens of *Toxolasma gondii*. Infect. Immun. 55: 778-783.

Weiss, L. M., S. A. Udem, et al. (1991). Sensitive and specific detection of Toxoplasma DNA in an experimental murine model: use of *Toxoplasma gondii*-specific cDNA and the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 163: 180-186.

Werk, R. (1985). How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? Rev. Infect. Dis. 7: 449-457.

Werk, R., R. Dunker, et al. (1984). Polycationic peptides: a possible model for the penetration-enhancing factor in the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. J. Gen. Microbiol. 130: 927-933.

Woodison, G. and J. E. Smith (1990). Identification of the dominant cyst antigens of *Toxoplasma gondii*. Parasitol. 100: 389-392.
Yano, A., F. Aosai, et al. (1989). Antigen presentation by *Toxoplasma gondii*-infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. J. Parasitol. 75: 411-416.

Yasuda, T., K. Yagita, et al. (1988). Immunocytochemical localization of actin in *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res. 75: 107-113.

Zenner, L., F. Darcy, et al. (1993). A model of congenital toxoplasmosis in the rat: rate of transmission to fetus after infection with three *T. gondii* strains and protective effects of a previous infection. Infect. Immun. 61 (in press).

.

# SOMMAIRE

.

· .

Abréviations	p.	7
INTRODUCTION		
I - GENERALITES	p.	9
1-CYCLE EVOLUTIF DE TOXOPLASMA GONDII	p.	10
2-LA TOXOPLASMOSE	p.	12
2.1 La maladie Immunodéficience Toxoplasmose congénitale	p.	12
<b>2.2 Le diagnostic</b> Diagnostic sérologique Détection directe du parasite : de la culture de parasites à la détection par PCR	p.	14
2.3-Les traitements	p.	17
II - LE TACHYZOITE	p.	18
1-ULTRASTRUCTURE	p.	18
1.1-Membranes	р.	18
1.2-Cytosquelette et mouvement	p.	18
1.3-Invasion de la cellule-hôte	p.	19
2-DIFFERENCIATION DES STADES	p.	21

3-GENETIQUE DU TOXOPLASME	p. 24
3.1-L'ADN	p. 24
3.2-L'ARN	p. 25
3.3-Mutants	p. 24
3.4-Souches de Toxoplasme	
III-RELATION HOTE-PARASITE	p. 29
1-L'IMMUNOLOGIE DE LA TOXOPLASMOSE	p. 29
1.1-Réponse humorale	p. 29
1.2 Pénanaa pollulaira at avtakinaa	n 20
1.2-nepolise centiaire et cytoknies	p. 30
2-ANTIGENES CIBLES	p. 35
2.1-Antigènes de surface	p. 35
2.2-Antigènes de sécrétion	p. 38
Les rhoptries	p. 38
Les granules denses	p. 39

But du travail	р.	44
----------------	----	----

## RESULTATS

#### I - CARACTERISATION DE L'ANTIGENE P21 NATIF

A-Purification de l'antigène P21 natif par RP-HPLC	р.	47
B-Obtention du sérum anti-P21	p.	47
C-Microséquençage de l'antigène P21	p.	50

#### II - CARACTERISATION DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE P 2 1

A-Isolement et caractérisation des clones d'ADNc	р.	52
1-Obtention des clones d'ADNc et classification	р.	52
2-Caractérisation des familles de clones	р.	52
3-Production de sérums anti-protéines recombinantes	р.	58

#### B-Détermination de la séquence du gène codant

pour l'antigène P21	р.	61
1-Séquençage des inserts ADNc	p.	61
2-Insert génomique	р.	65
3-Détermination du départ de la transcription	р.	66
4-Vérification de l'absence d'intron	р.	70

### III - CLONAGE DU GENE CODANT POUR L'ANTIGENE DE 32KDa

A-Inserts	d'ADNc	p.	72
B-Inserts	génomiques	p.	75

## IV - STRUCTURE MOLECULAIRE DES DEUX ANTIGENES DE 21 ET 32KDa

A-Structure primaire et profil d'hydrophobicité	p.	78
B-Représentation des molécules en 2 dimensions	p.	80
C-Obtention d'antisérums spécifiques de l'antigène de 32 kDa	p.	80
D-Localisation de l'antigène P32	p.	82

#### DISCUSSION

p. 85

Structure des gènes	p.89
Structure des protéines GRA5 et P32	p.94
Propriétés immunologiques	p. 99

CONCLUSION	р.	103

# MATERIELS ET METHODES

I -	<ul> <li>Etude des protéines natives et recombinantes</li> </ul>	p.	105
	1-Parasites	p.	105
	2-Western blots d'extrait total de tachyzoïtes	p.	105
	3-Purification de l'antigène P21 natif	p.	106
	4-Digestion trypsique de l'antigène P21 et séquençage des peptides générés	р.	106
	5-Obtention des sérums anti-P21	p.	107
	6-Sélection d'anticorps	p.	107
	7-Produits de traduction des clones	p.	107
	8-Expression des protéines recombinantes a-Sous-clonage dans le vecteur d'expression pGEX b-Expression et purification des protéines recombinantes	p.	108
	9-Immunisation par les protéines recombinantes et par le peptide de synthèse	р.	110
	10-Localisation des antigènes par immunofluorescence	р.	110
	11-Analyse des séquences protéiques	p.	110

•

·

II - Biologie moléculaire	р.	111
1-Banque d'ADNc de tachyzoïtes	p.	111
a-Construction		
b-Criblage		
c-Excision : passage à la forme plasmidique		
des clones λZap II		
2-ADN génomique	p.	113
a-Purification d'ADN génomique de tachyzoïtes		
b-Banque génomique		
c-Sous-clonage des fragments génomiques		
en vecteur plasmidique		
3-Préparations de plasmide	p.	115
4-Southern et Northern Blots	p.	115
a-Sondes nucléiques		
b-Hybridation		
5-Séquençage	р.	117
6-Extension d'amorce	p.	118
7-Protection à la Nucléase S1	p.	119
BIBLIOGRAPHIE HILLE *	p.	120

# 152